



**HAL**  
open science

# Cardiosensibilisation à l'ischémie-reperfusion induite par l'hypoxie intermittente : rôle de différents agents cardioprotecteurs

Amandine Ramond

► **To cite this version:**

Amandine Ramond. Cardiosensibilisation à l'ischémie-reperfusion induite par l'hypoxie intermittente : rôle de différents agents cardioprotecteurs. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00574469

**HAL Id: tel-00574469**

**<https://theses.hal.science/tel-00574469v1>**

Submitted on 8 Mar 2011

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

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



# UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**  
Spécialité Physiologie-Physiopathologies-Pharmacologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Amandine RAMOND

le 15 décembre 2010

---

## **CARDIOSENSIBILISATION A L'ISCHEMIE-REPERFUSION INDUITE PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE : ROLE DE DIFFERENTS AGENTS CARDIOPROTECTEURS**

---

Thèse dirigée par Mme le Docteur Marie JOYEUX-FAURE

Thèse préparée au sein du Laboratoire Hypoxie PhysioPathologie (HP2) – INSERM ERI17  
dans l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

## **JURY**

Civilité/Nom/Prénom	Fonction et lieu de la fonction	Rôle
M. le Professeur Vincent RICHARD	MCU-PH, Université de Rouen	Rapporteur
M. le Professeur Luc ROCHETTE	PU, Université de Bourgogne	Rapporteur
M. le Professeur Patrick LEVY	PU-PH, Université de Grenoble	Président
Mme le Docteur Marie JOYEUX-FAURE	MCU, Université de Grenoble	Examineur

Laboratoire HP2 (Hypoxie PhysioPathologie)  
INSERM ER117  
Directeur du laboratoire : Pr Patrick LEVY  
Institut Jean Roget  
38042 Grenoble Cedex 9  
France

## Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord au **Docteur Marie Joyeux-Faure**, qui m'a accueillie dès mon stage de M1, et qui m'a encadrée depuis lors. Merci pour ton aide et ton soutien aussi bien professionnels que personnels tout au long de ces années.

Je remercie le **Docteur Vincent Richard** et le **Professeur Luc Rochette**, d'avoir accepté d'être les rapporteurs et de juger mon travail de thèse. Je vous remercie de vos remarques et vous adresse ma profonde considération.

Je remercie également le **Professeur Patrick Lévy**, directeur du laboratoire HP2, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Merci à tous les membres d'HP2 pour leur accueil et la bonne ambiance du labo, à tel point que j'ai bien failli ne jamais en partir !

Un grand merci à Diane pour sa bonne humeur et ses bonnes idées, et à Christophe pour son aide et ses conseils.

Dominique, Sandrine, Marie, merci pour votre précieuse aide technique et logistique, qui a permis le bon déroulement des manips. Mais un grand merci également pour votre soutien et votre réconfort au quotidien.

Un grand merci à l'HP2 team première génération : Blandine, Claire, Elise, Julia, Pauline. Merci pour tous ces moments de rigolade, au labo, en congrès (GRRC fever!) ou ailleurs...à quand les retrouvailles dans les îles ?

HP2 team next generation : Anne, Emilie, Laureline, Manue. Merci à toutes pour votre bonne humeur et tous ces Musicquiz enflammés !

Une pensée également pour le service d'oncologie du CHU, où j'ai également passé beaucoup de temps ces 4 dernières années.

Merci au Professeur Mireille Mousseau et au bureau de l'AGARO de m'avoir donné l'opportunité de découvrir la recherche clinique, et surtout un grand merci d'avoir renouvelé la confiance que vous m'accordez pour l'après-thèse !

Merci à toute l'équipe des ARCs, pour la bonne ambiance qui règne dans nos deux petits bureaux.

Une pensée particulière à Barbara, Emilie, Samira, j'espère qu'on aura encore l'occasion de faire de nombreux concerts ensembles, et pourquoi pas prochainement un road trip au Canada !

Enfin à tout le reste de l'équipe, secrétaires, médecins, infirmières: merci !

Emeline et Gaëlle, je sais que je peux compter sur vous à tout moment, merci.

Brice, merci d'avoir été présent ces 18 dernières années...en espérant que ça continue au moins le triple !

A toute la tribu Ramond-Carre : merci pour vos encouragements et votre soutien tout au long de mes années d'étude. On ne choisit pas sa famille, mais si j'avais pu je n'aurais pas fait mieux !

*A ma grand-mère, Ginette*

## RESUME

### **Cardiosensibilisation à l'ischémie-reperfusion induite par l'hypoxie intermittente : rôle de différents agents cardioprotecteurs**

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est connu pour être un facteur de risque indépendant de l'insuffisance coronarienne aiguë. Chez le rat, l'hypoxie intermittente (HI) aiguë ou chronique augmente la sensibilité du cœur à l'infarctus. En effet, l'exposition à l'HI (FiO<sub>2</sub> 5%) de 4 h ou de 14 jours aggrave les lésions myocardiques induites par une ischémie-reperfusion (I/R). Le but de ce travail est de déterminer si des agents connus pour leurs propriétés anti-ischémiques peuvent prévenir les conséquences cardiovasculaires délétères de l'HI chez le rat. Ainsi les effets de l'érythropoïétine (EPO), la trimétazidine (TMZ), le tempol et la mélatonine sur la cardiosensibilisation induite par l'HI ont été étudiés. L'administration d'EPO exogène, immédiatement avant ou après une I/R, prévient l'aggravation de l'infarctus induite par l'HI aiguë dans le cœur isolé de rat. Le tempol et la mélatonine préviennent également les effets délétères de l'HI via leurs propriétés antioxydantes. L'administration concomitante à une HI chronique de 14 jours de l'un de ces agents permet de réduire significativement l'aggravation de l'infarctus et l'élévation de la pression artérielle moyenne. De plus, le traitement par le tempol abolit la génération d'anions superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et la surexpression de la sous-unité p47-phox de la NADPH oxydase, suggérant le rôle du stress oxydant dans les effets cardiovasculaires délétères de l'HI. En revanche, la TMZ, administrée durant les 14 jours d'HI, n'a pas d'effet significatif, suggérant que l'action anti-ischémique de la TMZ ne peut compenser les effets délétères de l'HI. Des études complémentaires sont nécessaires pour explorer les mécanismes impliqués dans la cardiosensibilisation et en particulier le rôle exact du stress oxydant. Ainsi, de nouvelles perspectives cliniques et thérapeutiques basées sur ces études pourraient être envisagées dans le SAOS.

Mots clés : Hypoxie intermittente, Ischémie-reperfusion cardiaque, Infarctus myocardique, Stress oxydant, Agent cardioprotecteur

---

## ABSTRACT

### **Deleterious cardiovascular consequences induced by intermittent hypoxia: role of several cardioprotective agents**

Obstructive sleep apnea (OSA) is known to be an independent risk factor for coronary heart disease. In the rat, acute and chronic intermittent hypoxia (IH) increases myocardial sensitivity to infarction. Indeed, a 4-h or a 14-day exposure to IH (5% FiO<sub>2</sub>) aggravates the myocardial lesions induced by an ischemia-reperfusion (I/R) sequence. The aim of this work was to determine whether agents known for their anti-ischemic properties could prevent the deleterious cardiovascular consequences of IH in the rat. Therefore, we have investigated the effects of erythropoietin (EPO), trimetazidine (TMZ), tempol and melatonin on IH-induced myocardial susceptibility to infarction. When administered immediately before or after I/R, exogenous EPO dose-dependently prevented the acute IH-induced increase in infarct size in the isolated rat heart. Tempol and melatonin were also able to prevent the deleterious cardiovascular effects of IH through their antioxidant properties. Indeed, when administered daily during a 14-day IH exposure, these treatments significantly abolished both the increase in infarct size and in mean arterial blood pressure. Moreover, tempol prevented myocardial superoxide anion generation and expression of the NADPH oxidase sub-unit p47-phox, suggesting a role for oxidative stress in the deleterious cardiac effects of IH in the rat. However, TMZ administration throughout IH exposure was without significant effects suggesting that the anti-ischemic actions of this agent are not sufficient to counteract the IH-induced myocardial susceptibility to infarction. Additional studies are now required to explore the mechanisms involved in these deleterious effects and in particular the exact contribution of oxidative stress. This will enable the development of clinical perspectives and of novel therapeutic strategies for OSA syndrome.

Keywords : Intermittent hypoxia, Cardiac ischemia-reperfusion, Myocardial infarction, Oxidative stress, Cardioprotective agent

# Sommaire

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Ischémie-reperfusion myocardique</b>	<b>13</b>
1.1.1	Généralités	13
1.1.2	L'ischémie myocardique	14
1.1.3	La reperfusion du myocarde ischémiq	19
<b>1.2</b>	<b>Hypoxie et tolérance à l'ischémie-reperfusion cardiaque</b>	<b>23</b>
1.2.1	Généralités sur l'hypoxie et le SAOS	23
1.2.2	Effets de l'hypoxie sur la tolérance ischémiq	26
<b>1.3</b>	<b>Différents traitements protecteurs contre l'ischémie</b>	<b>53</b>
1.3.1	L'EPO	53
1.3.2	La trimétazidine	54
1.3.3	Le tempol	57
1.3.4	La mélatonine	59
<b>2</b>	<b>OBJECTIFS DE CE TRAVAIL</b>	<b>61</b>
<b>2.1</b>	<b>Protection contre l'ischémie-reperfusion</b>	<b>62</b>
<b>2.2</b>	<b>Protection contre les conséquences cardiovasculaires délétères induites par l'HI et étude des mécanismes impliqués.</b>	<b>62</b>
<b>3</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>64</b>
<b>3.1</b>	<b>Matériel biologique</b>	<b>65</b>
3.1.1	Animaux	65
3.1.2	Traitements aigus et chroniques	65
<b>3.2</b>	<b>Stress hypoxique</b>	<b>70</b>
3.2.1	Dispositif à hypoxie	70
<b>3.3</b>	<b>Mesure des paramètres hémodynamiques</b>	<b>73</b>
3.3.1	Mesure du poids des animaux	73
3.3.2	Mesure de la pression artérielle	73
3.3.3	Mesure de l'hématocrite	73
<b>3.4</b>	<b>Modèle d'ischémie-reperfusion myocardique</b>	<b>74</b>
3.4.1	Modèle d'ischémie-reperfusion sur cœur isolé et perfusé selon Langendorff	74
3.4.2	Mesures hémodynamiques	74
3.4.3	Détermination de la taille de l'infarctus	75
<b>3.5</b>	<b>Mesure du stress oxydant par dosage de la NADPH oxydase</b>	<b>76</b>
3.5.1	Prélèvement du cœur	76
3.5.2	Extraction des protéines membranaires	76
3.5.3	Dosage des protéines par la méthode de Bradford	76
3.5.4	La NADPH oxydase	76
3.5.5	Mesure de la NADPH oxydase par western blot	77
<b>3.6</b>	<b>Mesure du stress oxydant par marquage au dihydroéhidium</b>	<b>79</b>
3.6.1	Cryosection des coeurs	79
3.6.2	Marquage au dihydroéhidium	79
<b>3.7</b>	<b>Analyses statistiques</b>	<b>80</b>

<b>4</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>81</b>
4.1	Effets de l'érythropoïétine sur les conséquences myocardiques délétères induites par l'hypoxie intermittente	82
4.2	Effets de la trimétazidine sur les conséquences myocardiques délétères induites par l'hypoxie intermittente	92
4.3	Effets du tempol et de la mélatonine sur les conséquences myocardiques délétères induites par l'hypoxie intermittente	93
<b>5</b>	<b>AUTRES TRAVAUX MENES EN PARALLELES</b>	<b>120</b>
5.1	Travaux sur les effets protecteurs de l'EPO	121
5.1.1	Cardioprotection par l'EPO et mécanismes impliqués	121
5.1.2	EPO et protection contre l'arrêt cardiaque	129
5.1.3	EPO et protection contre la cardiotoxicité induite par chimiothérapie	135
5.1.4	EPO et cardioprotection de rats diabétiques	145
5.2	Travaux sur d'autres conséquences de l'HI chronique	147
5.2.1	Etude de la fonction mitochondriale cardiaque lors d'une HI chronique	147
5.2.2	Angiogenèse et mesure de VEGF	148
<b>6</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>153</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>158</b>

## Liste des figures

Figure 1: Schéma du métabolisme énergétique cardiaque .....	15
Figure 2: Mécanismes du développement de l'infarctus .....	18
Figure 3: Mécanismes du développement des lésions de reperfusion.....	22
Figure 4 : Evénements respiratoires lors d'un collapsus pharyngé et enregistrement polysomnographique .....	24
Figure 5 : Rôle de la trimétazidine dans le métabolisme énergétique cardiaque.....	56
Figure 6 : Propriétés chimiques du tempol.....	58
Figure 7 : Schéma expérimental de l'administration d'EPOrh chez le rat. ....	67
Figure 8 : Schéma expérimental de l'administration de TMZ chez le rat. ....	68
Figure 9 : Schéma expérimental de l'administration de tempol et mélatonine chez le rat.....	70
Figure 10 : (A) Dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente. (B) Représentation schématique du fonctionnement du dispositif .....	72
Figure 11 : Signal de FiO <sub>2</sub> enregistré dans une cage pendant l'exposition à l'HI. ....	72
Figure 12 : Activation de la NADPH oxydase. ....	77
Figure 13 : Principe du marquage de la détection du superoxide par le DHE.....	80
Figure 14 : Effet de la trimétazidine sur la taille d'infarctus et la pression artérielle moyenne après 14 jours de traitement et d'HI.....	93
Figure 15 : Complément des résultats sur le marquage au DHE.....	95

## Liste des abréviations

<b>1,400W</b> : N-(3-(aminométhyl)benzyl)acetamidine	<b>I/R</b> : ischémie-reperfusion
<b>3-KAT</b> : 3-kétoacyl coenzyme A thiolase	<b>K<sup>+</sup></b> : potassium
<b>AGL</b> : acides gras libres	<b>K<sub>ATP</sub></b> : canaux potassiques ATP dépendants
<b>ADP</b> : adénosine diphosphate	<b>K<sub>Ca</sub></b> : canaux potassiques calcium dépendants
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b>KCl</b> : chlorure de potassium
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : calcium	<b>L-NAME</b> : N-nitro-l-arginine méthyl ester
<b>CPP</b> : pression de perfusion coronaire	<b>MDA</b> : malonedialdéhyde
<b>DC</b> : débit coronaire	<b>mK<sub>ATP</sub></b> : canaux mitochondriaux potassiques ATP dépendants
<b>DHE</b> : dihydroéhidium	<b>mPTP</b> : pore de transition de perméabilité mitochondrial
<b>eNOS ou NOS3</b> : NO synthase endothéliale	<b>Na<sup>+</sup></b> : sodium
<b>EPO</b> : érythropoïétine	<b>NADH</b> : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
<b>EPO-R</b> : récepteur de l'érythropoïétine	<b>NADPH</b> : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<b>EPOrh</b> : érythropoïétine recombinante humaine	<b>NO</b> : oxyde nitrique
<b>ERO</b> : espèces réactives de l'oxygène	<b>NOS</b> : nitric oxide synthases
<b>ET-1</b> : endothéline-1	<b>O<sub>2</sub></b> : dioxygène
<b>FADH<sub>2</sub></b> : flavine adénine dinucléotide réduit	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> : anion superoxyde
<b>FC</b> : fréquence cardiaque	<b>OCT</b> : optimum cutting temperature compound
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : peroxyde d'hydrogène	<b>PA</b> : pression artérielle
<b>HI</b> : hypoxie intermittente	<b>PAM</b> : pression artérielle moyenne
<b>HICA</b> : hypoxie intermittente chronique d'altitude	<b>pCO<sub>2</sub></b> : pression partielle en dioxyde de carbone
<b>HIF-1</b> : hypoxia inducible factor	<b>PD</b> : pression diastolique
<b>HTA</b> : hypertension artérielle	<b>PDH</b> : pyruvate déshydrogénase
<b>IAH</b> : indice apnées-hypopnées	
<b>iNOS ou NOS2</b> : NO synthase inductible	

**PDVG** : pression développée par le ventricule gauche

**PI3-kinase** : phosphatidylinositol-3 kinase

**PPC** : pression positive continue

**PS** : pression systolique

**PTD** : pression télédiastolique

**RS** : réticulum sarcoplasmique

**SaO<sub>2</sub>** : saturation artérielle en O<sub>2</sub>

**SAOS** : syndrome d'apnées obstructives du sommeil

**SHR** : rat spontanément hypertendu

**SOD** : superoxyde dismutase

**Tempol** : 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl

**TMZ** : trimétazidine

**TTC** : chlorure de triphényl tétrazolium

**VAS** : voies aériennes supérieures

**VEGF** : facteur de croissance vasculaire endothéliale

**VG** : ventricule gauche

# **1 INTRODUCTION**

Aujourd'hui, l'un des enjeux de la thérapeutique consiste à développer de nouveaux traitements afin de protéger et de limiter la dégénérescence des tissus cardiaques endommagés par une séquence d'ischémie-reperfusion (I/R), qui peut se produire suite à un infarctus du myocarde ou une chirurgie nécessitant la mise en place d'une circulation extracorporelle avec arrêt du cœur.

Dans une première partie introductive de cette thèse, nous avons donc rappelé les phénomènes se produisant lors d'une I/R ainsi que les mécanismes cellulaires impliqués. Par ailleurs, nous nous sommes aussi intéressés à une pathologie influençant la sensibilité à l'I/R cardiaque, le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), qui est connu pour être un facteur de risque indépendant de l'insuffisance coronarienne aiguë. Nous avons alors développé une des composantes de cette pathologie, l'hypoxie intermittente (HI) et ses effets cardiovasculaires.

Nous avons ensuite abordé l'utilisation d'agents connus pour leurs propriétés anti-ischémiques, potentiellement protecteurs des conséquences cardiovasculaires délétères d'une HI.

La seconde partie de cette thèse a consisté à préciser les objectifs de travail avant de présenter le matériel et méthode utilisés en troisième partie et les résultats obtenus exposés en quatrième partie.

En dernière partie, la synthèse des travaux expérimentaux a été présentée ainsi que les nouvelles études expérimentales et cliniques pouvant être envisagées suite à ces travaux ainsi que les perspectives thérapeutiques qui pourraient s'ensuivre dans le SAOS.

## **1.1 Ischémie-reperfusion myocardique**

### **1.1.1 Généralités**

L'ischémie myocardique est classiquement définie comme un déficit de perfusion sanguine résultant en un déséquilibre entre les besoins et l'apport d'oxygène et nutriments nécessaires au bon fonctionnement du muscle cardiaque. Ce déséquilibre peut être dû à

une augmentation de la demande énergétique du cœur, comme observé lors d'une hypertrophie du ventricule gauche, d'une tachycardie ou d'un exercice physique.

La demande énergétique accrue du myocarde peut également être associée à une diminution des apports en oxygène comme observé lors de l'angor d'effort. Ce déséquilibre peut également être dû à une diminution localisée de l'apport sanguin, comme par exemple lorsqu'une artère coronaire se trouve partiellement ou totalement obstruée par un caillot ou une plaque d'athérome. On parle alors d'infarctus du myocarde, une maladie d'insuffisance coronarienne aiguë survenant le plus souvent suite à l'occlusion d'une artère coronaire épicaudique. L'ischémie myocardique concerne alors une seule région du cœur. Elle peut également concerner l'ensemble du muscle cardiaque, dans le cadre d'une chirurgie cardiaque ou suite à un choc hypovolémique.

L'ischémie du myocarde va entraîner des dommages cellulaires, qui seront réversibles si la perfusion est rétablie à temps, mais qui deviendront irréversibles si l'ischémie est maintenue ou si la reperfusion est rétablie trop tardivement.

### **1.1.2 L'ischémie myocardique**

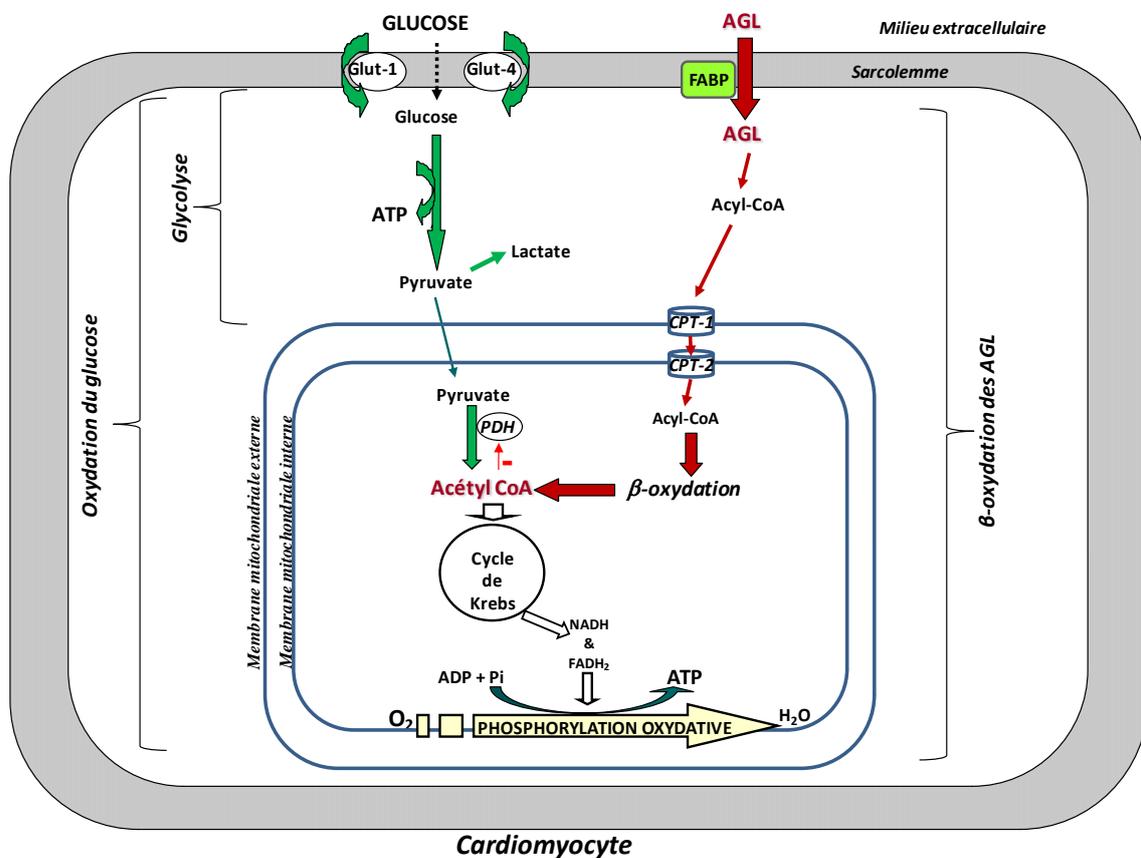
Le muscle cardiaque a un besoin énergétique de base important. Cette énergie lui permet d'assurer sa fonction contractile et de subvenir aux besoins des ses systèmes cellulaires énergie-dépendants. L'énergie provient principalement de l'oxydation de substrats exogènes apportés au myocarde par la circulation coronaire. Dans les conditions physiologiques, l'oxydation des acides gras libres (AGL) représente 60 à 70% de la consommation en O<sub>2</sub> et ceux-ci forment donc le substrat principal du cœur [1]. L'autre substrat majeur est le glucose qui participe pour environ 20% au métabolisme énergétique cardiaque. Des sources de moindre importance peuvent également participer comme le lactate, le pyruvate, les corps cétoniques et les acides aminés. Le métabolisme cardiaque est donc essentiellement aérobie.

En situation normale, la principale voie d'utilisation des AGL pour la production d'énergie par le myocarde est la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Dans le cytoplasme, les AGL sont transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase, puis entrent dans la mitochondrie au moyen de la navette carnitine. Les acyl-CoA sont alors  $\beta$ -oxydés en acétyl-CoA qui va alors entrer dans le cycle de Krebs. Les équivalents réduits, le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et le flavine adénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>), produits durant le cycle vont permettre, via la chaîne de respiration mitochondriale, la

phosphorylation oxydative produisant de l'adénosine triphosphate (ATP) à partir d'adénosine diphosphate (ADP), de phosphate et de dioxygène (O<sub>2</sub>).

La quantité d'ATP produite par la β-oxydation est importante mais couteuse en oxygène.

En parallèle à cette voie, le glucose qui entre dans la cellule par les transporteurs GLUT 1 et GLUT 4, est transformé en pyruvate par la glycolyse. Cette étape est anaérobie, et conduit une faible production d'ATP. Dans la mitochondrie, la pyruvate déshydrogénase (PDH) transforme le pyruvate produit en acétyl-CoA, qui alimente le cycle de Krebs comme décrit précédemment. La voie d'oxydation du glucose est moins gourmande en O<sub>2</sub> que celle des AGL.



**Figure 1 : Schéma du métabolisme énergétique cardiaque**

Le glucose entre dans le cardiomyocyte via les transporteurs GLUT 1 et GLUT 4 et subit la glycolyse, dont le produit final est le pyruvate. Celui-ci est transporté dans la mitochondrie où il est oxydé en acétyl-coA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-coA entre dans le cycle de Krebs, permettant de générer NADH et FADH<sub>2</sub>, nécessaires à la production d'ATP par phosphorylation oxydative. Les AGL entrent dans le cardiomyocyte par diffusion passive ou par l'intermédiaire d'une « fatty acid binding protein » de la membrane plasmique (FABP). Les AGL sont alors transformés en acyl-coA, qui est transporté dans la mitochondrie via la navette carnitine (CPT-1 et CPT-2), avant d'être oxydé en acétyl-coA, qui entre dans le cycle de Krebs. L'acétyl-coA provenant de la β-oxydation inhibe la PDH. Le pyruvate produit par la glycolyse est alors transformé en lactate.

La PDH est un complexe enzymatique qui joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique cardiaque. En effet celle-ci se retrouve au carrefour des deux voies métaboliques que représentent la  $\beta$ -oxydation des AGL et l'oxydation du glucose. Ce complexe se présente sous deux formes, l'une phosphorylée active, et l'autre déphosphorylée inactive. C'est l'équilibre entre ces deux formes qui régit l'importance de l'utilisation du glucose, et donc la balance glucose/AGL. En effet, le maintien de la forme inactive est favorisé par le NADH et l'acétyl-CoA provenant de la  $\beta$ -oxydation des AGL [2].

Grâce à la PDH, le myocyte peut s'adapter rapidement à toute variation de l'apport en substrat. Ainsi, après un repas riche en glucide, la forte activation des récepteurs GLUT 4 par l'insuline induit une entrée significative de glucose dans la cellule au détriment de l'entrée des AGL. Il se produit alors une diminution de la  $\beta$ -oxydation et de ses produits (NADH et acétyl-CoA, favorisant l'inhibition de la PDH), permettant le couplage de la glycolyse avec l'étape d'oxydation du glucose, favorisant ainsi l'utilisation du glucose qui peut représenter jusqu'à 70% du métabolisme cardiaque. Au contraire, une forte concentration plasmatique d'AGL provoque une augmentation de leur captation par la cellule et induit une activation massive de la  $\beta$ -oxydation, et donc l'inhibition de la PDH. On observe donc un découplage de la glycolyse et des étapes d'oxydation du glucose, aboutissant à une contribution des AGL pouvant atteindre 100% de la production d'énergie par le myocyte.

En situation d'ischémie, c'est la baisse d'apport en  $O_2$  plus que le manque de substrat qui va provoquer les premiers dysfonctionnements.

Les AGL continuent de pénétrer dans la cellule, activant les premières étapes de la  $\beta$ -oxydation, qui ne peut aboutir à la phosphorylation de l'ATP du fait du manque d' $O_2$ . L'accumulation d'acétyl-CoA provoque une inactivation de la PDH. De plus, l'accumulation de métabolites intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation a des effets délétères sur les membranes cellulaires. En parallèle, la glycolyse continue de fonctionner normalement, puisqu'elle ne consomme pas d' $O_2$ , mais est découplée des étapes suivantes d'oxydation du glucose du fait du manque d' $O_2$  et de l'inactivation de la PDH. Le pyruvate produit en excès ne peut rentrer dans le cycle de Krebs et s'accumule, favorisant sa transformation en lactate.

La production d'énergie va considérablement chuter, ne permettant plus de subvenir aux besoins du myocarde. Si l'ischémie se prolonge, la glycolyse anaérobie sera complètement arrêtée, conduisant à un arrêt de la production d'ATP.

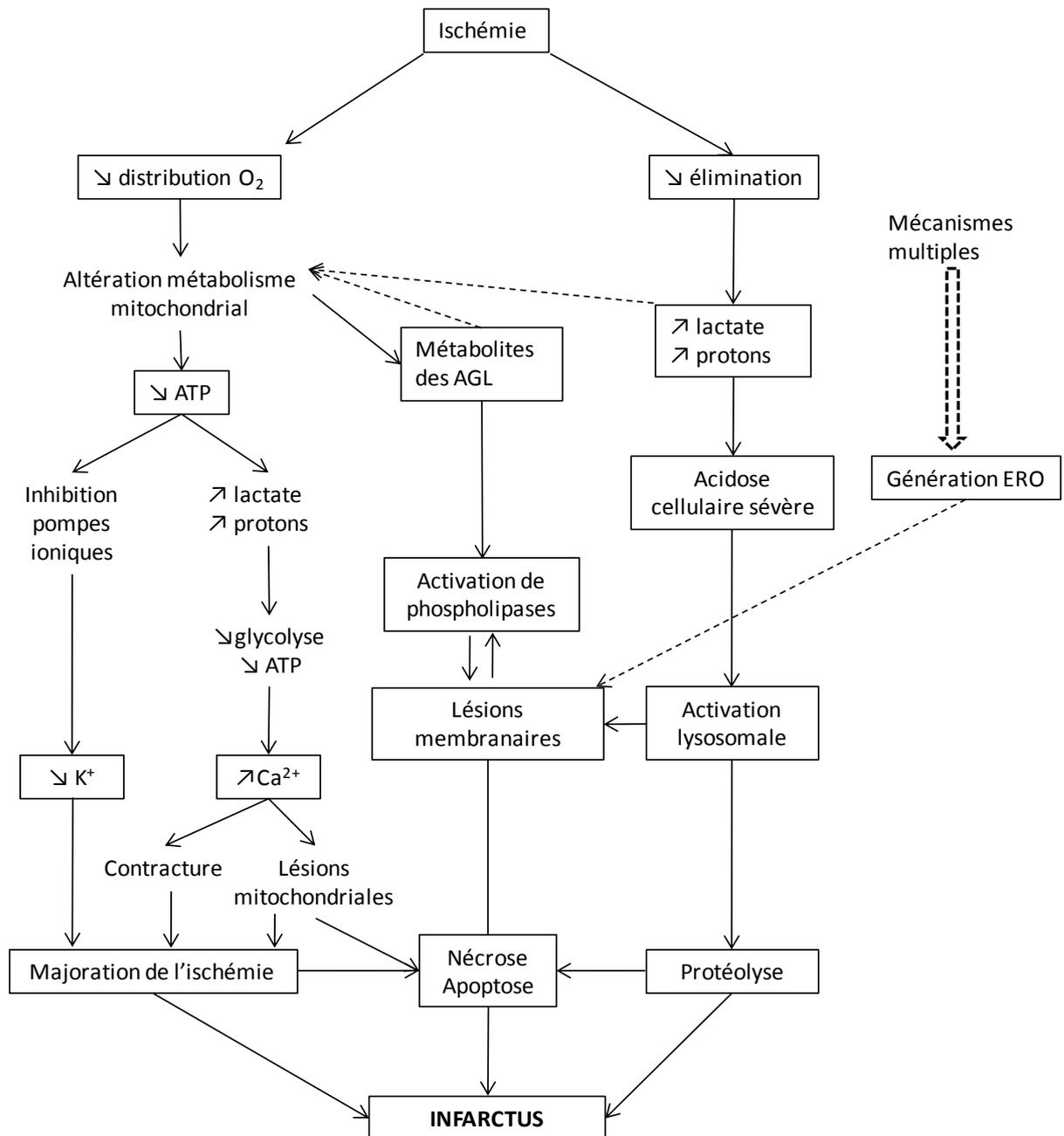
De plus, les protons produits durant la glycolyse ne peuvent être réutilisés par l'oxydation du glucose, favorisant ainsi leur accumulation. On observe également une accumulation d'équivalents réduits et de lactate dans le myocyte. Tout ceci est à l'origine d'une acidose intracellulaire provoquant une inhibition des enzymes de la glycolyse, une importante surcharge calcique et une augmentation du déficit énergétique [3].

La diminution de la production d'ATP a pour conséquence immédiate la diminution de l'activité contractile du myocarde. De plus, la déplétion des réserves d'ATP est à l'origine de la perturbation de l'homéostasie ionique du myocyte. En effet, la pompe sodium ( $\text{Na}^+$ ) / potassium ( $\text{K}^+$ ) ATP-dépendante est inhibée, ce qui entraîne une accumulation de sodium intracellulaire [4], associée à une entrée d'eau responsable d'un œdème intracellulaire. Cette surcharge sodique provoque également l'inversion de l'échangeur calcium/sodium. Ceci conduit à une accumulation de calcium à l'intérieur de la cellule, et entraîne des lésions au niveau des protéines contractiles, favorisant ainsi la contracture ischémique [5]. L'accumulation intracellulaire d'ions  $\text{Na}^+$  et calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) provoque une importante souffrance cellulaire aboutissant à la mort de la plupart des cardiomyocytes de la zone infarctée.

L'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants fait également suite à la diminution de la concentration en ATP. Il en résulte une accumulation d'ions  $\text{K}^+$  extracellulaires, responsable du raccourcissement du potentiel d'action.

Ces lésions, apparaissant au niveau cellulaire, sont irréversibles après 30 minutes environ d'ischémie sévère, *cette valeur dépendant énormément des espèces et aussi de la variabilité intra-individuelle, elle n'est donc qu'une moyenne.*

La figure ci-après schématise les événements conduisant à l'infarctus lors d'une ischémie.



**Figure 2 : Mécanismes du développement de l'infarctus, d'après Opie [1]**

Si la perfusion coronaire est rétablie précocement, ces lésions sont réversibles et il n'y aura pas de nécrose myocytaire. Les cardiomyocytes peuvent retrouver un métabolisme et une fonction normaux, après une période variable au cours de laquelle ils n'ont qu'une activité mécanique et métabolique restreinte : c'est la période de sidération.

### 1.1.3 La reperfusion du myocarde ischémique

Face à une occlusion coronaire, la reperfusion rapide du myocarde au moyen de techniques de thrombolyse et d'angioplastie reste le moyen le plus efficace pour réduire la taille de l'infarctus et améliorer la récupération d'un point de vue clinique. La récupération reste possible tant qu'il n'y a pas eu de lésions irréversibles. Cependant, la reperfusion, bien que nécessaire, va provoquer la survenue de divers événements qui vont interagir entre eux pour aboutir à une aggravation des lésions cellulaires évoluées, et provoquer des arythmies de reperfusion, la sidération myocardique, le phénomène de « no-reflow » et la nécrose cellulaire de reperfusion (accélération de la mort cellulaire). Plus la reperfusion sera tardive, plus celle-ci aura un effet délétère. Tous ces événements interagissent entre eux, aboutissant à la mort du cardiomyocyte via l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP), et à l'induction d'une contracture du cardiomyocyte.

L'ischémie induit l'accumulation intracellulaire d'ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , responsable d'une acidose tissulaire. La reperfusion, à son tour, provoque des changements rapides des courants ioniques. Il semblerait qu'une restauration trop rapide du pH soit responsable d'une cytotoxicité accrue [6]. Les mécanismes de régulation du pH sodium dépendants, incluant l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et le transporteur  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  sont activés, ce qui conduit à une accumulation de  $\text{Na}^+$  intracellulaire. Cette augmentation de concentration de  $\text{Na}^+$  provoque un afflux supplémentaire d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet la sortie dans le milieu intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum sarcoplasmique (RS) est due à l'inversion de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  [7]. De plus la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) au moment de l'I/R cause des dommages à la membrane du RS et des dysfonctionnements de ce système. La sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol par les canaux calciques sarcolemmaux L-type [8-10] et une baisse de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS par la calcium-adénosine-triphosphatase ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) [11, 12] contribuent encore plus à la surcharge calcique. Tout ceci aboutit à une hypercontracture des myofibrilles, une déplétion en ATP, des dommages structurels mitochondriaux et au stunning du myocarde [13, 14].

Les cardiomyocytes consomment une grande quantité d'énergie, produite par une quantité importante de mitochondries. Le mPTP joue un rôle important dans les lésions d'I/R [15].

La membrane interne de la mitochondrie, responsable du maintien du potentiel transmembranaire mitochondrial, est habituellement fermée, et donc imperméable aux ions et protéines. Au moment de la reperfusion, plusieurs phénomènes vont agir de concert pour induire l'ouverture de ce pore. En effet, sous l'influence de divers facteurs tels que la surcharge calcique [16], la restauration rapide du pH et le stress oxydant [17-19], la conformation du PTP va passer de fermée à ouverte, créant ainsi un canal non sélectif entre la membrane interne de la mitochondrie et le sarcoplasme. Il s'ensuit une perte du gradient électro-chimique, le relargage d'ERO et la formation d'apoptosome, faisant suite à la sortie dans le cytosol du cytochrome C, un élément clé de la voie d'activation des caspases.

Cette ouverture du mPTP est responsable de la mort des cardiomyocytes, en provoquant le découplage de la phosphorylation oxydative et en induisant le gonflement de la mitochondrie.

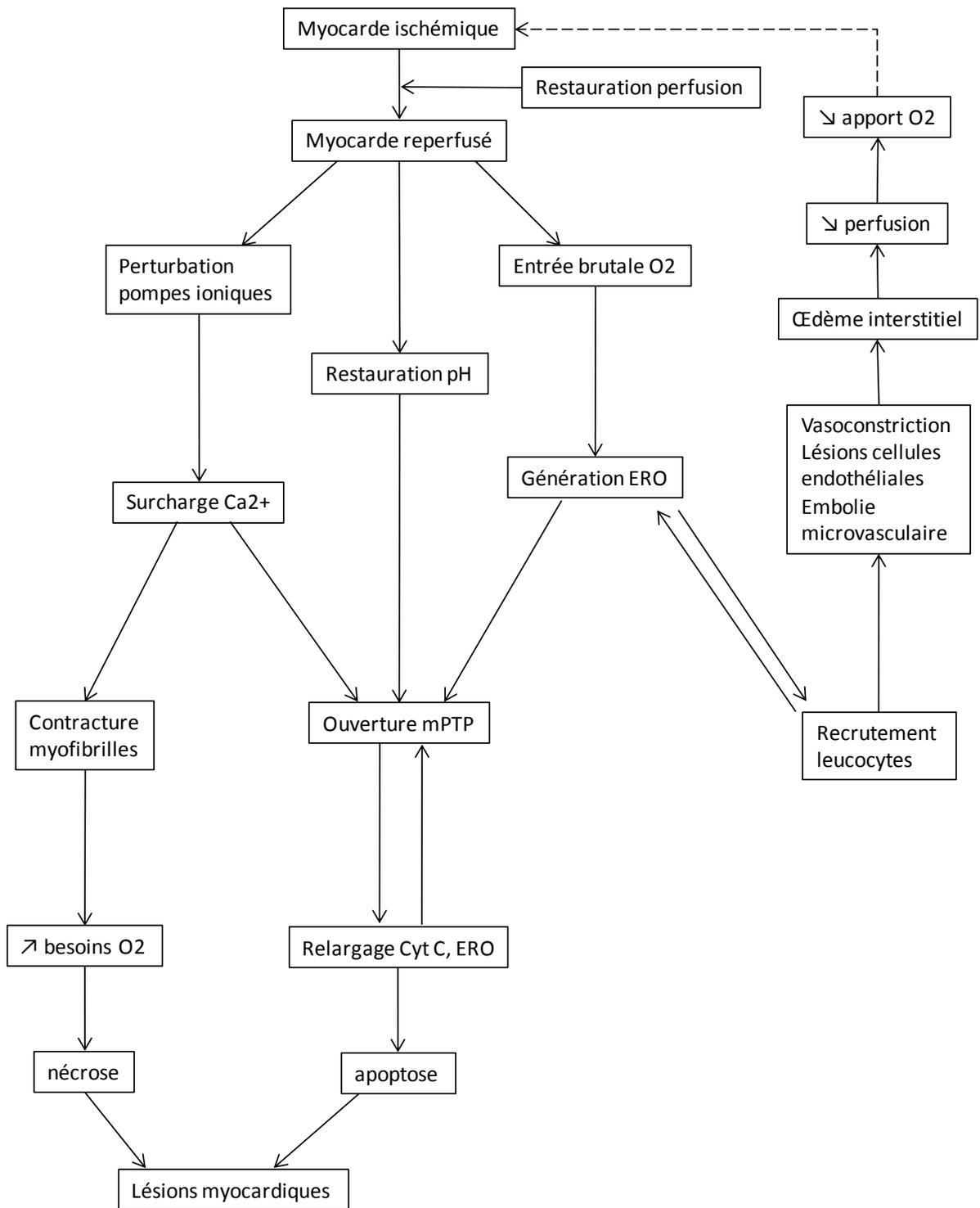
La majorité des ERO produites pendant l'I/R sont générées par la xanthine oxydase [20, 21] et par la remise en route de la chaîne de transport d'électron dans les mitochondries des cardiomyocytes. Plusieurs heures plus tard, la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) oxydase génère elle aussi des ERO, principalement via les neutrophiles [22].

En situation de stress tel qu'une I/R, les mécanismes endogènes de défense contre les ERO deviennent rapidement insuffisants. Les ERO sont responsables de nombreux dommages cellulaires, provoquant des peroxydations lipidiques qui vont endommager les membranes cellulaires, mais également des dénaturations enzymatiques et des dommages à l'ADN par oxydation directe. En plus des dommages cellulaires, les ERO participent à l'ouverture du mPTP [23]. Ceci conduit à une boucle de feedback positive favorisant la sortie dans le cytosol des ERO présents dans la mitochondrie, et favorisant donc encore plus l'ouverture du mPTP [24].

L'inflammation joue également un rôle non négligeable dans les lésions d'I/R. La libération de chémoattractants au moment de l'I/R (ERO, cytokines...) et l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales [25] permet le recrutement de neutrophiles. Ces cellules sont particulièrement toxiques pour le myocarde, car elles sécrètent des protéases, des ERO et bloquent la microcirculation, exacerbant ainsi les effets délétères de l'ischémie.

L'endothélium joue lui aussi un rôle dans les lésions d'I/R. En temps normal, l'endothélium sécrète du monoxyde d'azote (NO), un gaz vasodilatateur ayant des effets protecteurs vis-à-vis de l'I/R jusqu'à une certaine concentration, probablement en agissant sur la consommation d'oxygène [26], l'agrégation plaquettaire [27], l'adhésion leucocytaire [28] et le « scavenging » des ERO. Paradoxalement, à haute concentrations, le NO peut induire un stress oxydant supplémentaire en favorisant la formation d'espèces hautement radicalaires, telles que le peroxy-nitrite [29, 30]. C'est ce qui se produit lors d'une I/R où la concentration de NO augmente [31-33].

La figure suivante schématise les événements conduisant aux lésions de reperfusion, faisant suite à une ischémie.



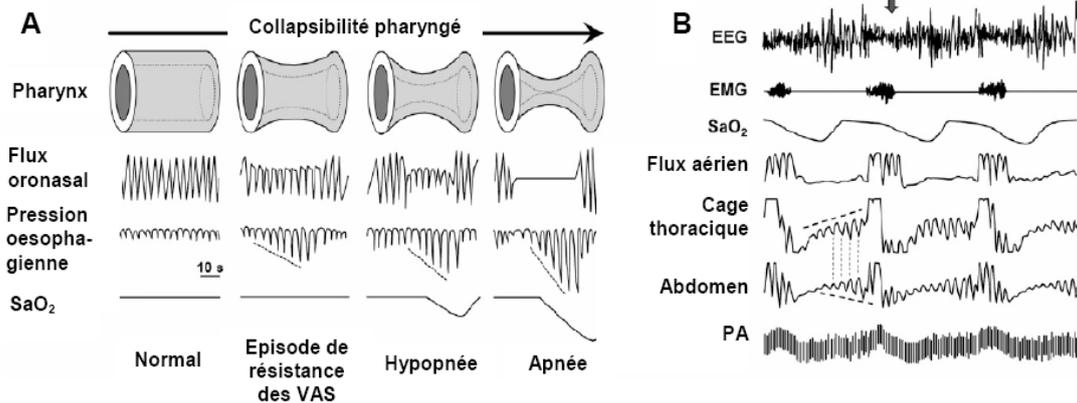
**Figure 3 : Mécanismes du développement des lésions de reperfusion**

## 1.2 Hypoxie et tolérance à l'ischémie-reperfusion cardiaque

### 1.2.1 Généralités sur l'hypoxie et le SAOS

Le SAOS est une pathologie fréquente affectant 4 à 6% des sujets adultes d'âge moyen, et jusqu'à 20% de la population plus âgée [34, 35]. Le SAOS se caractérise par l'obstruction répétée des voies aériennes supérieures (VAS), de manière partielle ou complète pendant le sommeil. Un relâchement musculaire est responsable d'une baisse (hypopnée) ou d'un arrêt (apnée) de la ventilation par collapsus pharyngé (Figure 4A). Ceci se traduit, au niveau sanguin, par une baisse de la saturation artérielle en O<sub>2</sub> (SaO<sub>2</sub>) et une augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone (pCO<sub>2</sub>). L'effort respiratoire engendré par le manque d'O<sub>2</sub> est responsable de micro-éveils, permettant la reprise de la ventilation, mais étant surtout à l'origine de la fragmentation du sommeil. Une des principales manifestations cliniques du SAOS est la somnolence diurne excessive liée à la perturbation du sommeil [36].

La méthode de diagnostic de référence du SAOS est la polysomnographie (Figure 4B), effectuée dans un laboratoire du sommeil. Cette méthode permet l'enregistrement et l'évaluation de nombreux paramètres, tels que l'activité cérébrale, le flux d'air nasal, l'intensité sonore des ronflements, les mouvements thoraciques, la saturation du sang en O<sub>2</sub>. La sévérité du SAOS est définie à partir du nombre moyen d'apnées et d'hypopnées survenant par heure (indice apnées-hypopnées, IAH). A l'heure actuelle, le traitement de référence proposé au patient SAOS est l'application d'une pression positive continue (PPC) à l'aide d'un masque, afin d'éviter le collapsus répété des VAS.



**Figure 4 : Evénements respiratoires lors d'un collapsus pharyngé et enregistrement polysomnographique, d'après Dematteis et al, 2009 [37]**

(A) Les différents stades de sévérité des événements respiratoires selon le degré de collapsus pharyngé. (B) Enregistrement polysomnographique : fragmentation du sommeil, désaturation en oxygène (SaO<sub>2</sub>), efforts respiratoires thoraco-abdominaux, fluctuations de la pression artérielle (PA) mesurés à chaque épisode d'apnée. EEG : électroencéphalogramme, EMG : électromyogramme.

Le SAOS est associé à une augmentation de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaires [38-40]. Les patients atteints de SAOS développent plus fréquemment des maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension systémique [41], l'insuffisance coronarienne [42], les arythmies cardiaques [43] et l'accident vasculaire cérébral [44, 45], par rapport à des patients non SAOS. Les patients SAOS peuvent également présenter une dysfonction ventriculaire [46], ainsi qu'une atteinte athérosclérotique précoce [47]. De plus, les troubles respiratoires du sommeil sont fréquents chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires et sont un facteur prédictif de maladie coronarienne [42].

Dans un modèle canin du SAOS, il a été montré que les animaux subissant une occlusion intermittente des voies aériennes pendant leur sommeil, sur une période de 1 à 3 mois développent une hypertension artérielle (HTA). Des animaux contrôles subissant seulement une fragmentation du sommeil n'ont pas de modification de leur pression artérielle (PA) [48]. Cette étude souligne l'importance de l'alternance des épisodes d'hypoxie/réoxygénation ou HI, dans la physiopathologie du SAOS. Ainsi l'HI récurrente qui est une conséquence de l'apnée du sommeil, semble être le facteur clé impliqué dans les conséquences cardiovasculaires délétères aiguës et chroniques associées au SAOS [49, 50].

Le SAOS a de nombreuses conséquences cardiovasculaires, parmi lesquelles on retrouve l'HTA, les coronaropathies, ainsi qu'une sensibilité accrue à l'I/R. De nombreuses études

ont ainsi montré le lien entre ces pathologies et le SAOS. Plusieurs modèles animaux ont aussi été développés afin d'étudier les effets de l'HI sur le système cardiovasculaire [37].

#### L'hypertension artérielle :

L'HTA est un facteur de risque important en termes de mortalité cardiovasculaire [51]. En effet une pression artérielle trop élevée provoque des modifications de la paroi des vaisseaux et conduit à une hypertrophie ventriculaire gauche. L'HTA conduit ainsi à une atteinte des artères coronaires, à l'infarctus du myocarde et contribue de façon majeure à l'insuffisance cardiaque.

L'association entre SAOS et HTA a été démontrée indépendamment de facteurs confondants tels que l'âge et l'obésité [34, 52]. De plus, la sévérité du SAOS et le développement de l'HTA semblent être corrélés [53, 54]. D'autre part, le traitement du SAOS améliore l'HTA. En effet, il a été montré une réduction faible mais significative de la PA chez des patients apnéiques traités par PPC. Cette réduction est d'autant plus marquée que les patients présentent un SAOS sévère [55, 56].

La relation entre HI et PA a été démontrée à de nombreuses reprises dans divers modèles animaux. Ainsi chez le rongeur, l'exposition à l'HI entraîne une augmentation de la pression artérielle moyenne (PAM) chez des animaux non sujets à l'HTA [57-59], comme chez le rat spontanément hypertendu (SHR) [60]. Différents mécanismes ont été proposés afin d'expliquer le lien entre HI et HTA : l'hyperactivité sympathique [61], la diminution du baroréflexe [62, 63], la dysfonction endothéliale se traduisant par une augmentation de la vasoconstriction et un remodelage vasculaire, ou encore l'altération des systèmes rénine-angiotensine [64] et endothéline [60, 65, 66]. Ces modifications fonctionnelles semblent dues au stress oxydant induit par l'HI [67-69]. L'augmentation de l'activité de la cyclo-oxygénase joue également un rôle dans ce phénomène [70]. Ainsi, la dysfonction endothéliale et la modification de la vasoréactivité induites par l'HI potentialise l'augmentation des résistances périphériques totales.

#### Les coronaropathies :

La maladie coronarienne qui s'instaure de façon progressive est initiée par des lésions au niveau des parois des artères coronaires. Ces lésions sont dues à un remodelage complexe lors du processus d'athérosclérose. Ce phénomène inflammatoire se traduit par un épaissement et une rigidité de la paroi artérielle. L'atteinte des vaisseaux coronaires peut conduire à une diminution de l'irrigation du cœur due à la présence d'une plaque

d'athérome et/ou à la formation d'un thrombus provenant de la rupture d'une plaque d'athérome instable. La complication la plus dangereuse et la plus fréquente de la maladie coronarienne est l'infarctus du myocarde.

La prévalence des accidents coronariens chez les patients atteints de SAOS a été évaluée dans plusieurs études cliniques. Ainsi, un risque relatif d'angor a été mis en évidence chez des hommes ronfleurs, indépendamment de l'âge, de la PA et de l'indice de masse corporelle [71]. Une autre étude a montré un risque de mortalité augmenté chez des patients présentant une coronaropathie et souffrant du SAOS [72]. Il a également été montré que le risque relatif d'accidents coronariens augmente avec la sévérité du SAOS [73]. Le processus athéromateux observé dans le SAOS serait fortement lié au nombre de désaturations nocturnes [47, 74]. Chez les patients porteurs d'un SAOS sévère, le traitement par PPC permet de réduire de manière significative le risque d'événements cardiovasculaires [38].

#### La tolérance ischémique

Il a aussi été observé que les patients en situation ischémique, comme lors d'un infarctus du myocarde, présentent fréquemment un SAOS. Le SAOS est donc reconnu comme un facteur prédisposant ou conduisant à la mort subite lors d'un infarctus myocardique [75, 76].

Chez l'animal, l'exposition préalable à une HI peut-être soit protectrice soit délétère vis-à-vis de la sensibilité à une I/R subséquente, en fonction de la nature du stimulus hypoxique. Ainsi, l'étude expérimentale des effets « contrastés » de l'HI sur la tolérance myocardique à l'ischémie, ainsi que les mécanismes sous-jacents impliqués, ont fait l'objet de nombreuses recherches afin de mieux les caractériser. La synthèse de ces recherches a conduit à la rédaction d'un chapitre de livre [77], présenté à la section suivante.

### **1.2.2 Effets de l'hypoxie sur la tolérance ischémique**

Chez l'animal, l'HI, caractérisée par des épisodes répétés d'hypoxie/réoxygénation, a des effets marqués et très contrastés sur la susceptibilité du myocarde à l'I/R. De nombreux modèles animaux ont été développés afin d'étudier ces effets. Ces modèles varient énormément en termes de durée des cycles, du nombre d'épisodes hypoxiques par jour et du nombre de jour d'exposition. Parmi tous ceci, deux modes bien distincts d'exposition

à l'HI ont été préférentiellement étudiés : l'hypoxie intermittente chronique d'altitude (HICA), plus représentative de l'adaptation physiologique à l'altitude, et un modèle d'HI basé sur des cycles courts, permettant d'étudier des pathologies liées à l'HI, telles que le SAOS.

Généralement, après une exposition à une HICA ou bien à une HI cyclique aigue, on observe une résistance myocardique aux lésions ischémiques. Ainsi, nous avons démontré qu'une courte exposition à l'HI de 4 h, avec une  $FiO_2$  à 10%, permet, par un mécanisme de préconditionnement retardé, de prévenir les effets délétères d'une I/R [78]. Les mécanismes cardioprotecteurs mis en jeu sont les mêmes que ceux du préconditionnement, impliquant certaines kinases, la voie du NO, les canaux mitochondriaux potassiques ATP dépendants ( $mK_{ATP}$ ), et la synthèse de nouveaux gènes. En revanche, l'exposition à un stress hypoxique plus sévère induit des lésions cardiovasculaires délétères conduisant à une diminution de la tolérance myocardique à l'ischémie. Ainsi nous avons montré qu'une exposition à l'HI de 4 h avec une  $FiO_2$  à 5%, augmente la susceptibilité des cardiomyocytes aux lésions d'I/R [79]. Les expositions prolongées altèrent aussi la tolérance myocardique face à une I/R [77]. Ainsi, nous avons montré que l'exposition de rats à l'HI pendant 14 ou 35 jours modifie la tolérance myocardique à l'I/R en augmentant la taille de l'infarctus [58, 60]. Cependant, les mécanismes exacts responsables de cette cardiosensibilisation restent inconnus.

L'étude des mécanismes d'adaptation à l'HI cyclique chronique devrait permettre de comprendre comment un stimulus cardioprotecteur peut devenir délétère, fournissant à terme des outils permettant d'appréhender les mécanismes pathogènes associés aux pathologies liées à l'HI telles que le SAOS.

**Contrasting effects of intermittent hypoxia on myocardial ischemic tolerance**

E. Belaidi<sup>1, 2</sup>, A. Ramond<sup>1,2</sup>, M. Joyeux-Faure<sup>1,2</sup>, P. Levy<sup>1,2</sup>, C. Ribuot<sup>1,2</sup>, D. Godin-Ribuot<sup>1,2</sup>

1 Laboratoire HP2, INSERM, ERI17, Grenoble, F-38042 France

2 Université Grenoble 1, Faculté de Médecine, IFR1, Grenoble, F-38042 France.

Chapitre publié dans l'ouvrage "Physiology and Pathophysiology of Intermittent Hypoxia",

édité par L Xi et TV Serebrovskaya, *Nova Science Publishers*, New-York, 2009.

Number of words: 6700

Please address correspondence to:

Professor Diane Godin-Ribuot  
Laboratoire HP2, Université Grenoble 1  
Institut Jean Roget, BP 170  
38042 GRENOBLE Cedex 9 – France  
Tel: 33 476 637 108 / Fax: 33 476 637 178  
E-Mail: [Diane.Ribuot@ujf-grenoble.fr](mailto:Diane.Ribuot@ujf-grenoble.fr)

## ABSTRACT

Intermittent hypoxia (IH), characterized by repeated episodes of hypoxia/reoxygenation, has profound and contrasting effects on the susceptibility of the myocardium to ischemia-reperfusion I/R injury. Several animal models have been developed to address these effects using experimental protocols that vary greatly in cycle length, number of hypoxic episodes per day and number of exposure days. Overall, two distinct modes of IH exposure have been preferentially investigated: the chronic intermittent high altitude hypoxia (IHAH), more representative of the physiological adaptation to altitude, and the short-cycle IH model, designed to reproduce the pattern of IH-related pathologies such as obstructive sleep apnea (OSA).

Myocardial resistance to ischemic injury is generally observed following chronic IHAH or acute cyclic IH, through preconditioning-like cardioprotective mechanisms involving stress-regulated kinases, nitric oxide, mitochondrial  $K_{ATP}$  channels, and de novo gene synthesis.

In contrast, repeated exposures to IH, elicit deleterious cardiovascular adaptations leading to a decrease in myocardial ischemia-reperfusion tolerance.

Investigation of the adaptive mechanisms of chronic cyclic IH should help our understanding of how a cardioprotective stimulus can convert into a deleterious one, hopefully providing insight into the pathogenic mechanisms associated with chronic IH-related pathologies such as OSA.

Number of words: 188

## INTRODUCTION

Oxygen is essential to sustain life and organisms have evolved sophisticated O<sub>2</sub>-sensing systems to rapidly respond to alterations in O<sub>2</sub> supply. The heart, with its high metabolic rate relative to blood flow, is particularly vulnerable and has developed powerful endogenous adaptive mechanisms.

The most well known is that of ischemic preconditioning (PC) whereby brief episodes of ischemia render the heart more resistant to subsequent ischemic injury. The PC phenomenon was first described in 1986 by Murry, Jennings, and Reimer in a landmark study [Murry et al. 1986] that has since prompted an intense research on the field of myocardial tolerance to ischemia/reperfusion (I/R) injury.

However, as soon as 1960, the reported lower incidence of myocardial infarction in people living at high altitude [Hurtado 1960] led to animal models describing cardioprotective effects of intermittent hypoxia (IH) on the myocardium, more than 10 years [Meerson et al. 1973] before the study of Murry et al.

Although IH, defined as repeated episodes of hypoxia interspersed with episodes of normoxia, may resemble ischemic PC with its repeated episodes of ischemia and reperfusion, the protocols used experimentally differ widely. Hence, IH protocols vary greatly in the timing of hypoxic cycling, the length of exposure, the degree of hypoxia, and the number of exposure days.

Overall, two distinct modes of IH exposure have been preferentially investigated. The chronic intermittent high altitude hypoxia (IH AH) model was first designed to reproduce the beneficial effects of accommodation to high altitude. It is characterized by daily exposure to a sustained (4 to 8 h) period of hypobaric (5000 to 7000 m) hypoxia followed by a return to normoxic conditions. Intermittence is provided by repetition of this stimulus over several days. Chronic IH AH has consistently been shown to improve cardiac ischemic tolerance [Kolar and Ostadal 2004] with less adverse effects than chronic continuous hypoxic adaptation [Zhuang and Zhou 1999].

The cyclic IH model consists of repetitive short cycles of normobaric hypoxia-normoxia applied daily during various lengths of time. Along with others, we have shown that the duration of exposure to cyclic IH is especially critical. Thus, although acute cyclic IH is cardioprotective, repetitive exposure gradually engenders adverse effects on the cardiovascular system. This observation is clinically relevant, since chronic exposure to brief episodes of hypoxia is the main feature of obstructive sleep apnea (OSA), a

pathophysiological condition associated with increased cardiovascular morbidity [McNicholas and Bonsignore 2007]. Given the high and increasing prevalence of this pathology in the general population [Punjabi 2008], understanding the mechanisms of chronic adaptation to cyclic IH is of particular importance.

However, the cardiovascular adaptation to the various forms of IH has been much less investigated than for ischemic PC, particularly regarding the tolerance to ischemic injury.

## 1. EFFECTS OF HIGH ALTITUDE INTERMITTENT HYPOXIA ON MYOCARDIAL ISCHEMIC TOLERANCE

The observation of the lower incidence of myocardial infarction in people living at high altitude prompted the first experimental studies on models of simulated high altitude hypoxia using hypobaric chambers [Kopecky and Daum 1958; Poupa et al. 1966].

Since then, the myocardial adaptation to repeated daily exposure to simulated high altitude has been extensively studied (see the reviews of Zhuang and Zhou 1999 and Kolar and Ostadal 2004) and its beneficial effects in protecting the heart against the deleterious consequences of ischemia-reperfusion are now well recognized.

Table 1 summarizes the various models used, the cardiac end-points assessed, and the cardioprotective mechanisms identified.

### 1.1. Beneficial effects of chronic IHAH on myocardial ischemic tolerance

The majority of studies have demonstrated that hearts from animals chronically exposed to IHAH develop smaller infarcts and exhibit improved functional recovery following ischemia compared to their respective controls [Kolar and Ostadal 2004]. Hence, exposure of rats to simulated IHAH (5000 m, 8 h/day, 5 days a week, for 24-32 days) reduces necrosis *in vivo* and improves ventricular functional recovery in isolated hearts following an ischemia/reperfusion (I/R) sequence [Neckar et al. 2002]. In a similar models, chronic IHAH prevented mtDNA deletion and mitochondrial structure damage produced by I/R in isolated rat hearts [Zhong et al. 2000b] and attenuated I/R-induced apoptosis via an increased ratio of Bcl-2/Bax proteins [Dong et al. 2003].

Another beneficial adaptation to chronic IHAH consists in prevention of I/R-induced arrhythmia in rats [Meerson et al. 1987; Meerson and Malyshev 1989; Asemu et al. 1999]. However, this effect is critically dependent on the degree and duration of hypoxic exposure [Asemu et al. 2000]. Thus, whereas adaptation to 5000 m for 4 h/day decreases the total number of premature ventricular beats, extending the daily exposure to 8 h and/or increasing the altitude to 7000 m promotes ventricular arrhythmias. The proarrhythmic effect of severe hypoxia might be related to the moderate left ventricular hypertrophy seen in rats adapted to 7000 m, but not in those adapted to 5000 m. The electrophysiological basis of the anti-

arrhythmic effect of IHAH may be explained by a prolongation of ventricular action potential duration, an effect observed along with an increased resistance against ischemic damage [Zhang et al. 2000].

## 1.2 Mechanisms underlying the cardioprotective adaptation induced by chronic IHAH

The protective adaptation activated by chronic IHAH appears to resemble that of classic preconditioning except that it lasts markedly longer [Neckar et al. 2004]. However, chronic IHAH has been much less studied than other forms of preconditioning and the understanding of its protective mechanisms is still far behind.

For instance, the triggering mechanisms of this form of cardioprotection have not been explored. One interesting candidate could be erythropoietin (EPO) whose production is effectively increased by chronic IHAH [Moore-Gillon and Cameron 1985]. EPO is now well recognized as a protective agent against ischemic injury since its binding to cardiac EPO receptors can activate various protective signaling pathways and switch the phenotype of cardiomyocytes to a defensive one [Joyeux-Faure et al. 2005a]. In view of these data, the role of EPO in triggering the cardioprotection induced by chronic IHAH should be investigated.

Some of the signaling pathways involved have been identified, in particular that of protein kinase C (PKC). Hence, the PKC inhibitor chelerythrine abolishes the cardioprotection induced [Ding et al. 2004; Neckar et al. 2005]. Moreover, a basal up-regulation of the particulate fraction of PKC- $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  isozymes and a PKC-related prevention of calcium and sodium overload have been reported in cardiomyocytes from chronic IHAH rats [Ding et al. 2004]. The PKC- $\delta$  isoform also appears to be involved in the infarct size-limiting effect of chronic IHAH since rottlerin, a selective PKC- $\delta$  inhibitor, attenuates this protective effect [Neckar et al. 2005]. Stable PKC activation also contributes to the preservation of the intracellular pH seen following I/R in chronic IHAH rats [Li et al. 2007].

Finally, the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway also appears to be implicated since LY294002, a specific PI3K/Akt inhibitor, attenuates the reduction in infarct size seen in chronic IHAH rats [Ravingerova et al. 2007].

Among the potential mediators of chronic IHAH cardioprotection, nitric oxide (NO) is a likely candidate since chronic IHAH up-regulates myocardial inducible nitric oxide synthase

(iNOS) mRNA levels and protein expression in rats and the selective iNOS-inhibitor aminoguanidine abolishes the cardioprotective effects [Ding et al. 2005].

Opening of ATP-sensitive potassium ( $K_{ATP}$ ) channels, in particular mitochondrial  $K_{ATP}$  channels, also plays a role. Indeed, the mitochondrial  $K_{ATP}$  channel blocker 5-hydroxydecanoate (5-HD) has been shown to abolish the reduction in infarct size, improvement in functional recovery and antiarrhythmic effect seen with chronic IHAH in the rat [Asemu et al. 1999; Neckar et al. 2002]. Both 5HD and the non-selective  $K_{ATP}$  channel blocker glibenclamide, were able to prevent the beneficial effect of chronic IHAH on intracellular calcium overload following I/R in isolated rat cardiomyocytes [Zhu et al. 2003].

Chronic IHAH also appears to inhibit the opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP). Hence, opening of the MPTP with atractiloside upon reperfusion abolishes the protective effects of chronic IHAH on functional recovery and infarct size in isolated rat heart [Zhu et al. 2006]. In this study, the authors have demonstrated that inhibition of MPTP opening by chronic IHAH promotes cytosolic calcium decline upon reperfusion and attenuates cytosolic and mitochondrial calcium overloading in isolated myocytes.

Heat stress proteins (HSP), and in particular HSP70, have also been proposed as mediators of chronic IHAH-cardioprotection. Indeed, the HSP70 mRNA level increases progressively in the rat heart along with the duration of IH training and overexpression of HSP70 inversely correlates with the occurrence of I/R-induced ventricular arrhythmias [Zhong et al. 2000a]. Members of HSP70 family are thought to act as molecular chaperones to repair or remove cellular proteins denatured by stresses such as I/R, leading to protection and/or restoration of cell function [Hightower 1991; Joyeux-Faure et al. 2003].

Finally, in rats exposed to chronic IHAH, pre-ischemic coronary flow of isolated hearts is higher and its recovery after I/R is greater than that of normoxic rats. Indeed, left ventricular capillary densities of hypoxic hearts are 1.5 times those of normoxic hearts, without any apparent ventricular hypertrophy [Zhong et al. 2002]. Actually, increases in angiogenesis and coronary circulation might not only contribute to the myocardial protection conferred by chronic IHAH, but could also explain why the protection lasts much longer than that of classical preconditioning.

## 2. EFFECTS OF CYCLIC INTERMITTENT HYPOXIA ON MYOCARDIAL ISCHEMIC TOLERANCE

In contrast to the long cycles of IHAH relevant to high altitude physiology, normobaric short-cycle oscillations in inspired O<sub>2</sub> have been used to model pathological situations, such as OSA. Indeed, IH resulting from repetitive apneas appears to be the main causal factor in the pathogenesis of cardiovascular morbidity (systemic hypertension, coronary artery disease, and stroke) seen in OSA [Caples et al. 2007].

OSA patients experience repeated periods of hypoxia interspersed with normoxic interludes during 7–8 h (or as long as their sleep cycle lasts). The number of hypoxic episodes varies among subjects as well as their duration, which must last at least 10 s to be qualified as an apnea [Punjabi 2008].

The first animal model designed to mimic this pattern of IH was developed in the rat and showed that chronic exposure to cyclic IH can effectively reproduce the increase in blood pressure, sympathetic control, and ventilatory drive seen in OSA patients [Fletcher et al. 1992].

Since then, chronic cyclic IH has been extensively used to assess the pathophysiological repercussions of OSA (see the reviews of Fletcher 2001 and Neubauer 2001). However, the effects on myocardial ischemic tolerance have been explored only recently. The results show that adaptations to acute and chronic cyclic IH have contrasting effects on the response of the heart to I/R injury.

### 2.1 Acute cyclic IH

#### 2.1.1 Acute IH and delayed cardioprotection

A limited number of recent studies report that acute exposure to cyclic IH results in cardioprotection (Table 2). The ability of acute IH (5 cycles of 6% FiO<sub>2</sub> for 6 min interspersed by 6 min of normoxia) to prevent myocardial dysfunction and infarction was first demonstrated in mice submitted to an I/R sequence, 24 h later [Cai et al. 2003]. Subsequently, we investigated the influence of duration and depth of acute IH on infarct size development in the isolated rat heart, 24 h later [Beguin et al. 2005]. Rats were exposed to 1-min cycles of 40

s-hypoxia (10% FiO<sub>2</sub>) / 20 s-normoxia, during either 30 min or 4 h. We have shown that preconditioning by 4 h of acute IH with a minimal FiO<sub>2</sub> of 10% significantly reduces myocardial infarction (Figure 1) whereas a shorter 30-min exposure does not confer cardioprotection.

We also observed that exposure to 4 h of continuous hypoxia (10% FiO<sub>2</sub>) did not significantly affect infarct size development 24 h later [Beguín et al. 2005]. This is in contrast with previous studies in rats [Sasaki et al. 2002] and mice [Xi et al. 2002], reporting that continuous exposure to 10% FiO<sub>2</sub> for 4 h results in delayed cardioprotection. This discrepancy could be explained in the first case by the I/R model used (permanent left anterior descending coronary artery occlusion) and in the second, by species-specific susceptibility to infarction. Our study showed that, in the rat, two parameters appear to be critical for cardioprotection to occur following hypoxia exposure: duration but also intermittence, thus reoxygenation.

### 2.1.2. Mechanisms underlying the delayed myocardial effects of acute IH

Acute IH, with its repeated episodes of hypoxia and normoxia, resembles ischemic preconditioning, which promotes both early and delayed phases of protection. However, since IH appears to activate only delayed protection [Cai et al. 2003], particular focus has been placed on agents reportedly involved in the second window of ischemic preconditioning.

Among these agents, NO and K<sub>ATP</sub> channels are currently admitted to be involved, at least as triggers, in delayed ischemic preconditioning [Yellon and Downey 2003]. We have investigated the effects of L-NAME, a non-selective NOS inhibitor, and 5-HD, a selective mitochondrial K<sub>ATP</sub> blocker, by infusing them prior to I/R in isolated hearts from rats exposed to IH 24 h earlier [Beguín et al. 2007]. Using this simple but validated pharmacological approach we have been able to confirm a role for both NO and K<sub>ATP</sub> channels in mediating the delayed cardioprotection (Figure 1).

In the wake of studies showing that acute sustained hypoxia enhances iNOS expression in lung and heart [Gess et al. 1997], while chronic sustained hypoxia downregulates endothelial NOS expression in thoracic aorta [Toporsian et al. 2000], Xi et al. have investigated the implication of both NOS in acute IH. Using iNOS knockout mice, they have shown that iNOS is the only isoform involved and that it plays a role in triggering as well as mediating the delayed cardioprotection [Xi et al. 2002]. Indeed, we have recently confirmed that acute IH

activates the iNOS gene and that this is necessary to induce delayed myocardial preconditioning [Belaidi et al. 2007a].

We have also investigated the role of stress-activated kinases in triggering or mediating the cardioprotective effects of acute IH. Pharmacological inhibition of PKC, PI3K, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) was performed and their level of phosphorylation was measured. In this study, we have shown that the PI3K/Akt cascade was not involved in the acute IH-induced delayed cardioprotection while p38 MAPK and ERK1/2 acted as triggers and PKC as a mediator [Beguín et al. 2007].

Cai et al. have shown that acute IH could not induce delayed cardioprotection in hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) knockout mice [Cai et al. 2003]. This suggests that de novo gene synthesis under the transcriptional control of redox-sensitive transcription factors such as HIF-1 is necessary for the cardioprotection to occur. Although other transcription factors also mediate hypoxia-inducible gene expression, HIF-1 appears to play a critical role in the regulation of oxygen homeostasis in mammals. Moreover, various cardioprotective genes are up-regulated by HIF-1 in response to hypoxia, such as the vascular endothelial growth factor, EPO, heme oxygenase-1 and iNOS genes [Semenza 1999].

As mentioned earlier, iNOS induction is necessary to induce delayed myocardial preconditioning by acute IH. Using chromatin immunoprecipitation and pharmacological inhibition by low-dose cadmium we have shown that HIF-1 directly interacts with the iNOS gene promoter in myocardial extracts following acute IH and that prevention of this interaction abolishes the delayed cardioprotection [Belaidi et al. 2007a].

As for the other transcription factors involved, a recent study, using cardiac gene array analysis, has shown that acute IH in mice activates gene expression of antiapoptotic bcl-2 and bcl-x<sub>L</sub> proteins in the heart through GATA-4, a transcription factor implicated in the regulation of cardiac myocyte apoptosis [Park et al. 2007].

## 2.2 Chronic cyclic IH

As mentioned earlier, exposure to cyclic IH for several hours during consecutive days is an effective means to reproduce the cardiovascular alterations seen in OSA patients.

However, the duration, frequency, and severity of hypoxic episodes are critical factors determining whether chronic exposure to cyclic IH hypoxia has beneficial or harmful effects on the myocardium (Table 3).

### 2.2.1 Protocols of chronic cyclic IH and cardiac endpoints assessed

A first cardioprotective model was described in 2004, in dogs exposed during 20 days to a mild protocol of IH (8 cycles of 5-10 min of 10 % FiO<sub>2</sub> and 4 min normoxia). This induced a reduction in infarct size and prevented ventricular arrhythmias during coronary artery occlusion and reperfusion, in vivo [Zong et al. 2004]. The same model was also used to show a role of episodic  $\beta$ 1-adrenergic activation in the development of the cardioprotective effects observed [Mallet et al. 2006].

In contrast, we have shown that chronic cyclic IH can induce deleterious consequences using a more severe protocol probably more representative of the IH pattern seen in OSA. Thus, exposure of Wistar rats for 35 days (8h/day, 1-min cycles with 40 s of 5% FiO<sub>2</sub> and 20 s of normoxia) enhanced myocardial sensitivity to infarction after global I/R in isolated hearts (Figure 2) [Joyeux-Faure et al. 2005b]. In spontaneously hypertensive rats, we observed that chronic IH exposure for 14 days increased infarct size and enhanced the development of hypertension [Belaidi et al. 2007b].

Finally, a recent study, using a murine model (8 h/day, 4-min cycles with 2 min of 6% FiO<sub>2</sub> and 2 min of normoxia) reported that exposure to cyclic IH for 7 or 14 days induces an increase in infarct size and lactate deshydrogenase activity following I/R in the isolated heart. However, with a longer period of exposure (28 days), susceptibility to I/R was normalized, suggesting a protective adaptation to cyclic IH with time [Park and Suzuki 2007].

### 2.2.2 Molecular mechanisms underlying the myocardial response to chronic cyclic IH

Repetitive exposure to hypoxia results in increased chemoresponsiveness and transient adrenergic stimulation [Prabhakar et al. 2007], which can have both beneficial [Cohen et al. 1995 56] and deleterious [Schomig and Richardt 1990] effects on the myocardial response to I/R.

Thus, Mallet et al. have explained the cardioprotective effects induced by 20 days of cyclic IH in dogs subjected to coronary occlusion by an increase in sympathetic activity [Mallet et al. 2006]. In particular, repetitive  $\beta$ -adrenergic activation during the cyclic IH protocol, appeared to be involved since metoprolol, a  $\beta_1$ -adrenoreceptor antagonist, abolished the infarct sparing and antiarrhythmic effects. Whether a more intense stimulation could lead to deleterious consequences such as those observed with severe cyclic IH protocols remains to be determined.

Generation of vascular reactive oxygen species, promoted by chronic short-cycle IH, contributes to the development of hypertension in rats [Troncoso Brindeiro et al. 2007 75]. Regarding the myocardium, the increased susceptibility to I/R after 7 and 14 days of cyclic IH in mice was related to the level of myocardial lipid peroxidation and protein oxidation while the normalization of infarct size after 28 days of exposure was associated with an increase in thioredoxin ( $H_2O_2$  scavenger) activity [Park and Suzuki 2007].

Among the other consequences of chronic IH, an activation of the renin-angiotensin system has been shown to play a role in the development of hypertension in response to IH in rats, since AT1 antagonists prevent the rise in blood pressure [Fletcher 2001]. Various effects of angiotensin are detrimental in the process of myocardial I/R such as coronary vasoconstriction and increased noradrenaline release [Wang et al. 2002]. However, its implication in the increased myocardial sensitivity to ischemia induced by chronic IH has not yet been investigated.

Hypoxia is a powerful stimulus for the production of endothelin-1 (ET-1) by endothelial cells and cardiomyocytes; its expression is increased by hypoxia under the transcriptional control of HIF-1 [Yamashita et al. 2001]. Cyclic IH also has the ability to activate the ET-1 system and plasma ET-1 concentrations [Kanagy et al. 2001] and vascular reactivity to ET-1 [Allahdadi et al. 2005; Lefebvre et al. 2006] are increased along with the development of hypertension in rats. In spontaneously hypertensive rats after 14 days of cyclic IH, we have observed an increase in myocardial ET-1 and big ET-1 concentrations and an enhanced coronary vascular response to ET-1 leading to deleterious myocardial effects that could contribute to the increase in infarct size [Belaidi et al. 2007b]. Indeed, the endogenous release of ET-1 in the ischemic myocardium is known to contribute to the development of I/R injury [Pernow and Wang 1997].

## CLINICAL PERSPECTIVES AND FUTURE RESEARCH DIRECTIONS

The promotion of myocardial resistance to ischemic injury conferred by chronic IHAH or acute cyclic IH appears to be due to activation of protective pathways resembling those of ischemic and other forms of PC, namely stress-regulated kinases, nitric oxide, and mitochondrial  $K_{ATP}$  channels. In contrast to classic forms of PC, the resulting cardioprotection is exclusively delayed and appears dependent on de novo expression by transcription factors, in particular the redox-sensitive HIF-1, of cardioprotective genes such as the iNOS gene.

Another distinctive aspect of chronic IHAH, that clearly distinguishes it from ischemic PC, is that it confers a long-lasting cardioprotection that can persist several weeks after normoxic recovery [Neckar et al. 2004]. Whether, this is due to enhanced angiogenesis and improved coronary blood flow remains to be determined. In particular, the role of HIF-1 and angiogenic growth factors such as VEGF, one of its downstream target genes, should be explored.

Since IH exposure is easily feasible in the clinical setting, clinical applications should be considered to determine whether it could provide therapeutic modes of reducing the effects of noxious stimuli, such as ischemia during cardiac surgery.

In the case of chronic cyclic IH, the intensity and the frequency of hypoxic cycles appear to be key factors ultimately determining whether the response crosses the threshold from having protective value to pathology.

Thus, chronic cyclic IH can have beneficial effects when few daily cycles of moderate intensity are used. However, more severe protocols with chronic repetitive short cycles designed to reproduce the cyclic IH pattern seen in OSA patients, result in an increased susceptibility of the heart to infarction. This is of particular interest in the study of chronic-IH related pathologies such as OSA.

Indeed, the increased cardiovascular risk of OAS patients could be related in part to the decreased tolerance to myocardial I/R injury induced by chronic IH, as shown by a recent study reporting an unfavorable outcome following percutaneous coronary intervention in OSA patients with acute coronary syndrome [Yumino et al. 2007].

Recent experimental observations suggest that enhanced oxidative stress and endothelin system activation play important roles in the deleterious effects of chronic IH on the myocardium. Given that these alterations have also been reported in OSA [Lavie et al. 2004; Phillips et al. 1999], future clinical research should aim at investigating their contribution to the cardiovascular complications of OSA patients.

Finally, the triphasic time-course of the adaptation of the myocardium to chronic cyclic IH warrants further investigation. Indeed, the initial cardioprotection observed is replaced by an increased susceptibility to I/R that is normalized with prolonged exposure. This resembles the time-course of the disease in OSA where a paradoxical age-related decline in mortality is observed in spite of greater co-morbidities in older patients [Lavie and Lavie 2006].

In both experimental animals and man, activation of cardioprotective mechanisms sufficient to overcome the deleterious effects of chronic IH has been proposed to explain the normalization observed with prolonged exposure.

Definitive answers could be provided by a thorough investigation of the gene programs activated by chronic intermittent hypoxia and of their interplay in determining the final cardiovascular outcome.

## REFERENCES

- Allahdadi, K. J., B. R. Walker and N. L. Kanagy (2005). "Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension." *Hypertension* 45(4): 705-9.
- Asemu, G., F. Papousek, B. Ostadal and F. Kolar (1999). "Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel." *J Mol Cell Cardiol* 31(10): 1821-31.
- Asemu, G., J. Neckar, O. Szarszoi, F. Papousek, B. Ostadal and F. Kolar (2000). "Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats." *Physiol Res* 49(5): 597-606.
- Beguin, P. C., M. Joyeux-Faure, D. Godin-Ribuot, P. Levy and C. Ribuot (2005). "Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia." *J Appl Physiol* 99(3): 1064-9.
- Beguin, P. C., E. Belaidi, D. Godin-Ribuot, P. Levy and C. Ribuot (2007). "Intermittent hypoxia-induced delayed cardioprotection is mediated by PKC and triggered by p38 MAP kinase and Erk1/2." *J Mol Cell Cardiol* 42(2): 343-51.
- Belaidi, E., P. C. Beguin, P. Levy, C. Ribuot and D. Godin-Ribuot (2007a). "Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- Belaidi, E., B. Lefebvre, F. Stanke-Labesque, C. Ribuot, P. Levy and D. Godin-Ribuot (2007b). "Cardiovascular alterations induced by chronic intermittent hypoxia in spontaneously hypertensive rats." *J Mol Cell Cardiol* 42: S190-S218.
- Cai, Z., D. J. Manalo, G. Wei, E. R. Rodriguez, K. Fox-Talbot, H. Lu, J. L. Zweier and G. L. Semenza (2003). "Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury." *Circulation* 108(1): 79-85.
- Caples, S. M., A. Garcia-Touchard and V. K. Somers (2007). "Sleep-disordered breathing and cardiovascular risk." *Sleep* 30(3): 291-303.
- Cohen, M. V., R. S. Walsh, M. Goto and J. M. Downey (1995). "Hypoxia preconditions rabbit myocardium via adenosine and catecholamine release." *J Mol Cell Cardiol* 27(8): 1527-34.
- Ding, H. L., H. F. Zhu, J. W. Dong, W. Z. Zhu and Z. N. Zhou (2004). "Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C." *Life Sci* 75(21): 2587-603.

- Ding, H. L., H. F. Zhu, J. W. Dong, W. Z. Zhu, W. W. Yang, H. T. Yang and Z. N. Zhou (2005). "Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury." *Acta Pharmacol Sin* 26(3): 315-22.
- Dong, J. W., H. F. Zhu, W. Z. Zhu, H. L. Ding, T. M. Ma and Z. N. Zhou (2003). "Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression." *Cell Res* 13(5): 385-91.
- Fletcher, E. C., J. Lesske, R. Behm, C. C. Miller, 3rd, H. Stauss and T. Unger (1992). "Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea." *J Appl Physiol* 72(5): 1978-84.
- Fletcher, E. C. (2001). "Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure." *J Appl Physiol* 90(4): 1600-5.
- Gess, B., K. Schrickler, M. Pfeifer and A. Kurtz (1997). "Acute hypoxia upregulates NOS gene expression in rats." *Am J Physiol* 273(3 Pt 2): R905-10.
- Hightower, L. E. (1991). "Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity." *Cell* 66(2): 191-7.
- Hurtado, A. (1960). "Some clinical aspects of life at high altitudes." *Ann Intern Med* 53: 247-58.
- Joyeux-Faure, M., C. Arnaud, D. Godin-Ribuot and C. Ribuot (2003). "Heat stress preconditioning and delayed myocardial protection: what is new?" *Cardiovasc Res* 60(3): 469-77.
- Joyeux-Faure, M., D. Godin-Ribuot and C. Ribuot (2005a). "Erythropoietin and myocardial protection: what's new?" *Fundam Clin Pharmacol* 19(4): 439-46.
- Joyeux-Faure, M., F. Stanke-Labesque, B. Lefebvre, P. Beguin, D. Godin-Ribuot, C. Ribuot, S. H. Launois, G. Bessard and P. Levy (2005b). "Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart." *J Appl Physiol* 98(5): 1691-6.
- Kanagy, N. L., B. R. Walker and L. D. Nelin (2001). "Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension." *Hypertension* 37(2 Part 2): 511-5.
- Kolar, F. and B. Ostadal (2004). "Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia." *Physiol Res* 53 Suppl 1: S3-13.
- Kopecky, M. and S. Daum (1958). "[Adaptation of the myocardium to altitude anoxia.]" *Cesk Fysiol* 7(3): 218-9.
- Lavie, L., A. Vishnevsky and P. Lavie (2004). "Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea." *Sleep* 27(1): 123-8.

- Lavie, L. and P. Lavie (2006). "Ischemic preconditioning as a possible explanation for the age decline relative mortality in sleep apnea." *Med Hypotheses* 66(6): 1069-73.
- Lefebvre, B., D. Godin-Ribuot, M. Joyeux-Faure, F. Caron, G. Bessard, P. Levy and F. Stanke-Labesque (2006). "Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat." *Respir Physiol Neurobiol* 150(2-3): 278-86.
- Li, J., H. Zhang, W. Z. Zhu, Z. Yu, A. Guo, H. T. Yang and Z. N. Zhou (2007). "Preservation of the pHi during ischemia via PKC by intermittent hypoxia." *Biochem Biophys Res Commun* 356(2): 329-33.
- Mallet, R. T., M. G. Ryou, A. G. Williams, Jr., L. Howard and H. F. Downey (2006). "Beta1-Adrenergic receptor antagonism abrogates cardioprotective effects of intermittent hypoxia." *Basic Res Cardiol* 101(5): 436-46.
- McNicholas, W. T. and M. R. Bonsignore (2007). "Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities." *Eur Respir J* 29(1): 156-78.
- Meerson, F. Z., O. A. Gomzakov and M. V. Shimkovich (1973). "Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis." *Am J Cardiol* 31(1): 30-4.
- Meerson, F. Z., E. E. Ustinova and E. H. Orlova (1987). "Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia." *Clin Cardiol* 10(12): 783-9.
- Meerson, F. Z. and I. Malyshev (1989). "Adaptation to stress increases the heart resistance to ischemic and reperfusion arrhythmias." *J Mol Cell Cardiol* 21(3): 299-303.
- Moore-Gillon, J. C. and I. R. Cameron (1985). "Right ventricular hypertrophy and polycythaemia in rats after intermittent exposure to hypoxia." *Clin Sci (Lond)* 69(5): 595-9.
- Murry, C. E., R. B. Jennings and K. A. Reimer (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* 74(5): 1124-36.
- Neckar, J., O. Szarszoi, L. Koten, F. Papousek, B. Ost'adal, G. J. Grover and F. Kolar (2002). "Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats." *Cardiovasc Res* 55(3): 567-75.
- Neckar, J., B. Ostadal and F. Kolar (2004). "Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery." *Physiol Res* 53(6): 621-8.
- Neckar, J., I. Markova, F. Novak, O. Novakova, O. Szarszoi, B. Ost'adal and F. Kolar (2005). "Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic

- rat myocardium: involvement in cardioprotection." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(4): H1566-72.
- Neubauer, J. A. (2001). "Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia." *J Appl Physiol* 90(4): 1593-9.
- Park, A. M., H. Nagase, S. Vinod Kumar and Y. J. Suzuki (2007). "Acute intermittent hypoxia activates myocardial cell survival signaling." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(2): H751-7.
- Park, A. M. and Y. J. Suzuki (2007). "Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice." *J Appl Physiol* 102(5): 1806-14.
- Pernow, J. and Q. D. Wang (1997). "Endothelin in myocardial ischaemia and reperfusion." *Cardiovasc Res* 33(3): 518-26.
- Phillips, B. G., K. Narkiewicz, C. A. Pesek, W. G. Haynes, M. E. Dyken and V. K. Somers (1999). "Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure." *J Hypertens* 17(1): 61-6.
- Poupa, O., K. Krofta, J. Prochazka and Z. Turek (1966). "Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis." *Fed Proc* 25(4): 1243-6.
- Prabhakar, N. R., T. E. Dick, J. Nanduri and G. K. Kumar (2007). "Systemic, cellular and molecular analysis of chemoreflex-mediated sympathoexcitation by chronic intermittent hypoxia." *Exp Physiol* 92(1): 39-44.
- Punjabi, N. M. (2008). "The Epidemiology of Adult Obstructive Sleep Apnea." *Proc Am Thorac Soc* 5(2): 136-143.
- Ravingerova, T., J. Matejikova, J. Neckar, E. Andelova and F. Kolar (2007). "Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart." *Mol Cell Biochem* 297(1-2): 111-20.
- Sasaki, H., S. Fukuda, H. Otani, L. Zhu, G. Yamaura, R. M. Engelman, D. K. Das and N. Maulik (2002). "Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction." *J Mol Cell Cardiol* 34(3): 335-48.
- Schomig, A. and G. Richardt (1990). "The role of catecholamines in ischemia." *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 5: S105-12.
- Semenza, G. L. (1999). "Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 551-78.

- Toporsian, M., K. Govindaraju, M. Nagi, D. Eidelman, G. Thibault and M. E. Ward (2000). "Downregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after prolonged hypoxia in vivo." *Circ Res* 86(6): 671-5.
- Troncoso Brindeiro, C. M., A. Q. da Silva, K. J. Allahdadi, V. Youngblood and N. L. Kanagy (2007). "Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(5): H2971-6.
- Wang, Q. D., J. Pernow, P. O. Sjoquist and L. Ryden (2002). "Pharmacological possibilities for protection against myocardial reperfusion injury." *Cardiovasc Res* 55(1): 25-37.
- Xi, L., D. Tekin, E. Gursoy, F. Salloum, J. E. Levasseur and R. C. Kukreja (2002). "Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(1): H5-12.
- Yamashita, K., D. J. Discher, J. Hu, N. H. Bishopric and K. A. Webster (2001). "Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP." *J Biol Chem* 276(16): 12645-53.
- Yellon, D. M. and J. M. Downey (2003). "Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology." *Physiol Rev* 83(4): 1113-51.
- Yumino, D., Y. Tsurumi, A. Takagi, K. Suzuki and H. Kasanuki (2007). "Impact of obstructive sleep apnea on clinical and angiographic outcomes following percutaneous coronary intervention in patients with acute coronary syndrome." *Am J Cardiol* 99(1): 26-30.
- Zhang, Y., N. Zhong and Z. N. Zhou (2000). "Effects of intermittent hypoxia on action potential and contraction in non-ischemic and ischemic rat papillary muscle." *Life Sci* 67(20): 2465-71.
- Zhong, N., Y. Zhang, Q. Z. Fang and Z. N. Zhou (2000a). "Intermittent hypoxia exposure-induced heat-shock protein 70 expression increases resistance of rat heart to ischemic injury." *Acta Pharmacol Sin* 21(5): 467-72.
- Zhong, N., Y. Zhang, H. F. Zhu and Z. N. Zhou (2000b). "Intermittent hypoxia exposure prevents mtDNA deletion and mitochondrial structure damage produced by ischemia/reperfusion injury." *Sheng Li Xue Bao* 52(5): 375-80.
- Zhong, N., Y. Zhang, H. F. Zhu, J. C. Wang, Q. Z. Fang and Z. N. Zhou (2002). "Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance rat by adaptation to intermittent high altitude hypoxia." *Acta Pharmacol Sin* 23(4): 305-10.
- Zhu, H. F., J. W. Dong, W. Z. Zhu, H. L. Ding and Z. N. Zhou (2003). "ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury." *Life Sci* 73(10): 1275-87.

- Zhu, W. Z., Y. Xie, L. Chen, H. T. Yang and Z. N. Zhou (2006). "Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury." *J Mol Cell Cardiol* 40(1): 96-106.
- Zhuang, J. and Z. Zhou (1999). "Protective effects of intermittent hypoxic adaptation on myocardium and its mechanisms." *Biol Signals Recept* 8(4-5): 316-22.
- Zong, P., S. Setty, W. Sun, R. Martinez, J. D. Tune, I. V. Ehrenburg, E. N. Tkatchouk, R. T. Mallet and H. F. Downey (2004). "Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction." *Exp Biol Med (Maywood)* 229(8): 806-12.

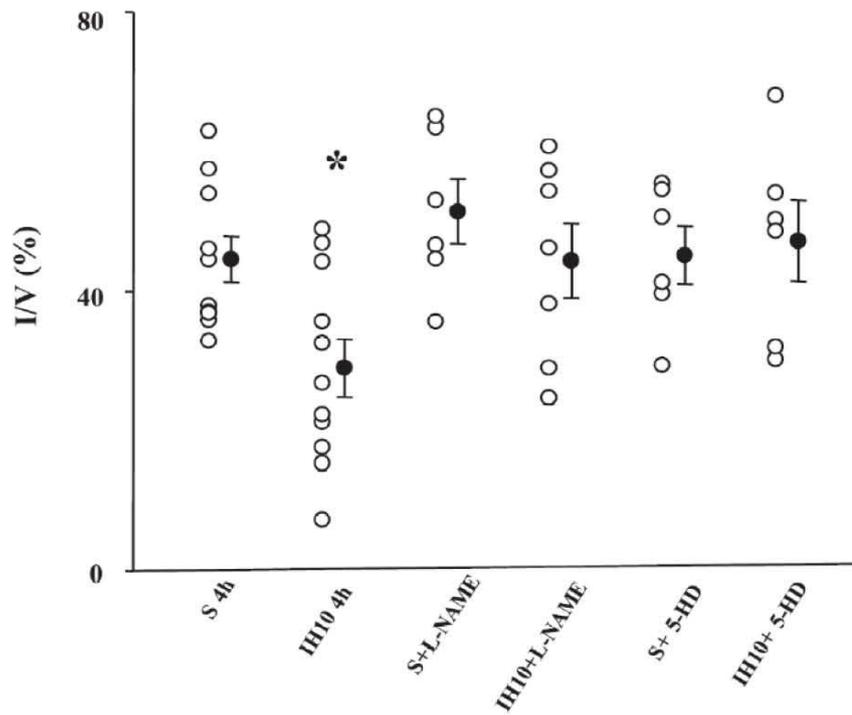


Figure 1. Infarct size (I/V) in isolated rat hearts assessed after a no-flow global ischemia (30 min)-reperfusion (120 min) sequence, 24 hours after exposure to acute intermittent hypoxia (IH10, 10% FiO<sub>2</sub>) or normoxia (S) during 4 h. The cardioprotection induced by IH was abolished by perfusion with the NO synthase inhibitor, L-NAME and the K<sub>ATP</sub> channel blocker, 5-HD prior to ischemia. Individual values and means ± SE are represented. \*P < 0.05 vs. the other groups. [Beguín et al. 2005] (Reprinted with permission from the Journal of Applied Physiology).

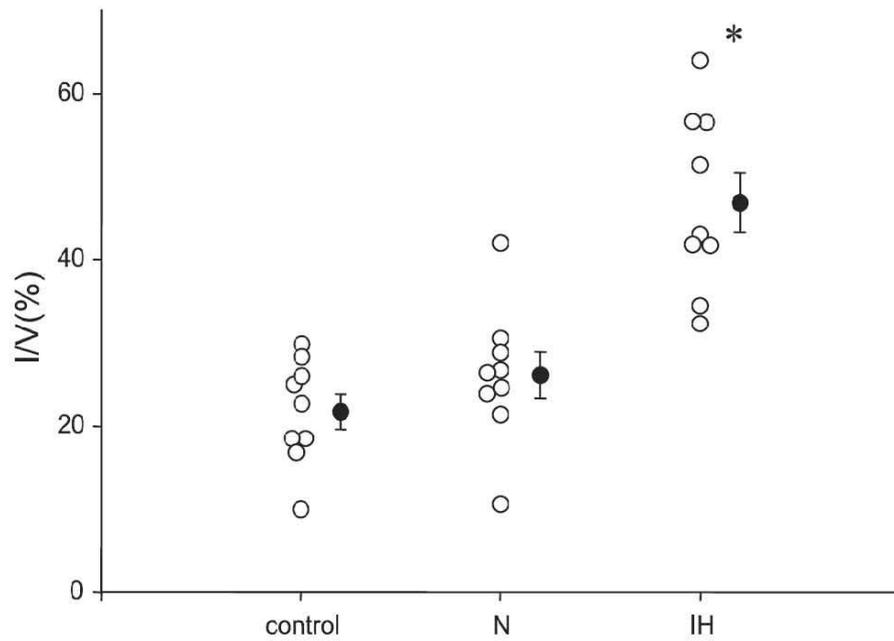


Figure 2. Infarct size (I/V) in isolated rat hearts assessed after a no-flow global ischemia (30 min)-reperfusion (120 min) sequence, after exposure to chronic intermittent hypoxia (IH), normoxia (N) or control conditions during 35 days. Individual values and means  $\pm$  SE are represented. \* $P < 0.001$  vs. the other groups. [Joyeux-Faure et al. 2005b] (Reprinted with permission from the Journal of Applied Physiology).

	Species	Altitude	Daily exposure	Total duration	Observed effects	Mechanisms
Asemu et al. 1999	Rat	5000 m	4 h	10 to 30 d	Antiarrhythmic effect	K <sub>ATP</sub> channel opening
Asemu et al. 2000	Rat	5000 or 7000 m	4 or 8 h	7 to 42 d	Anti/proarrhythmic effects depending on the stimulus	
Zhang et al. 2000	Rat	5000 m	6 h	14 to 42 d	Increased action potential duration	
Zhong et al. 2000a	Rat	5000 m	6 h	14 to 42 d	Antiarrhythmic effect	HSP70
Zhong et al. 2000b	Rat	5000 m	6 h	28 d	Prevention of mitochondrial damage	
Neekar et al. 2002	Rat	5000 m	8 h	24 or 32 d	Reduced infarct size Improved functional recovery	K <sub>ATP</sub> channel opening
Neekar et al. 2005	Rat	7000 m	8 h	24 or 32 d	Reduced infarct size	PKC $\delta$
Zhong et al. 2002	Rat	5000 m	6h	28 or 42 d	Increased capillary density and coronary flow	
Dong et al. 2003	Rat	5000 m	6 h	42 d	Reduced apoptosis	
Zhu et al. 2003	Rat	5000 m	6 h	42 d	Reduced infarct size Improved functional recovery	K <sub>ATP</sub> channel opening
Ding et al. 2004	Rat	5000 m	6 h	42 d	Improved functional recovery	PKC
Ding et al. 2005	Rat	5000 m	6 h	42 d	Improved functional recovery	iNOS
Li et al. 2007	Rat	5000 m	6 h	42 d	Intracellular pH preservation	PKC
Ravingerova et al. 2007	Rat	7000 m	8 h	25 or 30 d	Reduced infarct size	PI3K/Akt

**Table 1: Summary of the various models of chronic intermittent high altitude hypoxia. d: days.**

	Species	Cycles		Total duration	Observed effects	Mechanisms
		Hypoxia duration	$F_{iO_2}$ Normoxia duration			
Xi et al. 2002	Rat	4 h	10%	2 cycles	Reduced infarct size	iNOS
Cai et al. 2003	Mouse	6 min	6%	5 cycles	Reduced infarct size Improved functional recovery	HIF-1 $\alpha$
Beguín et al. 2005	Rat	40 s	10 %	4 h	Reduced infarct size	K <sub>ATP</sub> channel opening, NOS
Beguín et al. 2007	Rat	40 s	10 %	4 h	Reduced infarct size	p38 MAP kinase, Erk1/2, PKC
Park et al. 2007	Mouse	2 min	10%	5 cycles	Increased myocardial expression of antiapoptotic genes	GATA-4
Belaidi et al. 2007a	Rat	40 s	10 %	4 h	Reduced infarct size Improved functional recovery	HIF-1 $\alpha$ , iNOS

**Table 2: Summary of the various models of acute cyclic intermittent hypoxia.**

	Species	Cycles		Total duration	Observed effects	Mechanisms
		<i>Hypoxia duration</i>	<i>FiO<sub>2</sub></i>	<i>Normoxia duration</i>		
<b>Limited cycles of moderate hypoxia</b>						
Zong et al. 2004	Dog	5-10 min	9.5-10%	4 min	5-8 daily cycles 10 - 20 d	Reduced infarct size Antiarrhythmic effect
Mallet et al. 2006	Dog	5-10 min	9.5-10%	4 min	5-8 daily cycles 10 - 20 d	Reduced infarct size Antiarrhythmic effect
<b>Repetitive short cycles of severe hypoxia</b>						
Joyeux-Faure et al. 2005b	Rat	40 s	5 %	20 s	8 h/day 35 d	Increased infarct size
Park and Suzuki 2007	Mouse	2 min	6 %	2 min	8 h/day 7-14-28 d	Increased infarct size at 7 and 14 d Normalization at 28 d
Belaidi et al. 2007b	Rat	40 s	5 %	20 s	8 h/day 14 d	Increased infarct size Endothelin system activation

Table 3: Summary of the various models of chronic cyclic intermittent hypoxia. d: days.

## 1.3 Différents traitements protecteurs contre l'ischémie

### 1.3.1 L'EPO

Comme beaucoup d'autres tissus, le myocarde possède un système de protection endogène conduisant à une résistance à un stress ischémique après de brefs épisodes d'ischémie non toxique. Ce phénomène est appelé préconditionnement [80] et se déroule en deux phases : après quelques minutes d'ischémie, la réduction du métabolisme cellulaire induit une protection brève. Après plusieurs jours en revanche des protéines sont synthétisées, dont HIF-1 (hypoxia inducible factor) [81] qui régule les gènes de sensibilité à l'hypoxie. Ceux-ci agissent pour améliorer les performances du tissu après un stress métabolique. Parmi les différents gènes activés on retrouve celui de la NO synthase inductible (iNOS ou NOS2). Le NO, bien qu'étant un radical de l'oxygène, a une action vasodilatatrice qui pourrait jouer un rôle dans la protection contre l'ischémie en permettant une meilleure reperfusion des tissus pendant et après celle-ci. HIF-1 permet également d'activer le gène de l'érythropoïétine (EPO), qui pourrait elle aussi intervenir dans la protection contre l'ischémie.

Dans cette optique, l'EPO représente un grand intérêt cytoprotecteur pour les chercheurs, [82]. L'EPO est une hormone hématopoïétique produite par le rein en réponse à l'hypoxie. En se liant à son récepteur EPO-R présent sur les progéniteurs érythroïdes dans la moëlle osseuse, l'EPO permet leur survie en prévenant leur apoptose grâce à l'induction de la voie de signalisation STAT5 et du facteur de transcription GATA-1, nécessaire à l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-XL [83]. L'EPO stimule également la prolifération de ces progéniteurs et induit la différenciation vers des réticulocytes matures. Ceci favorise ainsi l'augmentation du nombre de globules rouges circulants, donc la capacité de transport de l'O<sub>2</sub>, dans le but de maintenir une oxygénation adéquate des tissus de l'organisme.

Chez l'Homme adulte, l'expression de l'EPO et de EPO-R a été mise en évidence dans d'autres organes que le rein tels que le cerveau et le cœur [84, 85], suggérant ainsi que l'EPO joue un rôle potentiel autre que la stimulation de l'érythropoïèse. L'EPO-R, quant à lui, s'exprime dans tous les tissus de l'organisme [86]. Ces observations ont conduit à mettre en évidence un effet protecteur majeur de l'EPO sur la survie de neurones soumis à une ischémie. Ainsi l'administration d'EPO avant, pendant, ou même jusqu'à quelques heures après l'occlusion

réversible d'une artère cérébrale moyenne permet de diminuer le volume de l'infarctus jusqu'à 75% [84].

L'expression de l'EPO-R fonctionnel dans le tissu cardiaque adulte chez le rat [85] suggère que l'effet cytoprotecteur de l'EPO peut également être étendu au cœur. C'est ce qui a été observé dans diverses espèces [87]. Des approches sur des cœurs isolés de rats et de lapins ont montré que la perfusion d'EPO avant un épisode d'ischémie améliore la récupération fonctionnelle du cœur à la reperfusion [88-90]. D'autres études ont porté sur l'administration d'EPO lors de la reperfusion. Ainsi il a été montré chez le lapin *in vivo*, que l'injection d'EPO après 30 min d'ischémie régionale permet de diminuer la taille de l'infarctus après 3 jours de reperfusion [91]. De même, chez le rat *in vivo*, l'injection d'EPO après 45 min d'ischémie régionale permet non seulement de diminuer la taille de l'infarctus mais également d'améliorer la récupération fonctionnelle cardiaque [92]. Sur le cœur isolé de rat, la perfusion d'EPO pendant 15 min immédiatement après 35 min d'ischémie régionale permet de diminuer la taille de l'infarctus [93].

Le potentiel cytoprotecteur de l'EPO est donc bien reconnu aujourd'hui et abondamment documenté dans la littérature.

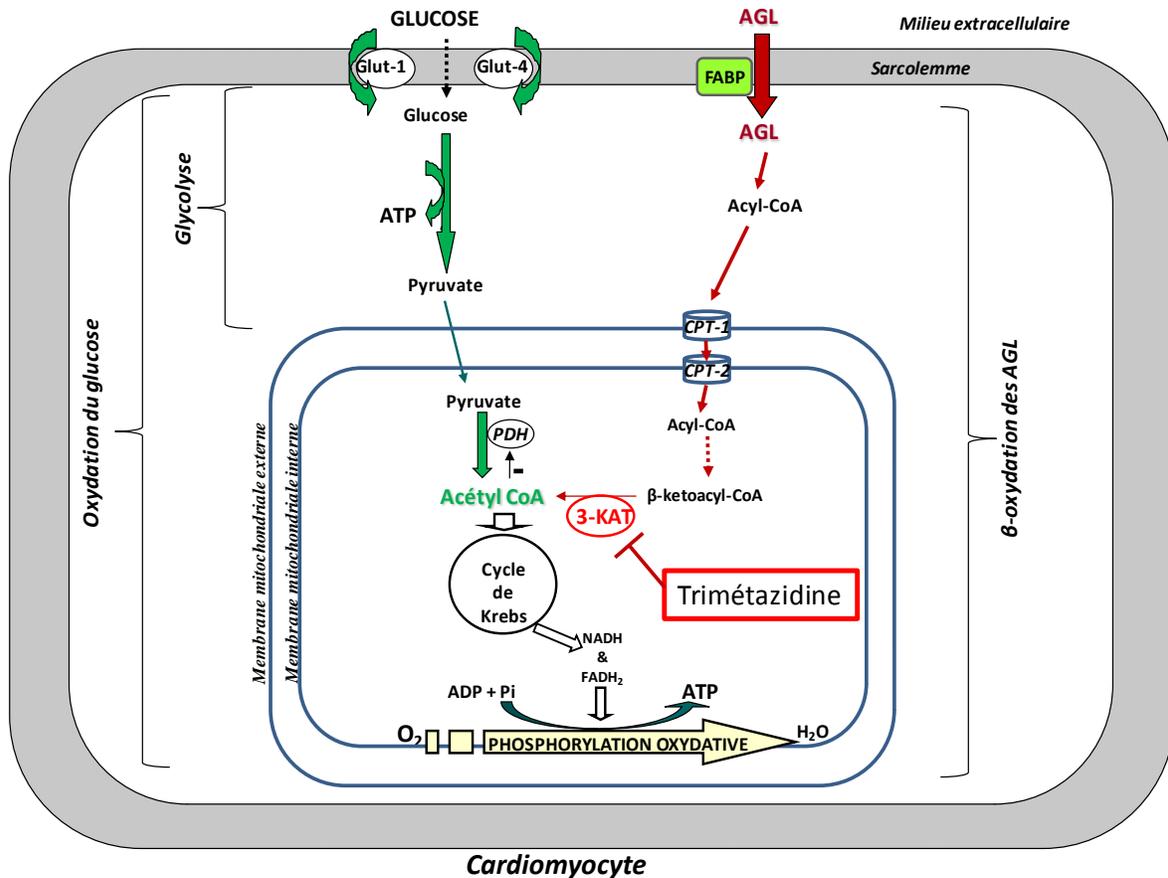
### **1.3.2 La trimétazidine**

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.1, dans le cœur normal, l'énergie pour la synthèse d'ATP par la mitochondrie provient principalement de deux voies aérobiques, la  $\beta$ -oxydation des AGL (2/3) et de l'oxydation du glucose (1/3). La glycolyse anaérobie peut également fournir une faible quantité d'ATP (de 1 à 3%) [1, 2]. Dans des conditions normales, le cœur consomme aussi du lactate. Cependant, en ischémie, la production mitochondriale d'ATP provenant de la voie aérobique diminue, en raison du manque d'O<sub>2</sub>, provoquant une stimulation de la glycolyse anaérobie. Le cœur ne consomme alors plus le lactate, mais en produit en excès. Chez le chien et le porc, il a été montré que lors d'une ischémie (réduction de 30 à 60% du flux sanguin coronaire), la voie de la  $\beta$ -oxydation des AGL continue de fournir la majorité de l'énergie produite [1, 2]. Ainsi, malgré le manque d'O<sub>2</sub>, le cœur continue d'utiliser cette voie pourtant très défavorable d'un point de vue

énergétique. Ceci va conduire à une accumulation d'acétyl-coA responsable de l'inhibition de la voie d'oxydation du glucose, et une accumulation de lactate.

L'inhibition de la voie d'oxydation du glucose par la voie de la  $\beta$ -oxydation en situation d'ischémie, favorisant ainsi les lésions d'I/R, a conduit à l'exploration de nouvelles cibles thérapeutiques agissant sur ces voies métaboliques.

La trimétazidine (TMZ, 1-[2,3,4-trimethoxybenzil] piperazine, dihydrochloride) est un agent cytoprotecteur anti-ischémique qui exerce son action au niveau cellulaire en inhibant la 3-kétoacyl coenzyme A thiolase (3-KAT). Cette enzyme mitochondriale joue un rôle majeur dans la voie de  $\beta$ -oxydation des AGL dans le myocarde, puisqu'elle est en bout de chaîne et permet la synthèse de l'acétyl-coA [94]. L'inhibition de la dernière étape de la  $\beta$ -oxydation des AGL induit une modification de la source d'acétyl-coA pour le cycle de Krebs, en favorisant la voie de l'oxydation du glucose. Ceci a pour conséquence une optimisation du métabolisme énergétique, puisque l'oxydation du glucose nécessite moins d'O<sub>2</sub> pour produire la même quantité d'ATP [95]. L'équilibre entre ces deux voies de production énergétique est un élément clé dans un contexte de privation d'O<sub>2</sub> tel que l'ischémie.



**Figure 5 : Rôle de la trimétazidine dans le métabolisme énergétique cardiaque**

La trimétazidine inhibe la 3-ketoacyl-CoA (3-KAT), l'enzyme finale du processus de  $\beta$ -oxydation. La PDH n'est plus inhibée par l'acétyl-CoA en provenance de la  $\beta$ -oxydation des AGL. La voie de l'oxydation du glucose est favorisée.

Ainsi la TMZ a pour rôle le maintien de l'homéostasie cellulaire en réduisant le métabolisme myocardique des AGL et en augmentant celui du glucose, permettant ainsi de limiter l'acidose et les surcharges calcique et sodique. Le taux intracellulaire d'ATP est maintenu, les fonctions mitochondriales préservées. La TMZ agit également sur la production d'ERO, puisqu'au moment de la reperfusion, on observe chez le rongeur la diminution du taux de malonedialdéhyde (MDA), un index de la peroxydation lipidique causée par les ERO générés à la reperfusion [96], ainsi qu'une augmentation de la superoxide dismutase (SOD) [97]. Les membranes plasmiques sont donc protégées, limitant le phénomène d'apoptose à la reperfusion. La protection conférée par la TMZ serait également due à son effet sur la

dysfonction endothéliale : chez le rat, la TMZ améliore la récupération post-ischémique du cœur isolé travaillant en préservant l'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS ou NOS3) [98]. Chez l'homme, la TMZ permet une amélioration de la relaxation endothélium-dépendante chez les insuffisants cardiaques [99]. Là encore, cet effet bénéfique serait dû à ses propriétés anti-oxydantes.

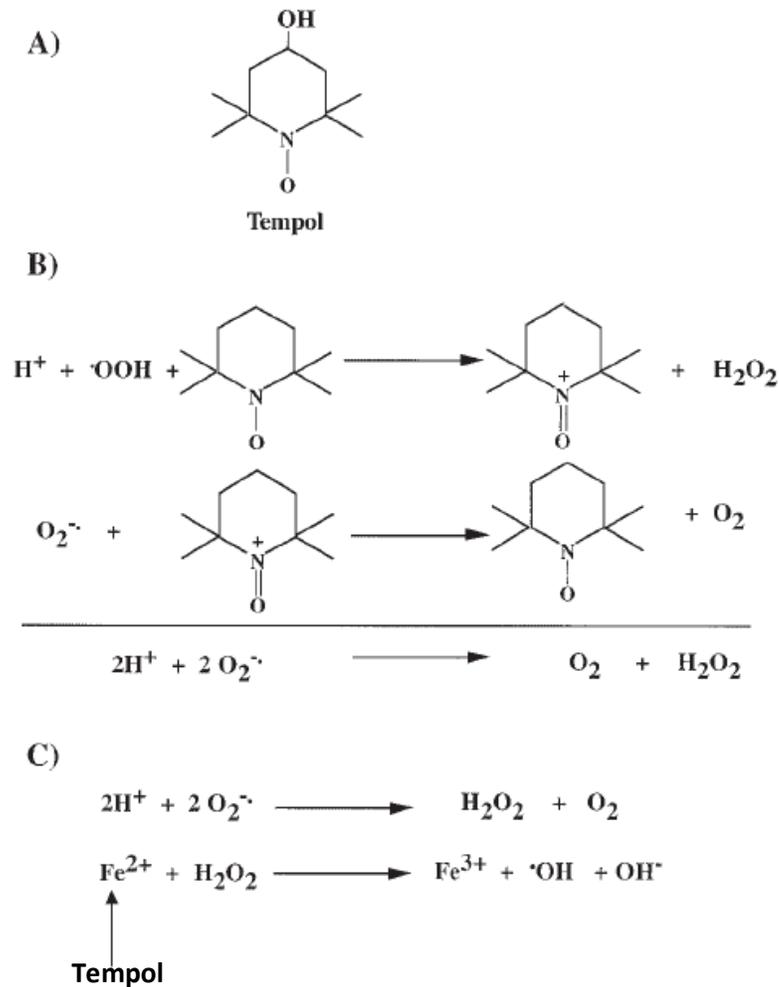
La TMZ protège également le cœur post-ischémique en empêchant le recrutement des neutrophiles chez le lapin [100] et chez le rat [101].

La TMZ est un agent anti-ischémique reconnu, utilisée aujourd'hui en clinique dans le traitement prophylactique de la crise d'angine de poitrine.

### **1.3.3 Le tempol**

Le tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetraméthyl-piperidine-1-oxy) fait partie de la famille des nitroxydes qui sont des radicaux libres stables et de puissants antioxydants. Ils protègent contre la toxicité des ERO autant *in vitro* que *in vivo* [102], pouvant prévenir les dommages causés par le stress oxydant [103, 104].

Le tempol mime les effets de la superoxyde dismutase (SOD) [105], en réduisant l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), comme illustré par la figure suivante.



**Figure 6 : Propriétés chimiques du tempol, d'après Rak et al, 2000 [106].**

(A) Structure chimique du tempol. (B) Réaction du tempol avec  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , montrant le mécanisme de réduction du superoxyde. Le bilan final de la réaction est identique à celui de la réduction de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  par la SOD. (C) Réaction de Haber-Weiss aboutissant à la production du radical hydroxyl. Le tempol oxyde le fer  $\text{Fe}^{2+}$ , empêchant ainsi la seconde étape de cette réaction (réaction de Fenton).

A la différence de la SOD, le tempol est perméable aux membranes biologiques, et ne requière pas la présence d'ions métalliques pour agir [107], et peut donc prévenir les effets délétères de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  produit au niveau intracellulaire.

Plusieurs études ont mis en évidence les effets protecteurs de cette molécule, in vivo et in vitro. Ainsi, un traitement de deux semaines par le tempol diminue la PAM chez le rat SHR [108], ainsi que chez le rat Sprague Dawley exposé à une HI chronique eucapnique [68]. Le prétraitement de cellules myocardique par du tempol atténue les altérations de la chaîne de

respiration mitochondriale induite par la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Administré au moment de la reperfusion, le tempol réduit aussi la taille de l'infarctus après une ischémie régionale causée par l'occlusion de l'artère coronaire ascendante gauche, chez le rongeur (rat et lapin) *in vivo* [109]. On observe le même phénomène sur cœur isolé de rat, reperfusé avec du tempol [109].

Les propriétés antioxydantes du tempol en font donc un agent anti-ischémique efficace.

#### **1.3.4 La mélatonine**

La mélatonine, souvent appelée hormone du sommeil, est surtout connue comme étant l'hormone centrale de régulation des rythmes chronobiologique chez tous les mammifères. Elle est aujourd'hui utilisée en clinique dans le traitement à court terme de l'insomnie primaire.

Cette neurohormone est synthétisée à partir d'un neurotransmetteur, la sérotonine, qui dérive elle-même du tryptophane, un acide aminé essentiel. Elle est excrétée dans le sang par la glande pinéale, ou épiphyse, de manière circadienne, et régule de nombreuses fonction neuroendocrines et physiologiques [110]. Récemment il a été démontré chez le rat que différents tissus, incluant le thymus, la rate, le foie, les reins et le cœur, ont la « machinerie » nécessaire pour synthétiser de la mélatonine [111]. Une synthèse endogène de mélatonine suggère un rôle physiologique potentiel pour cette hormone dans ces différents tissus.

La mélatonine est connue depuis de nombreuses années pour ses capacités anti-oxydantes vis a vis par exemples des radicaux péroxynitrites, hydroxyles et peroxydes [112-114]. Cette hormone a aussi la capacité d'activer des enzymes anti-oxydantes et de moduler leur expression en interagissant spécifiquement avec des sites de régulation géniques [115, 116]. Ainsi, la mélatonine est efficace contre la production d'ERO dans de nombreuses conditions de stress telles que l'I/R. En effet il a été précédemment montré par notre équipe que la mélatonine peut prévenir les lésions d'I/R dans le cœur de rat isolé, en diminuant la survenue des arythmies de reperfusion et la taille de l'infarctus [117].

Des études récentes ont montré que les effets cytoprotecteurs de la mélatonine sont en partie dus à son action au niveau mitochondrial [118]. En effet, Petrosillo et al. [119] ont montré que la mélatonine protège le cœur en inhibant l'ouverture du mPTP, un acteur majeur dans les lésions de reperfusion du myocarde [15]. De plus, la mélatonine est aussi capable de diminuer

le taux de peroxydation lipidique et de préserver l'activité des complexes I et III de la chaîne de respiration mitochondriale, après I/R du cœur de rat [120]. Enfin, cette hormone prévient aussi la génération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et la peroxydation de la cardiolipine, et protège directement la chaîne de transport des électrons mitochondriale des dommages oxydants [121].

La mélatonine, par ses propriétés antioxydantes et cytoprotectrices, est donc considérée comme un agent cardioprotecteur reconnu, vis-à-vis d'une I/R.

## **2 OBJECTIFS DE CE TRAVAIL**

## **2.1 Protection contre l'ischémie-reperfusion**

Depuis les 20 dernières années, des progrès considérables ont été faits pour améliorer les techniques de thrombolyse et d'angioplastie, permettant de réduire la mortalité due à l'infarctus, en favorisant la reperfusion de l'artère responsable de la nécrose.

Aujourd'hui, l'un des enjeux de la thérapeutique consiste à développer de nouveaux traitements afin de protéger et de limiter la dégénérescence des tissus cardiaques endommagés après une ischémie suivie d'une reperfusion, suite à un infarctus du myocarde ou une chirurgie nécessitant la mise en place d'une circulation extracorporelle avec arrêt du cœur.

Le premier objectif de cette thèse a donc été d'étudier les effets cardioprotecteurs de l'EPO vis-à-vis d'une I/R. Lorsqu'elle est administrée de façon répétée, l'EPO induit des effets physiologiques importants, notamment sur l'augmentation de l'hématocrite. Nous avons donc cherché à déterminer une dose d'EPO efficace contre les lésions d'I/R, en administration unique, sur un modèle de cœur isolé de rat, afin de s'affranchir de ses effets hématologiques ou sur d'autres organes et d'évaluer son action propre sur le myocarde.

Pour cela, nous avons réalisé l'étude des effets de la perfusion de différentes doses d'EPO immédiatement avant ou après la survenue d'une ischémie, afin d'évaluer l'impact de ces traitements sur la taille de l'infarctus et les paramètres hémodynamiques [79].

## **2.2 Protection contre les conséquences cardiovasculaires délétères induites par l'HI et étude des mécanismes impliqués.**

Nous avons vu précédemment que le SAOS est associé à une augmentation de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaires, notamment à cause d'une sensibilité accrue à l'infarctus. En effet, chez les patients atteints de SAOS, on observe une majoration des lésions d'I/R, provoquée par la composante HI.

Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous avons étudié expérimentalement la sensibilité à l'I/R, chez des animaux soumis au modèle d'HI développé dans notre laboratoire. Ainsi, nous avons montré précédemment que l'exposition de rats à l'HI pendant 14 ou 35 jours modifie la tolérance myocardique à l'I/R en augmentant la taille de l'infarctus [58, 60].

Le second objectif de cette thèse a donc été d'essayer de prévenir l'aggravation de la sensibilité à l'I/R induite par l'HI, par l'utilisation de différents agents anti-ischémiques.

Nous avons aussi cherché à mieux caractériser les mécanismes impliqués dans ces effets délétères de l'HI.

Nous avons tout d'abord recherché si l'effet cardioprotecteur de l'EPO était applicable suite à une exposition à l'HI. Ayant précédemment déterminé une dose cardioprotectrice efficace d'EPO, nous avons alors recherché si cette dose d'EPO était aussi capable de prévenir les lésions ischémiques aggravées induites par l'HI [79].

Nous avons aussi émis l'hypothèse qu'une altération du métabolisme énergétique provoquée par l'HI pourrait être à l'origine d'une baisse du rendement énergétique, causée par une moins bonne utilisation de l'O<sub>2</sub> et donc une synthèse d'ATP moins efficace. Dans cette optique, nous avons étudié chez le rat soumis ou non à l'HI, les effets d'un traitement chronique par la TMZ sur la taille de l'infarctus mesurée après une I/R sur cœur isolé.

Il semble aussi que le stress oxydant soit impliqué dans les effets cardiovasculaires délétères induits par l'HI. Nous avons donc émis l'hypothèse que le tempol et la mélatonine, de par leurs propriétés anti-oxydantes, seraient aussi capables de prévenir les effets délétères induit par l'HI, c'est pourquoi nous avons étudié ses effets sur la sensibilité à l'infarctus après I/R sur cœur isolé de rat soumis à l'HI.

Le mode d'action de la TMZ, du tempol et de la mélatonine permettant une administration sur le long terme, nous avons choisi d'administrer ces agents de manière chronique pendant les 14 jours d'exposition à l'HI.

Ainsi, l'ensemble de ces études ont eu pour objectif de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans les effets cardiovasculaires délétères induits par l'HI et d'essayer de les prévenir. À terme, cela pourrait permettre de déterminer un traitement accompagnant la PPC, ou même pouvant s'y substituer, améliorant considérablement le confort de vie des patients et réduisant le risque cardiovasculaire induit par le SAOS.

### **3 MATRIELS ET METHODES**

## **3.1 Matériel biologique**

### **3.1.1 Animaux**

Les animaux exposés à l'HI sont des rats mâles adultes de souche Wistar (Elevage Janvier, Le Genest St Isle, Mayenne, France) âgés de 7-8 semaines (275-350 g). Ils sont hébergés au sein de la plate-forme de Haute Technologie Animale (Institut Jean Roget, Grenoble, France), dans des conditions constantes de température et d'humidité en cycles de 12 h de jour/12 h de nuit avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les recommandations du « Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » publiées par l' « US National Institutes of Health » (NIH Publication No.85-23, revised 1996) ont été respectées dans ces expérimentations qui ont été approuvées par le comité éthique local de la Direction des Services Vétérinaires de l'Isère (France).

### **3.1.2 Traitements aigus et chroniques**

#### **3.1.2.1 Perfusion d'érythropoïétine :**

Les cœurs isolés sont perfusés avec de l'époetin beta, NeoRecormon<sup>®</sup> (Laboratoires Roche) qui est une EPO recombinante humaine (EPOrh). L'EPOrh est administrée dans le liquide de perfusion, soit au cours de la stabilisation pendant 10 min, soit au début de la reperfusion pendant 15 min. Les cœurs contrôles sont perfusés avec du liquide de perfusion tout au long du protocole.

*Première partie: étude des effets de l'EPO sur les lésions d'ischémie-reperfusion*

Six groupes expérimentaux sont étudiés (n = 8 par groupe):

- groupe contrôle C : cœurs perfusés par du liquide de Krebs-Henselheit durant tout le protocole

- groupes EPO S : cœurs recevant de l'EPOrh pendant 10 min à la fin de la stabilisation aux doses respectives de 0,5 (EPO S0,5U) ; 5 (EPO S5U) et 10 U.ml<sup>-1</sup> (EPO S10U).

- groupes EPO R : cœurs recevant de l'EPOrh durant les 15 premières minutes de la reperfusion aux doses respectives de 5 (EPO R5U) et 10 U.ml<sup>-1</sup> (EPO R10U).

Ces doses d'EPOrh ont été choisies en accord avec la littérature [88-90]. Les différentes dilutions d'EPOrh sont faites dans du liquide Krebs-Henseleit.

### *Deuxième partie: étude des effets de l'EPO sur les lésions ischémiques après une HI aiguë*

Les rats de chaque groupe sont exposés soit à l'HI aiguë, soit à la normoxie, durant 4 h. Vingt-quatre heures après la fin de l'exposition, la sensibilité à l'infarctus est évaluée par réalisation d'une séquence d'ischémie-reperfusion sur cœur isolé, perfusé ou non par de l'EPOrh.

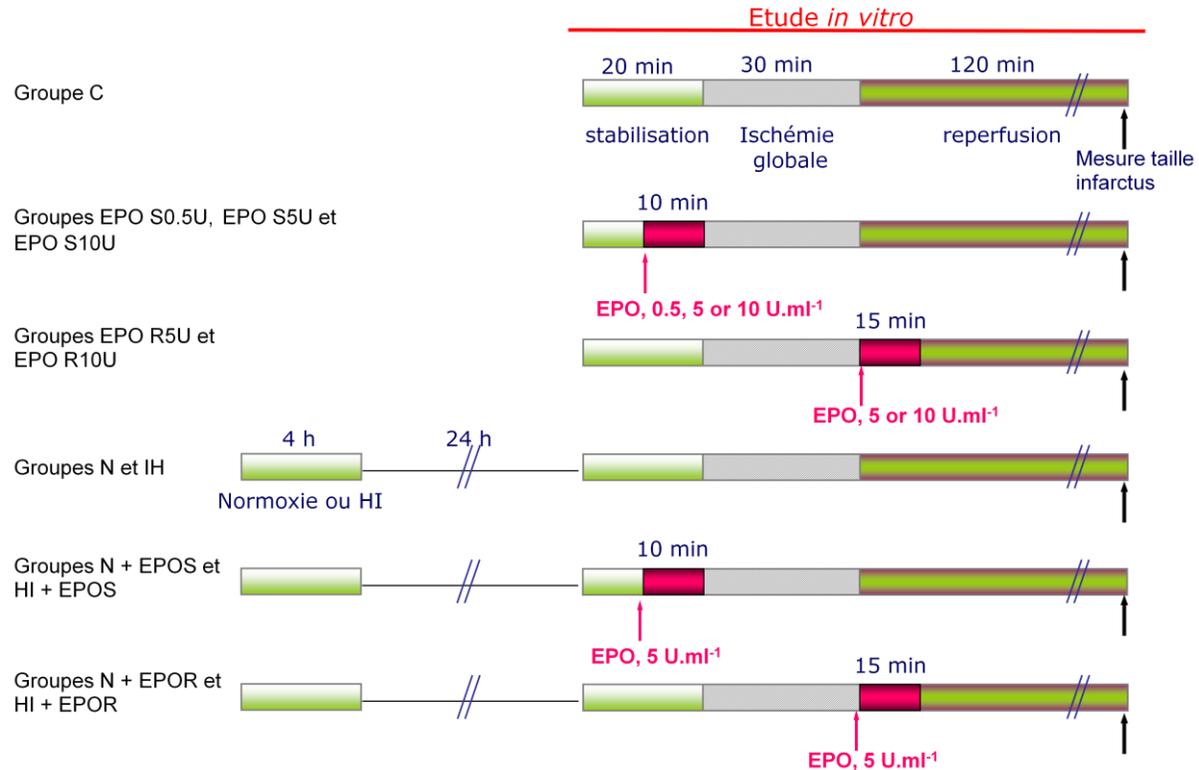
Six groupes expérimentaux sont étudiés (n = 7 par groupe) :

- 2 groupes contrôles, dans lesquels les animaux sont exposés à 4 h de normoxie ou d'HI et dont les cœurs sont isolés 24 h plus tard et perfusés avec du liquide de Krebs-Henseleit durant tout le protocole (groupes N et HI)

- 2 groupes N et HI : animaux N et HI dont les cœurs sont perfusés par de l'EPOrh pendant 10 min à la fin de la stabilisation, à la dose 5 U.ml<sup>-1</sup> (groupes N+EPOS et HI+EPOS)

- 2 groupes N et HI : animaux N et HI dont les cœurs sont perfusés par de l'EPOrh durant les 15 premières minutes de la reperfusion à la dose 5 U.ml<sup>-1</sup> (groupes N+EPOR et HI+EPOR)

Les 12 groupes expérimentaux sont représentés dans la figure 7.



**Figure 7 : Schéma expérimental de l'administration d'EPOrh chez le rat.**

### 3.1.2.2 Administration chronique de trimétazidine, tempol et mélatonine

Ces traitements sont administrés quotidiennement, pendant toute la durée de l'exposition à l'HI ou à la normoxie, soit pendant 14 jours.

#### *Traitement par la trimétazidine*

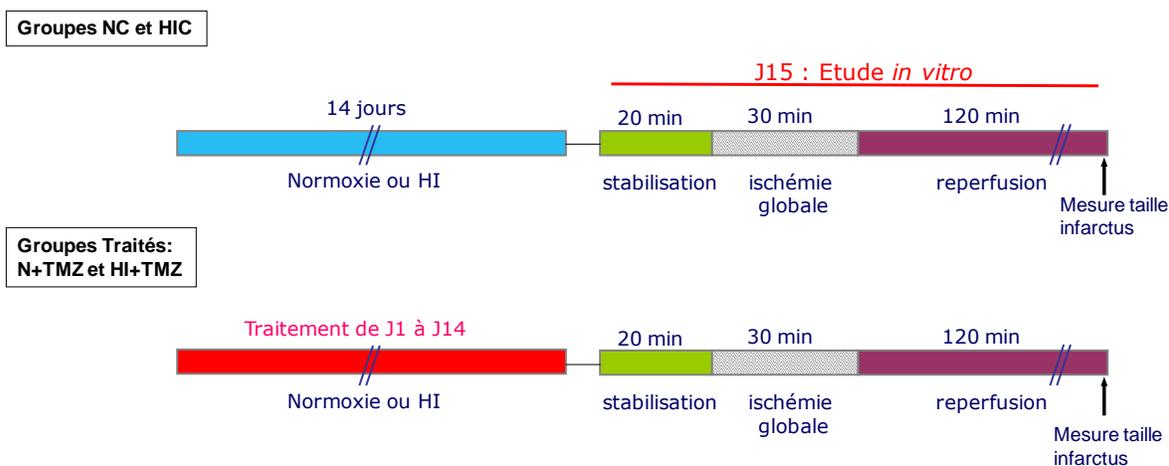
Les rats traités reçoivent de TMZ de manière concomitante à l'exposition à l'HI ou à la normoxie, à la dose de 10 mg/j, incorporée à leur alimentation. Cette dose a été adaptée de la littérature [122]. La TMZ étant sensible à la lumière, les croquettes sont préparées chaque jour et la quantité de TMZ incorporée dans chaque ration est calculée en fonction de la prise alimentaire journalière des rats (40 g/j pour les rats normoxiques et 25 g/j pour les rats hypoxiques) afin que chaque rat consomme quotidiennement 10 mg de TMZ. Les animaux

contrôles reçoivent des croquettes préparées de la même manière que précédemment, mais sans TMZ.

Quatre groupes expérimentaux sont étudiés (n = 8 par groupe) :

- 2 groupes contrôles, dans lesquels les rats reçoivent de la nourriture classique pendant les 14 jours de normoxie ou d'HI (groupes NC et HIC).
- 2 groupes traités, dans lesquels les rats reçoivent de la nourriture additionnée de TMZ pendant les 14 jours de normoxie ou d'HI (groupes N+TMZ et HI+TMZ).

Dans ces 4 groupes, les rats sont sacrifiés le lendemain du 14<sup>ième</sup> jour d'exposition. Le cœur est prélevé et perfusé selon le modèle de Langendorff. Les groupes expérimentaux sont représentés dans la figure 8.



**Figure 8 : Schéma expérimental de l'administration de TMZ chez le rat.**

#### *Traitements par le tempol et la mélatonine*

Ces deux traitements sont administrés dans l'eau de boisson des rats, tout au long de la période d'exposition à l'hypoxie ou à la normoxie (soit 14 jours). Le tempol et la mélatonine étant sensibles à la lumière, les biberons utilisés sont opaques et la solution eau + traitement est changée tous les jours.

Le tempol (Sigma-Aldrich, ref 176141) est administré à la concentration de 1mM. Cette dose a déjà été utilisée dans une étude antérieure [68].

La mélatonine (Sigma-Aldrich, ref M5250) est administrée à la dose de 100 mg/l. Cette dose a été adaptée de la littérature [123].

Six groupes expérimentaux sont étudiés :

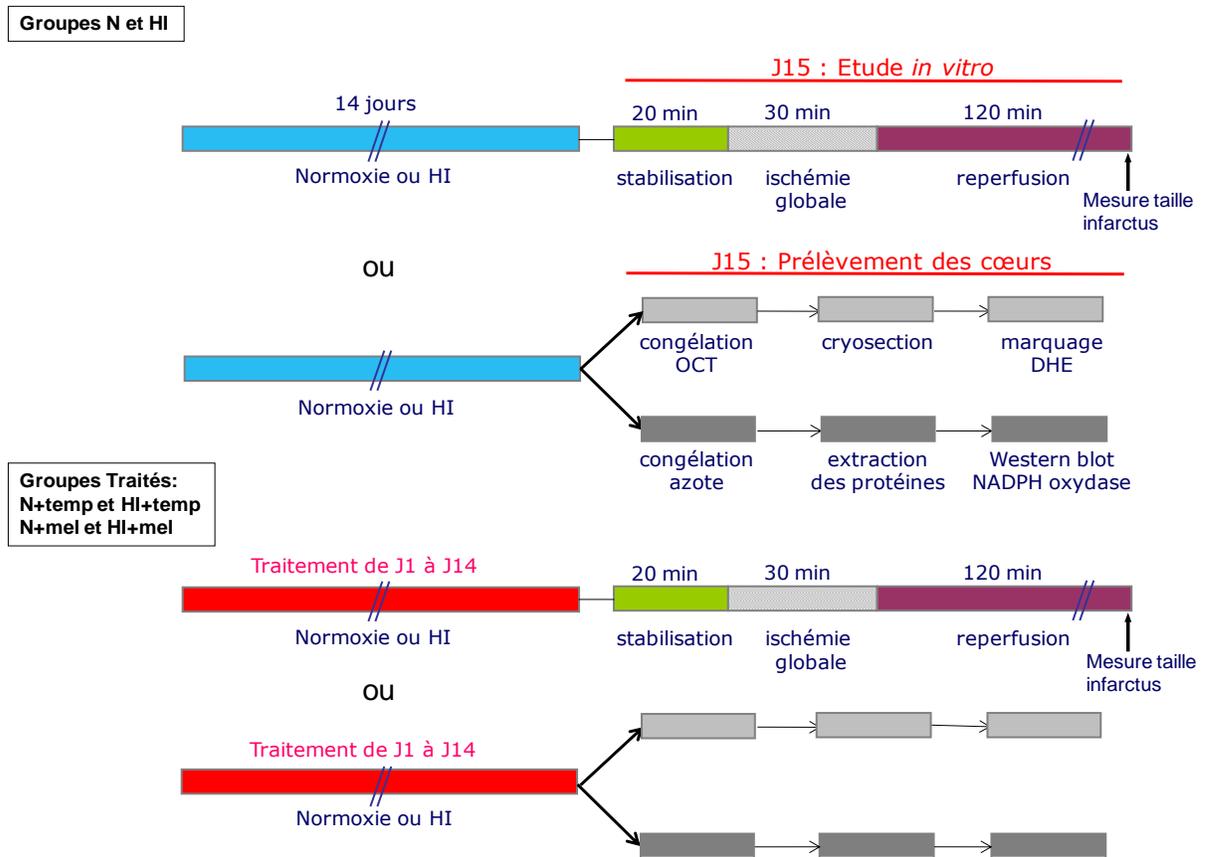
- 2 groupes (n = 8 par groupe) où les animaux reçoivent la mélatonine pendant les 14 jours d'exposition à la normoxie ou à l'HI (groupes N+mel et HI+mel).

- 2 groupes (n = 11 par groupe) où les animaux reçoivent le tempol pendant les 14 jours d'exposition à la normoxie ou à l'HI (groupes N+temp et HI+temp).

Une partie des animaux est utilisée pour le protocole de cœur isolé (n = 7 par groupe). L'autre partie sert aux mesures de stress oxydant (n = 4 par groupe).

- 2 groupes normoxiques et hypoxiques contrôles (n = 23 par groupe) dans lesquels les animaux reçoivent de l'eau normale. Une partie des cœurs est utilisée pour le protocole de cœur isolé (n = 19 par groupe). L'autre partie sert aux mesures de stress oxydant (n = 4 par groupe).

Dans ces 6 groupes, les rats sont sacrifiés le lendemain du 14<sup>ième</sup> jour d'exposition. Le cœur est prélevé soit pour les mesures de stress oxydant, soit perfusé selon le modèle de Langendorff. Ces 6 groupes expérimentaux sont représentés dans la figure 9.



**Figure 9 : Schéma expérimental de l'administration de tempol et mélatonine chez le rat.**

## 3.2 Stress hypoxique

### 3.2.1 Dispositif à hypoxie

Le dispositif d'exposition à l'HI actuellement utilisé au laboratoire permet d'exposer les animaux au sein de leur cage de stabulation classique. L'hypoxie est obtenue par un enrichissement du milieu en azote, à pression barométrique constante, ce qui correspond à une hypoxie normobarique. Le mélange air + azote (hypoxie) ou air seul (normoxie) est distribué dans les cages par des électrovannes dont l'ouverture et la fermeture sont commandées de façon électronique par un système de pilotage informatisé, dont le

développement a été réalisé au sein du laboratoire en collaboration étroite avec un partenaire industriel (Entreprise André Cros S.A., France) (Figure 10).

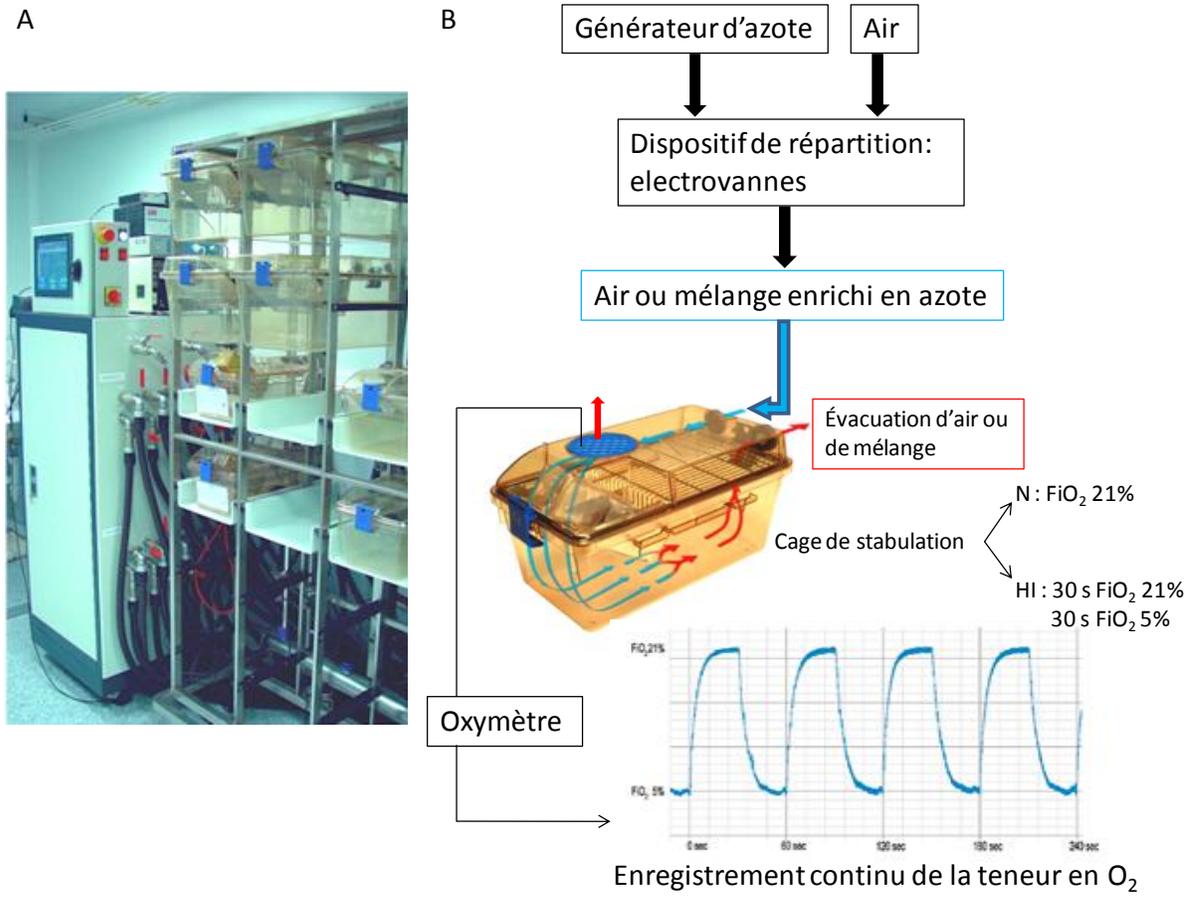
Après une semaine de stabulation, les rats sont aléatoirement soumis à la normoxie (groupes N) ou à l'hypoxie intermittente (groupes HI).

Le stimulus d'HI utilisé est le suivant : cycle de 1 min, 30 s de normoxie ( $FiO_2 = 21\%$ ) et 30 s d'hypoxie ( $FiO_2 = 5\%$ ). Un cycle caractéristique est présenté sur la figure 11.

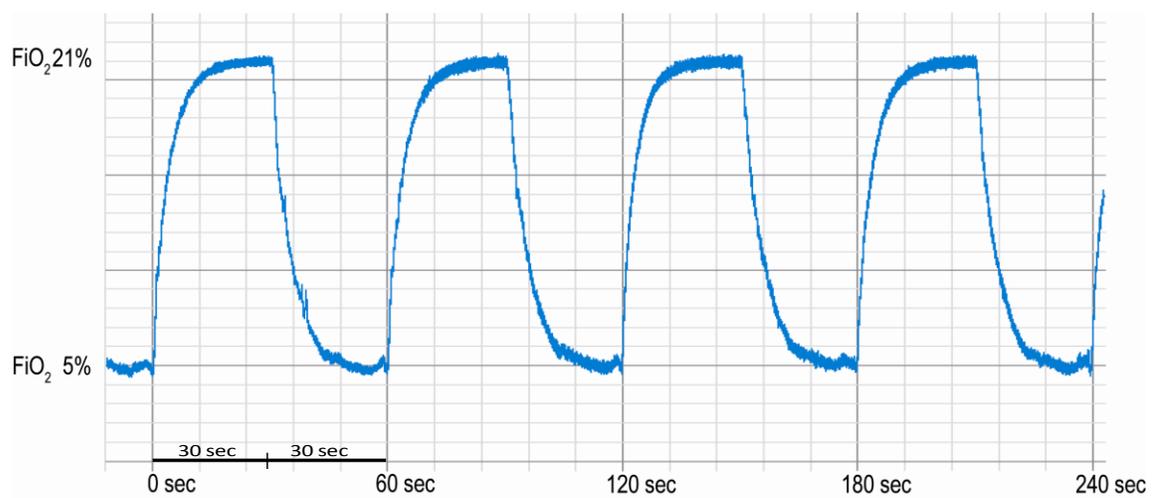
Les animaux subissant une HI chronique sont exposés à ces cycles répétés, 8 h par jour, et ce pendant 14 jours. Ceux subissant une HI aiguë sont exposés à ces mêmes cycles, pendant 4 h la veille de leur sacrifice. Les animaux témoins (groupe normoxique) sont soumis aux mêmes conditions environnementales où l'ouverture et la fermeture des électrovannes n'engendrent que la pénétration d'air à 21% de  $FiO_2$ .

L'enregistrement en continu de la teneur en oxygène des cages est réalisé à l'aide d'un oxymètre (ML-206, AD Instrument).

Il faut préciser que 2 types de dispositifs ont été utilisés lors de la réalisation des études présentées dans ce manuscrit. En effet, un ancien dispositif à hypoxie dans lequel les animaux étaient exposés dans des enceintes individuelles en plexiglas, en subissant des cycles d'une minute découpés en 40 s d'hypoxie suivies de 20 s de normoxie a permis d'obtenir les premiers résultats (étude sur l'EPO). Puis le dispositif actuellement utilisé au laboratoire, décrit ci-dessus, a été utilisé pour obtenir les résultats suivants (études sur la TMZ, le tempol et la mélatonine). Cependant, aucune différence n'a été observée quant aux résultats sur les effets cardiovasculaires induit par l'HI, selon le dispositif utilisé.



**Figure 10 : (A) Dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente. (B) Représentation schématique du fonctionnement du dispositif**



**Figure 11 : Signal de  $FiO_2$  enregistré dans une cage pendant l'exposition à l'HI.**

### **3.3 Mesure des paramètres hémodynamiques**

#### **3.3.1 Mesure du poids des animaux**

Afin de contrôler leur prise de poids, les animaux sont pesés immédiatement avant le début de leur exposition à l'HI ou à la normoxie (J1), après une semaine d'exposition (J8), et le jour de leur sacrifice (J15).

#### **3.3.2 Mesure de la pression artérielle**

La pression artérielle est mesurée par cathétérisme des artères carotides. Cette technique étant invasive, elle est réalisée sur un animal anesthésié, quelques minutes avant le prélèvement de son cœur. Les rats sont anesthésiés par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique à la dose de 60 mg/kg.

La peau de l'animal est incisée dans la zone du cou, sur environ 3 cm. Les muscles sous-jacents sont dilacérés avec précaution, afin de dégager l'artère carotide gauche. Une fois isolée, celle-ci est clampée en deux endroits séparés d'environ 2 cm. L'artère est alors incisée afin de permettre l'insertion d'un cathéter relié à un capteur de pression. Le cathéter est maintenu dans l'artère grâce à un fil. L'artère est alors déclampée dans sa région caudale, et l'animal est placé sur le côté afin de permettre la mesure de la pression artérielle. L'enregistrement des pressions diastolique (PD) et systolique (PS) est effectué durant une dizaine de secondes. La pression artérielle moyenne (PAM) est alors calculée comme  $(PS + 2 PD) / 3$ . Le système d'acquisition est le même que celui décrit pour l'enregistrement des paramètres hémodynamiques du cœur isolé.

#### **3.3.3 Mesure de l'hématocrite**

Le sang de l'animal est recueilli dans un capillaire à hématocrite, qui est centrifugé à 12000 rpm pendant 10 min. La lecture du résultat se fait au moyen d'une réglette à hématocrite.

### **3.4 Modèle d'ischémie-reperfusion myocardique**

#### **3.4.1 Modèle d'ischémie-reperfusion sur cœur isolé et perfusé selon Langendorff**

Une fois anesthésiés, les rats sont héparinés (500 U/kg) par injection intraveineuse pelvienne, afin d'éviter la formation de caillots intra-coronariens lors du prélèvement du cœur. Le thorax est alors ouvert sous le sternum. Le diaphragme est incisé, permettant de dégager le péricarde. L'aorte et la veine cave inférieure sont isolées, et le cœur est rapidement excisé et placé dans du milieu de perfusion à 4°C (tampon bicarbonate Krebs-Henseleit contenant en mM : NaCl 118 ; NaHCO<sub>3</sub> 25,2 ; KCl 4,7 ; CaCl<sub>2</sub> 2,5 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 ; glucose 11 ; MgSO<sub>4</sub> 1,2 ; EDTA 0,5). Puis l'aorte est canulée et perfusée de manière rétrograde au dessus de la valve aortique : le perfusat entre dans les artères coronaires via les ostia, permettant ainsi de maintenir le cœur en vie pendant plusieurs heures. Le drainage des coronaires se fait par l'artère pulmonaire. La perfusion est effectuée à pression constante (75 mmHg), le pH du tampon de perfusion est maintenu à 7,4 par le système NaHCO<sub>3</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, quand le milieu est saturé par un mélange gazeux (O<sub>2</sub> 95% ; CO<sub>2</sub> 5%). Après 20 min de stabilisation, un robinet 3 voies situé immédiatement en amont de la canule permet de stopper la perfusion afin de provoquer une ischémie globale. Au bout de 30 min, le robinet est réouvert pour permettre la reperfusion du cœur pendant 2 h. Pendant toute la durée de la manipulation, le cœur est placé dans une chambre chauffante et le liquide de perfusion est thermostaté afin de maintenir la température du myocarde à 37°C, contrôlée par une sonde thermique insérée dans l'oreillette gauche. Pendant l'ischémie, le cœur est immergé dans le milieu de perfusion à 37°C.

#### **3.4.2 Mesures hémodynamiques**

La pression intra-ventriculaire est mesurée au moyen d'un ballonnet (Hugo Sachs, n°4) inséré dans le ventricule gauche (VG), après incision de l'oreillette gauche. Ce ballonnet est relié par un cathéter à un capteur de pression, lui-même relié à un système d'acquisition (PC Lab 4S, ADInstruments). Ce ballonnet est gonflé jusqu'à imposer une pression ventriculaire gauche minimum (PVG min) d'environ 10 mmHg. La pression développée par le ventricule gauche (PDVG = pression ventriculaire gauche maximum - PVG min) est mesurée ainsi que

les dérivées de la PDVG,  $dP/dt$  max et  $dP/dt$  min, correspondant respectivement aux mesures de la contractilité et de la relaxation cardiaque. La fréquence cardiaque (FC) est calculée d'après la PDVG. Le débit coronaire (DC) est mesuré par le recueil de l'effluent coronaire.

PDVG,  $dP/dt$  max,  $dP/dt$  min, FC et DC sont mesurés à différents temps de la stabilisation (10 et 20 min (S10 et S20)), de l'ischémie (5, 15, 29 min (I5, I15, I29)) et de la reperfusion (5, 15, 30, 60, 90, 120 min (R5, R15, R30, R60, R90, R120)).

Seuls les cœurs avec un DC inférieur à 20 ml/min et une PDVG supérieure à 70 mmHg à la fin de la période de stabilisation sont inclus dans l'étude.

### **3.4.3 Détermination de la taille de l'infarctus**

Après l'ischémie-reperfusion, le cœur est débarrassé de ses tissus connectifs puis congelé à -20°C pendant une dizaine de minutes. Le cœur est ensuite coupé transversalement en 6 tranches puis incubé pendant 10 min dans du tampon phosphate contenant 1% chlorure de triphényl tétrazolium (TTC) à 37°C. Le TTC est un sel de tétrazolium dégradé par la succinate déshydrogénase des mitochondries vivantes. La réduction du TTC par coupure du cycle tétrazolium conduit à la formation de formazan, un composé coloré en rouge. Ainsi, les cellules viables sont colorées en rouge et les cellules nécrosées restent blanches. Les tranches de cœurs sont ensuite fixées dans du formaldéhyde 10% pendant 24 h, puis photographiées. Les photos sont analysées grâce au logiciel UTHSCSA Image Tool. La taille de la zone infarctée est exprimée en pourcentage de la taille des ventricules.

### **3.5 Mesure du stress oxydant par dosage de la NADPH oxydase**

#### **3.5.1 Prélèvement du cœur**

Les cœurs sont prélevés, rapidement rincés et nettoyés dans du sérum physiologique froid (4°C) puis congelés dans de l'azote liquide. Ils sont ensuite conservés à -80°C.

#### **3.5.2 Extraction des protéines membranaires**

Les cœurs congelés sont broyés au polytron (3 fois 20 secondes) dans 10 volumes de tampon d'homogénéisation (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaF 1 mM, orthovanadate 1 mM, pastille d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche®), pH ajusté à 7,4). Les homogénats obtenus sont ultracentrifugés 60 min à 4°C, à 100000 g. Le surnageant obtenu comprend les protéines cytosoliques. Il est aliquoté et congelé à -80°C.

#### **3.5.3 Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

La méthode de Pierce, compatible avec la présence de détergent dans les échantillons, a été utilisée pour la quantification des protéines cytosoliques, par réaction colorimétrique à partir de la réduction par les protéines de  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{+}$ , en milieu alcalin. La détection de  $\text{Cu}^{+}$  se fait par l'acide bicinchonique, BCA. Le complexe BCA- $\text{Cu}^{+}$  présente une très forte absorbance à 562 nm, linéaire avec l'augmentation des concentrations protéiques. Les échantillons sont dosés en double, sur microplaque (kit Pierce® BCA Protein Assay Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, Etats-Unis d'Amérique). Les concentrations protéiques sont déterminées à l'aide de l'équation de la gamme étalon, réalisée avec de l'albumine bovine sérique (BSA), pour des concentrations allant de 0 à 2000  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### **3.5.4 La NADPH oxydase**

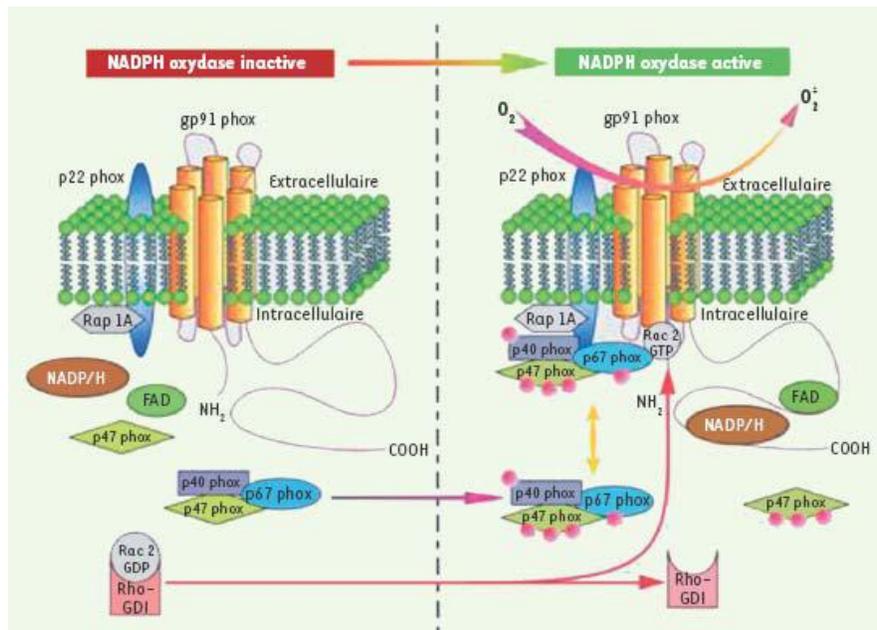
La NADPH oxydase est un complexe protéique qui catalyse la réduction à un électron de l'oxygène en ions superoxyde, lui-même précurseur des autres espèces réactives de l'oxygène.

Longtemps, la production d'ERO par la NADPH oxydase a été considérée comme restreinte aux polynucléaires en réponse à un stimulus inflammatoire.

Il est désormais établi qu'il existe différentes formes de la NADPH oxydase capables de produire de l' $O_2^-$ , et s'exprimant dans différents types cellulaires de l'organisme, notamment le coeur et les vaisseaux [124].

Cette enzyme est constituée d'un complexe membranaire catalytique, le cytochrome b558, composé par l'association de deux sous-unités, gp91phox et p22phox, et de deux complexes cytosoliques régulateurs, un trimère composé des sous-unités p47-phox, p67-phox et p40-phox, et un dimère associant une protéine G (Rac) associée à une protéine inhibitrice (GDI).

L'activation de la NADPH oxydase (illustrée à la figure suivante) est liée à la migration des complexes régulateurs cytosoliques, après phosphorylation de p47-phox et la levée de l'inhibition de Rac par GDI, vers le complexe membranaire catalytique, permettant l'assemblage complet de l'oxydase active. Le complexe cytochrome b558/p47-phox-phosphorylée-p67/Rac forme la NADPH oxydase activée.



**Figure 12 : Activation de la NADPH oxydase, d'après [124].**

### 3.5.5 Mesure de la NADPH oxydase par western blot

Le western blot permet d'identifier les protéines sont présentes dans un échantillon, selon leurs poids moléculaires, grâce à l'électrophorèse. L'électrophorèse est la migration de

particules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique, ceci se faisant au travers d'un gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS).

Les échantillons étudiés, après dosage des protéines, sont préparés de manière à obtenir une quantité constante de protéine dans chaque échantillon dosé. Les échantillons sont ensuite bouillis 5 min dans du tampon de Laemmli, (Tris HCl pH 6,8 625 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 10%, SDS 10%, bleu de bromophénol 1 mg/ml, glycérol 50%). L'ébullition permet la dénaturation des protéines et le SDS présent dans le tampon permet leur solvatation et prévient leur précipitation grâce à un apport en charges négatives. La régénération des ponts disulfure est empêchée par la présence de  $\beta$ -mercaptoethanol. Enfin, le glycérol augmente la densité des échantillons, facilitant leur dépôt au fond des puits du gel.

Le gel utilisé pour le western blot comprend deux modes successifs de migration électrophorétique, une isotachophorèse (gel de concentration ou stacking gel, SDS-acrylamide 5%), puis une électrophorèse de zone monophasique (gel de séparation ou resolving gel) qui est ici un gel SDS-acrylamide à 12%.

En même temps que les échantillons, on dépose sur le gel deux marqueurs de poids moléculaire, l'un coloré (Color Burst) qui permet d'évaluer migration des protéines sur le gel, et un marqueur qui sera utilisé pour déterminer le poids moléculaire des bandes de migration après l'autoradiographie (MagicMark XP).

Suite à la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PDVF). La qualité du transfert est vérifiée par une coloration au rouge ponceau, avant que les sites protéiques non spécifiques ne soient bloqués par incubation de la membrane dans un tampon de blocage (Tris Buffered Saline (TBS), Tween 0,1%, lait non gras 5%) pendant une heure. Après rinçage, la membrane est incubée avec un anticorps primaire anti-p47-phox (1/500; Santa Cruz sc-14015) ou anti-p67-phox (1/500; Santa Cruz sc-15342), durant la nuit, à 4°C. Après un nouveau rinçage, c'est en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP, 1/5000; Santa Cruz sc-2004) qu'est incubée la membrane, pendant une heure à température ambiante. Après un dernier rinçage, le substrat de la peroxydase (Pierce ECL, Perbio Science France SAS, France) est déposé sur la membrane, et après 1 min celle-ci est révélée par autoradiographie. La densité relative des bandes obtenues est analysée grâce au logiciel Image J<sup>®</sup> et exprimée en unités arbitraires.

Pour les dosages réalisés sur des protéines cytosoliques, l'immunomarquage de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisé comme témoin de charge, après déshybridation des membranes.

### **3.6 Mesure du stress oxydant par marquage au dihydroéthidium**

#### **3.6.1 Cryosection des coeurs**

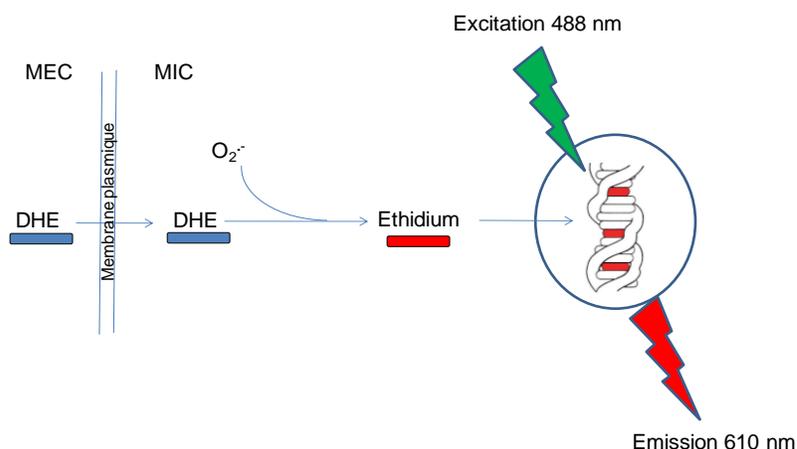
Après prélèvement puis rinçage, les coeurs sont immergés dans un agent cryoprotecteur (optimum cutting temperature compound, ou OCT, provenant de TissueTek). Ils sont ensuite congelés progressivement dans de l'isopentane refroidi par immersion dans de l'azote liquide. Les coeurs sont alors conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  en attendant d'être coupés. Les coupes, d'une épaisseur de  $8\mu\text{m}$ , sont réalisées au cryotome dans un cryostat, et déposées sur des lames Superfrost®, avant d'être conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.6.2 Marquage au dihydroéthidium**

Le dihydroéthidium (DHE), molécule capable de traverser librement les membranes cellulaires, a été utilisé pour évaluer la production in situ de l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). En effet, en présence de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , le DHE est oxydé en éthidium, un produit fluorescent, qui marque les noyaux en s'intercalant dans l'ADN. De plus, les radicaux hydroxyles, le  $\cdot\text{NO}$ , les peroxy-nitrites, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'hypochlorite n'oxydent pas le DHE de manière significative. L'éthidium n'étant pas perméable aux membranes cellulaires, sa fluorescence est spécifique de l'anion superoxyde au sein de la cellule fluorescente, permettant donc de déterminer le niveau de stress oxydant cellulaire car directement proportionnel à la quantité de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dans la cellule.

Les coupes de myocarde obtenues sont incubées en présence de DHE ( $10\mu\text{M}$ ) et de Dapi ( $0,5\mu\text{g/ml}$ ) dilués dans une solution de PBS, 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La fluorescence in situ est évaluée par microscopie à fluorescence. L'éthidium est excité à 488 nm avec un spectre d'émission à 610 nm. La fluorescence résultant est directement proportionnelle au niveau de stress oxydant. Le Dapi est excité à 372 nm avec

un spectre d'émission à 610 nm. La fluorescence résultant permet de quantifier le nombre de noyaux cellulaires par champ observé. Les images sont analysées grâce au logiciel Image J. Le principe du marquage par le DHE est schématisé dans la figure 13.



**Figure 13 : Principe du marquage de la détection du superoxyde par le DHE**

MEC : milieu extra-cellulaire ; MIC : milieu intra-cellulaire

### 3.7 Analyses statistiques

Les analyses statistiques réalisées dans les études présentées sont effectuées grâce au logiciel SigmaStat (version 3.5).

Les valeurs des paramètres étudiés sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (standard error of the mean (s.e.m.)). Elles sont comparées grâce à un test d'analyse de la variance (ANOVA) à deux voies, avec pour facteurs de comparaison le type l'exposition à l'HI ou à la normoxie, et le traitement. Les tests post-hoc sont réalisés au moyen du test de Tukey.

Le seuil de significativité est fixé à 5% ( $p < 0.05$ ).

## **4 RESULTATS**

#### **4.1 Effets de l'érythropoïétine sur les conséquences myocardiques délétères induites par l'hypoxie intermittente**

Il a été montré par notre équipe qu'une HI aiguë de 4 heures avec une  $FiO_2$  minimale de 5% induit une plus grande cardiosensibilité retardée à l'infarctus chez le rat [78]. Plusieurs études récentes suggèrent que l'EPO peut être considérée comme un agent pharmacologique pré- et post-conditionnant. En effet, l'administration d'EPO avant et après une ischémie cardiaque induit une protection contre les lésions de reperfusion en améliorant la récupération fonctionnelle et en réduisant l'apoptose et la nécrose. Le but de ce travail a donc été d'étudier si le pré- et le post-conditionnement par l'EPO protègent contre la plus grande sensibilité à l'infarctus induite par une HI préalable dans le cœur isolé de rat.

Dans un premier temps, des cœurs de rats isolés et perfusés selon la méthode de Langendorff ont été soumis à une ischémie globale et totale de 30 min suivie par 120 min de reperfusion. De l'EPOrh a été administrée à différentes doses dans le liquide de perfusion, soit pendant 10 min avant l'ischémie, soit pendant 15 min au moment de la reperfusion, afin de déterminer une dose efficace. La taille de l'infarctus a été déterminée en utilisant une technique colorimétrique et une analyse planimétrique.

Dans un second temps, des rats mâles adultes ont été exposés à des cycles d'hypoxie ( $FiO_2$  5%) / normoxie ( $FiO_2$  21%), pendant 4 h. Vingt-quatre heures plus tard les cœurs ont été isolés et perfusés, puis soumis à une I/R selon le même protocole que précédemment. Une partie des cœurs a été perfusée avec de l'EPOrh (5 UI/ml), soit pendant 10 min avant l'ischémie, soit pendant 15 min au moment de la reperfusion. La taille de l'infarctus a ensuite été déterminée.

Nous avons observé que l'EPO est capable de protéger le cœur de manière dose-dépendante lorsqu'elle est administrée immédiatement avant ou après une I/R. En effet, l'administration d'EPOrh à la dose de 5 U/ml permet une diminution significative de la taille de l'infarctus.

Nous avons également montré que la plus grande sensibilité à l'infarctus induite par 4 h d'HI aiguë avec une  $FiO_2$  minimale à 5% (I/V :  $38\pm 1$  vs  $27\pm 4\%$  dans les contrôles normoxiques) a été abolie par la perfusion d'EPOrh 5 U/ml soit avant l'ischémie (I/V :  $27\pm 4$  vs  $28\pm 2\%$  chez les contrôles normoxiques), soit au moment de la reperfusion (I/V :  $23\pm 3$  vs  $25\pm 2\%$  chez les

contrôles normoxiques). Les valeurs de taille d'infarctus ont été comparées à l'aide d'une analyse de variance à une voie (ANOVA) avec un seuil de significativité fixé à  $p < 0,05$ .

L'administration d'EPO avant ou après une ischémie protège le cœur de manière dose-dépendante et permet de prévenir efficacement la cardiosensibilité à l'infarctus induite par une HI préalable.

# Deleterious myocardial consequences induced by intermittent hypoxia are reversed by erythropoietin

A. Ramond, C. Ribuot, P. Lévy, M. Joyeux-Faure\*

Laboratoire HP2, Hypoxie Physio-Pathologie Respiratoire et Cardiovasculaire, EA 3745, ERI 0017,  
Institut Jean Roget, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France

Accepted 28 October 2006

## Abstract

The aim of this work was to investigate the effects of different recombinant human erythropoietin (rhEPO) doses on the infarction development and if rhEPO could protect against the deleterious consequences induced by a previous intermittent hypoxia (IH, FiO<sub>2</sub> 5%, 4 h). First, isolated rat hearts were submitted to an ischemia–reperfusion. rhEPO was infused before or after ischemia, at different doses. Secondly, rats were exposed to IH. Twenty-four hours later, hearts underwent the ischemia–reperfusion protocol. For some hearts, 5 U ml<sup>-1</sup> rhEPO was infused as previously. We observed that rhEPO has a dose-dependant effect on infarct size since it was significantly reduced by rhEPO infusions before or after ischemia. We also showed that 4 h of IH induced a higher sensitivity to the infarction which was prevented by rhEPO. In conclusion, rhEPO administration before or after ischemia can protect isolated rat myocardium in a dose dependent manner and efficiently prevents the higher sensitivity to the infarction induced by previous intermittent hypoxia.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Erythropoietin; Myocardial ischemia–reperfusion; Intermittent hypoxia; Infarction; Rat

## 1. Introduction

Despite multiple significant therapeutic advances, myocardial ischemia–reperfusion injury is still a major unsolved public health problem throughout the industrialized world. Novel approaches that protect and salvage injured heart tissue are needed to reduce cardiac cell dysfunction and death in patients presenting with acute myocardial ischemia (Williams and Benjamin, 2000).

In response to hypoxia, hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) activates the transcription of genes whose protein products, including erythropoietin (EPO), mediate adaptative responses. The main known role of EPO is to regulate hematopoiesis. However, the EPO receptor (EPOR) is expressed in several non-hematopoietic tissues, including myocardium, vascular endothelium, neurons and astrocytes, suggesting that endogenous EPO could have cellular effects in non-hematopoietic

tissues (Juil et al., 1998; Brines et al., 2000; van der Meer et al., 2004). In this regard, use of recombinant human erythropoietin (rhEPO) is of special interest. Several recent experimental studies using rhEPO in rodent suggest that it can be considered as a pharmacological protecting agent. Recent evidence suggests that administration of rhEPO plays a neuroprotective role in animal models of cerebral ischemia and mechanical trauma of the nervous system. Indeed, local cerebral (Sadamoto et al., 1998; Bernaudin et al., 1999) or systemic (Brines et al., 2000) administration of rhEPO prevents ischemia-induced neuronal death. Encouragingly, the efficacy of rhEPO for treatment of ischemic human stroke has recently been reported (Ehrenreich et al., 2002). The protective effect of rhEPO against cardiac ischemic injury has also been investigated experimentally (Bogoyevitch, 2004; Joyeux-Faure et al., 2005). It has been observed that rhEPO inhibits apoptosis in rat ventricular myocytes exposed to hypoxia as well as in the *in vivo* rat model of myocardial ischemia (Calvillo et al., 2003; Tramontano et al., 2003). Recently, rhEPO has been shown to induce delayed cardioprotection against ischaemic injury. In the rabbit *in vivo*, an intravenous injection of 1000 IU kg<sup>-1</sup> rhEPO, 12 h prior to ischemia, is able to reduce cardiac necrosis measured 3 days after reperfusion (Parsa et al., 2004). Moreover, administration of rhEPO (5000 IU kg<sup>-1</sup>,

\* Corresponding author at: Laboratoire HP2, Hypoxie Physio-Pathologie, Faculté de Pharmacie, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France.  
Tel.: +33 476 637 475; fax: +33 476 637 178.

E-mail address: [Marie.Faure@ujf-grenoble.fr](mailto:Marie.Faure@ujf-grenoble.fr) (M. Joyeux-Faure).

i.p.) in the rat *in vivo*, prevents cellular apoptosis and necrosis and improves functional recovery in isolated hearts subjected to ischemia–reperfusion, 1 h (Joyeux-Faure et al., 2006) or 24 h (Cai et al., 2003) later. A protective effect is also seen when rhEPO is administered directly to isolated rat and rabbit hearts, 10–15 min before ischemia (Cai and Semenza, 2004; Shi et al., 2004; Wright et al., 2004). In canine and rat *in vivo*, a single administration of rhEPO just before reperfusion significantly reduces infarct size in a dose-dependent manner (Bullard et al., 2005; Hirata et al., 2005). Thus, various administrations of rhEPO have been performed *in vivo* or in the isolated heart in different animal species in order to study the protective effects of erythropoietin against cardiac ischemic injury (Bogoyevitch, 2004; Joyeux-Faure et al., 2005). However, the suitable rhEPO dose able to directly protect the myocardium and the time of its administration regarding the ischemic event remains to be determined in the same animal specie. Consequently, the first aim of this work was to investigate the effects of different rhEPO doses, administered before or after ischemia in the isolated rat heart, on the infarction development.

Prevention of the increased cardiovascular morbidity and mortality associated to the obstructive sleep apnea syndrome (OSAS), which is characterized by an episodic cessation of air-flow during sleep (Partinen and Guilleminault, 1990; Stoohs and Guilleminault, 1992), is also of a major interest. Intermittent hypoxia is a component of OSAS that seems to be the key factor involved in cardiovascular consequences (Fletcher, 2001). In order to characterize the cellular mechanisms and deleterious myocardial consequences of this stress, we developed an IH model in the rat. Thus we recently demonstrated that animals exposed to IH show a higher sensitivity to the infarction compared to control animals exposed to normoxia (Beguin et al., 2005). In the second part of this work, we determined if direct administration of rhEPO to the heart could protect against the deleterious myocardial consequences induced by a previous intermittent hypoxia.

## 2. Methods

The animal care complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (7th ed.), Nath. Acad. Press, 1996. Male Wistar rats (250–350 g) were provided by Janvier (Le Genest-St-Isle, France) and housed in controlled conditions and provided with standard rat chow.

### 2.1. Ischemia–reperfusion on isolated heart

Rats were anesthetized with 60 mg kg<sup>-1</sup>, i.p. pentobarbital sodium and treated with heparin (500 IU kg<sup>-1</sup>, i.v.). Heart was rapidly excised and immersed in 4 °C Krebs–Henseleit (KH) solution (in mM: 118.0 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 25.2 NaHCO<sub>3</sub>, and 11.0 glucose). The aortic stump was cannulated, and the heart was perfused using the Langendorff technique at a constant pressure (70 mmHg) with oxygenated Krebs–Henseleit buffer, as previously described (Joyeux et al., 2002). A water-filled latex balloon, coupled to a pressure transducer, was inserted into the left ventricular

cavity via the left atrium for pressure recording. Left ventricular end-diastolic pressure was adjusted between 5 and 10 mmHg. Myocardial temperature was measured by a thermoprobe inserted into the left ventricle and was maintained constant close to 37 °C. After 20 min of stabilization, a no-flow global ischemia was induced by stopping the perfusion for 30 min. Thereafter, the heart was reperfused for 120 min. Coronary flow (CF) was measured periodically throughout the ischemia–reperfusion procedure, by collecting the effluent. Heart rate (HR) and left ventricular developed pressure (LVDP = difference between left ventricular systolic pressure and left ventricular end-diastolic pressure) were continuously recorded. At the end of the ischemia–reperfusion protocol, the atria were removed, and the heart was frozen at –20 °C for 10 min. It was then cut into 2-mm transverse sections from apex to base (6–7 slices/heart). Once thawed, the slices were incubated at 37 °C with 1% triphenyltetrazolium chloride in phosphate buffer (pH 7.4) for 10 min, fixed in 10% formaldehyde solution and photographed to clearly distinguish stained viable tissue from unstained necrotic tissue. Infarct size (*I*) was determined using a computerized planimetric technique (Image Tool for Windows) and expressed as a percentage of the ventricular size (*V*).

Only hearts with CF within 10–16 ml min<sup>-1</sup> and LVDP > 70 mmHg at the end of the stabilization period were included in this study. Hearts that developed ventricular fibrillation during reperfusion, which could not be restored to normal sinus rhythm within 5 min, were excluded.

### 2.2. Erythropoietin infusions

Some isolated hearts were perfused with KH buffer containing epoietin beta NeoRecormon® (rhEPO, Roche Laboratories). Indeed, rhEPO (0.5, 5 or 10 IU ml<sup>-1</sup>) was infused for either 10 min before ischemia or at the first 15 min of reperfusion. Control hearts were only perfused with KH buffer. In figure legends as in Sections 2 and 3, the term EPO corresponds to rhEPO.

### 2.3. Intermittent hypoxia protocol

Additional rats were separated randomly into two groups: the first group (IH, *n* = 21) was exposed to intermittent hypoxia, the second group (N, *n* = 21) was exposed to air. During intermittent hypoxia protocol, the animals were housed in custom-made identical cylindrical Plexiglas chambers (length 28 cm, diameter 10 cm, volume 2.2 l) with tightly fitting lids. Timed solenoid valves were used to distribute pure nitrogen to each chamber *via* a balloon reservoir at a flow adjusted to reduce the ambient inspired oxygen fraction (FiO<sub>2</sub>) to 5% for 40 s. This was followed by infusion of compressed air for 20 s, allowing a rapid return of ambient air to a FiO<sub>2</sub> of 21%. This 1-min cycle was repeated for 4 h. At the same time that nitrogen was distributed to hypoxia chambers, compressed air was distributed at the same flow rate to normoxic chambers, thereby submitting normoxic and hypoxic animals to similar noise and airflow disturbances. A dampening device at the chamber intake was used to dissipate the air-stream arriving on the animals. The level of FiO<sub>2</sub> in the

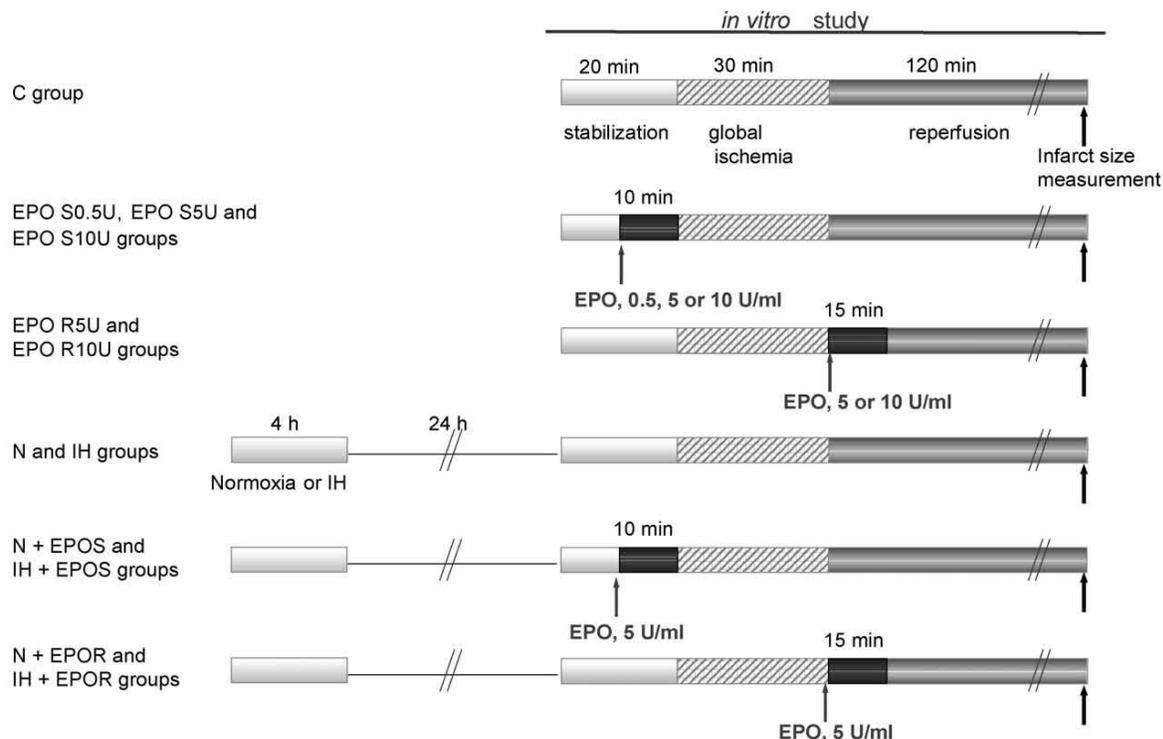


Fig. 1. Experimental design.

chambers was controlled throughout the hypoxia protocol using a Beckman OM11 O<sub>2</sub> analyzer (Fullerton, CA, USA).

## 2.4. Experimental groups

### 2.4.1. First part of the study investigating the effect of rhEPO on ischemia–reperfusion injuries

Six experimental groups ( $n=8$  in each group) were studied: in the control group (C), isolated hearts were perfused with KH buffer throughout the protocol. Three groups of hearts were perfused with EPO during the last 10 min of stabilization, immediately before no-flow global ischemia, at a final concentration of  $0.5 \text{ U ml}^{-1}$  (EPO S0.5U group),  $5 \text{ U ml}^{-1}$  (EPO S5U group) or  $10 \text{ U ml}^{-1}$  (EPO S10U group) in the KH buffer. In two other groups, hearts were infused with rhEPO during the first 15 min of the reperfusion, at a final concentration of either  $5 \text{ U ml}^{-1}$  (EPO R5U group) or  $10 \text{ U ml}^{-1}$  (EPO R10U group) in the KH buffer.

### 2.4.2. Second part of the study investigating the effect of rhEPO on ischemic damage after intermittent hypoxia

In this part, six groups ( $n=7$  in each group) were studied in which all rats were submitted to either IH or normoxia and 24 h later their sensitivity to the infarction was assessed on isolated heart, in the presence or not of EPO. Two groups of rats were exposed to 4 h of normoxia (N group) or IH (IH group) and 24 h later isolated heart were perfused with KH solution only and submitted to the ischemia–reperfusion protocol. In two other N and IH groups,  $5 \text{ U ml}^{-1}$  EPO was infused on

isolated heart during 10 min before ischemia (N + EPOS and IH + EPOS groups, respectively). In two additional N and IH groups,  $5 \text{ U ml}^{-1}$  EPO was infused on isolated heart during the first 15 min of reperfusion (N + EPOR and IH + EPOR groups, respectively).

All of the eleven groups are presented in Fig. 1.

## 2.5. Statistical analysis of data

Hemodynamic and infarct size data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). Infarct size values were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA), with exposure and treatment corresponding to each factor. Hemodynamic data were analyzed by using two-way repeated-measures ANOVA. Post hoc multiple comparisons were performed by using Tukey tests. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effect of rhEPO on ischemia–reperfusion injuries

Administration of EPO either during stabilization or reperfusion had no effect on cardiac functional recovery, since we observed no significant difference in hemodynamic parameters between the control and the two EPO treated groups, whatever the EPO administered dose ( $0.5, 5$  or  $10 \text{ U ml}^{-1}$ ) (Table 1).

As illustrated by Fig. 2, we observed a dose-dependant effect of EPO on infarct size. Indeed, when EPO was administered

Table 1  
Hemodynamic data in isolated hearts throughout the ischemia–reperfusion protocol, from control and EPO treated groups

Groups ( <i>n</i> =8)	C	EPO S0.5U	EPO S5U	EPO S10U	EPO R5U	EPO R10U
<b>LVDP (mmHg)</b>						
S20	93 ± 4.9	98 ± 5.5	101 ± 8.0	103 ± 4.9	102 ± 5.2	108 ± 10.0
R15	59 ± 2.7	45 ± 3.2	42 ± 6.1	46 ± 4.3	45 ± 4.4	73 ± 6.0
R30	54 ± 3.6	45 ± 4.0	44 ± 5.5	45 ± 4.1	46 ± 4.5	61 ± 3.9
R60	43 ± 3.9	28 ± 3.7	35 ± 4.9	32 ± 4.2	43 ± 3.4	47 ± 2.9
R120	23 ± 3.9	16 ± 2.6	24 ± 2.1	20 ± 2.1	32 ± 2.1	28 ± 3.0
<b>LVEDP (mmHg)</b>						
S20	12 ± 0.8	10 ± 1.3	11 ± 1.2	11 ± 0.4	7 ± 0.8	11 ± 0.8
I15	22 ± 6.5	17 ± 4.4	19 ± 4.8	26 ± 4.7	45 ± 8.0	17 ± 2.7
I29	43 ± 1.9	41 ± 4.8	37 ± 1.5	46 ± 1.2	35 ± 3.8	41 ± 2.1
R15	86 ± 6.7	78 ± 8.7	80 ± 3.7	90 ± 3.1	73 ± 5.4	69 ± 6.0
R30	84 ± 6.4	74 ± 9.1	77 ± 3.6	87 ± 3.0	66 ± 5.9	72 ± 4.9
R60	83 ± 5.8	75 ± 8.4	78 ± 5.0	85 ± 4.2	60 ± 5.7	74 ± 4.4
R120	77 ± 4.7	72 ± 8.9	81 ± 4.3	83 ± 3.8	53 ± 5.4	78 ± 3.7
<b>HR (bpm)</b>						
S20	271 ± 15.6	236 ± 16.9	241 ± 18.0	252 ± 9.3	249 ± 11.9	254 ± 21.8
R15	200 ± 20.1	197 ± 14.4	237 ± 22.4	227 ± 25.7	191 ± 21.5	187 ± 17.6
R30	216 ± 14.7	209 ± 19.7	258 ± 24.6	259 ± 19.1	217 ± 19.5	199 ± 14.4
R60	235 ± 21.9	235 ± 30.4	286 ± 27.6	249 ± 16.3	238 ± 17.0	216 ± 15.3
R120	297 ± 21.6	218 ± 39.7	224 ± 22.6	232 ± 22.5	235 ± 18.0	288 ± 17.1
<b>CF (ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>)</b>						
S20	14 ± 0.7	11 ± 0.3	12 ± 0.3	12 ± 0.6	14 ± 1.0	13 ± 0.3
R15	6 ± 0.4	5 ± 0.3	6 ± 0.4	6 ± 0.4	6 ± 0.5	6 ± 0.5
R30	6 ± 0.4	4 ± 0.2	5 ± 0.4	5 ± 0.3	5 ± 0.3	5 ± 0.4
R60	5 ± 0.4	3 ± 0.3	4 ± 0.2	4 ± 0.4	4 ± 0.2	4 ± 0.4
R120	3 ± 0.3	2 ± 0.3	3 ± 0.3	2 ± 0.4	3 ± 0.2	3 ± 0.5

C group: control hearts perfused with KH buffer only; EPO S0.5U group: hearts perfused with KH buffer containing 0.5 U ml<sup>-1</sup> rhEPO, 10 min before ischemia; EPO S5U group: hearts perfused with KH buffer containing 5 U ml<sup>-1</sup> rhEPO, 10 min before ischemia; EPO S10U group: hearts perfused with KH buffer containing 10 U ml<sup>-1</sup> rhEPO, 10 min before ischemia; EPO R5U group: hearts perfused with KH buffer containing 5 U ml<sup>-1</sup> rhEPO, the first 15 min of reperfusion; EPO R10U group: hearts perfused with KH buffer containing 10 U ml<sup>-1</sup> rhEPO, the first 15 min of reperfusion; S20: at 20 min of stabilisation; I15 and 29: at 15 and 29 min of ischemia, respectively; R15, 30, 60 and 120: at 15, 30, 60 and 120 min of reperfusion, respectively; LVDP: left ventricular developed pressure; LVEDP: left ventricular end-diastolic pressure; HR: heart rate; CF: coronary flow. Data are mean ± S.E.M. There was no significant difference between the five experimental groups.

before ischemia, infarct size was not modified by 0.5 U ml<sup>-1</sup> (I/V: 34 ± 4%), whereas it was significantly reduced by 5 U ml<sup>-1</sup> (I/V: 29 ± 3%) compared to the control group (I/V: 42 ± 4%).

For hearts treated with 5 U ml<sup>-1</sup> EPO at reperfusion, there is a strong significant reduction in infarct size compared to the control group (I/V: 24 ± 2% versus 42 ± 4%).

However, treatment with 10 U ml<sup>-1</sup> EPO either before ischemia or at reperfusion had no influence on infarction (I/V: 46 ± 3% and 42 ± 1%, respectively, versus 42 ± 4% in the control group).

### 3.2. Myocardial consequences of intermittent hypoxia

Twenty-four hours after the hypoxic or normoxic exposure, there was no statistically significant difference regarding the hemodynamic parameters between N and IH groups (Table 2), since baseline or recovery hemodynamic parameters were similar in both groups.

Following 4 h of IH, the infarct size was significantly higher in hearts from rats exposed to 5% FiO<sub>2</sub> (38 ± 1%) compared with those from their normoxic controls (27 ± 4%) (Fig. 3). These results confirm that IH exposure induces a higher cardiotoxicity to the infarction.

### 3.3. Effect of rhEPO on deleterious myocardial consequences of intermittent hypoxia

There was no statistically significant difference regarding the hemodynamic parameters among the normoxic and hypoxic groups, treated or not with EPO. EPO administration before ischemia or at reperfusion had no effect on cardiac functional recovery, independently of IH or normoxic exposure (Table 2).

The higher sensitivity to the infarction induced by 4 h of IH with a minimal FiO<sub>2</sub> of 5% (I/V: 38 ± 1% versus 27 ± 4% in normoxic controls) was prevented by EPO infusions either before ischemia (I/V: 27 ± 4% versus 28 ± 2% in normoxic controls) or at reperfusion (I/V: 23 ± 3% versus 25 ± 2% in normoxic controls) (Fig. 3).

## 4. Discussion

### 4.1. Effect of rhEPO on ischemia–reperfusion injuries

Firstly, we showed in this study in the rat, that erythropoietin protects the heart against infarction induced by ischemia–reperfusion when it is administered before as well as after ischemia. Moreover, we showed that this cardioprotective

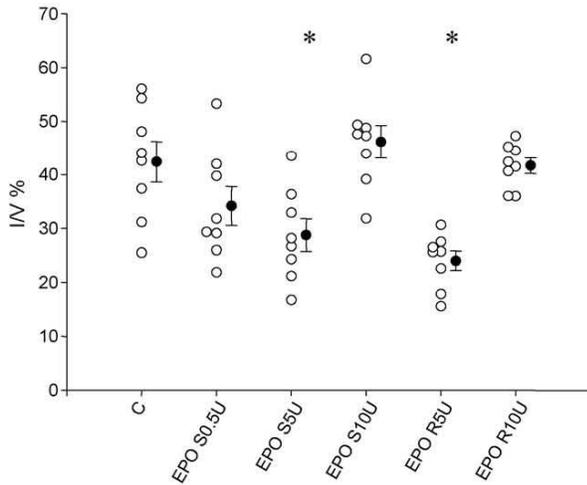


Fig. 2. Effect of EPO on myocardial infarction. Infarct size ( $I$ ) expressed as a percentage of ventricles ( $V$ ) assessed after a no-flow global ischemia (30 min)–reperfusion (120 min) sequence. C group: control hearts perfused with KH buffer only; EPO S0.5U group: hearts perfused with KH buffer containing  $0.5 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, 10 min before ischemia; EPO S5U group: hearts perfused with KH buffer containing  $5 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, 10 min before ischemia; EPO S10U group: hearts perfused with KH buffer containing  $10 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, 10 min before ischemia; EPO R5U group: hearts perfused with KH buffer containing  $5 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, the first 15 min of reperfusion; EPO R10U group: hearts perfused with KH buffer containing  $10 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, the first 15 min of reperfusion; (○) individual values; (●) means  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$  vs. C group, one-way ANOVA.

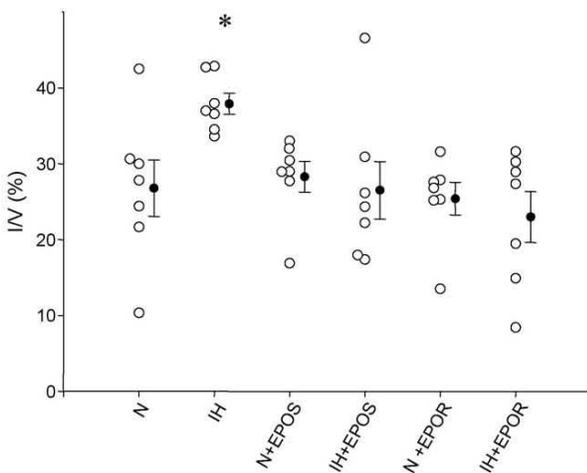


Fig. 3. Effect of EPO on deleterious myocardial consequences of intermittent hypoxia. Infarct size ( $I$ ) expressed as a percentage of ventricles ( $V$ ) assessed after a no-flow global ischemia (30 min)–reperfusion (120 min) sequence. N group: control hearts perfused with KH buffer only from normoxic rat; IH group: hearts perfused with KH buffer only from hypoxic rat; N+EPOS group: hearts perfused with KH buffer containing  $5 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, 10 min before ischemia, from normoxic rats; IH+EPOS group: hearts perfused with KH buffer containing  $5 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, 10 min before ischemia, from hypoxic rats; N+EPOR group: hearts perfused with KH buffer containing  $5 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, the first 15 min of reperfusion, from normoxic rats; IH+EPOR group: hearts perfused with KH buffer containing  $5 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, the first 15 min of reperfusion, from hypoxic rats; (○) individual values; (●) means  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$  vs. the other groups, one-way ANOVA.

effect was dose-dependent, since the protection conferred by rhEPO was efficient at  $5 \text{ U ml}^{-1}$  and not at  $0.5 \text{ U ml}^{-1}$ . Moreover, this beneficial effect was not observed in hearts treated with  $10 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO. These results were in accordance with a previous work showing a dose-dependent response to rhEPO, with a significant improvement of functional recovery in isolated rabbit hearts perfused with  $0.5\text{--}5 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO before ischemia, whereas no effect is observed with  $10 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO (Shi et al., 2004). It is thus important to determine the exact beneficial rhEPO dose able to protect the myocardium against ischemic injury view to the reduced efficacy margin of this molecule.

In our study, we observed that rhEPO administration induced protection against infarction, whereas it has no effect on hemodynamic parameters following ischemia–reperfusion. However, an improvement of the functional recovery conferred by rhEPO, following ischemic event, has been reported in other works (Cai and Semenza, 2004; Shi et al., 2004; Wright et al., 2004). This discrepancy can be explained by a difference in species (rabbit versus rat) or in the ischemia–reperfusion protocol used. Another explanation could be that in protected hearts, rhEPO administration might lengthen the stunning which is a contractile dysfunction that persists after reperfusion following a severe but brief ischemic insult. This is despite the absence of irreversible damage and restoration of adequate coronary flow. It might explain the lack of functional recovery improvement despite a larger number of viable cells during the reperfusion, induced by rhEPO treatment.

#### 4.2. Effect of rhEPO on deleterious myocardial consequences of intermittent hypoxia

In the second part of this study, we confirmed our previous results on deleterious consequences of IH in term of aggravation of cardiac sensitivity to the infarction (Beguín et al., 2005). Indeed, we showed an increase in infarct size after ischemia–reperfusion in hearts from rats previously exposed to 4 h of IH compared to hearts from rats exposed to normoxia. Concerning the effect of rhEPO, we showed that  $5 \text{ U ml}^{-1}$  rhEPO, administered either before or after ischemia, efficiently prevented the higher cardiosensitivity to the infarction induced by previous IH, since in both rhEPO treated hypoxic groups, infarct size was similar to those of normoxic groups, treated or not with rhEPO.

#### 4.3. Mechanisms underlying cardioprotective effects of rhEPO

As rhEPO was directly infused in isolated heart, we concluded that the observed protective effects were due to a direct action of this molecule on cardiac cells, independently of its hematopoietic effect. Considering the short time period between rhEPO administration and the observed effect, it seems that new gene induction is not implicated in cardioprotection observed here.

Mechanisms involved in the prevention of the cellular necrosis induced by rhEPO remain unknown. However, several hypotheses can be proposed.

Table 2  
Hemodynamic data in isolated hearts throughout the ischemia–reperfusion protocol, from normoxic and hypoxic rats, perfused or not by EPO

Groups (n=7)	N	IH	N+EPOS	IH+EPOS	N+EPOR	IH+EPOR
<b>LVDP (mmHg)</b>						
S20	80 ± 4.3	86 ± 4.6	86 ± 5.7	84 ± 7.6	101 ± 4.7	87 ± 6.3
R15	65 ± 12.8	66 ± 7.7	57 ± 5.2	34 ± 10.4	53 ± 5.4	62 ± 8.6
R30	78 ± 6.4	74 ± 4.0	60 ± 4.1	56 ± 9.2	60 ± 6.5	69 ± 8.4
R60	68 ± 4.1	67 ± 2.8	54 ± 2.9	55 ± 6.6	57 ± 5.5	69 ± 5.1
R120	54 ± 5.2	49 ± 2.3	35 ± 3.1	42 ± 4.2	39 ± 3.5	48 ± 3.3
<b>LVEDP (mmHg)</b>						
S20	11 ± 2.7	9 ± 1.1	9 ± 1.1	9 ± 1.7	8 ± 1.7	8 ± 1.7
I15	41 ± 10.3	46 ± 9.7	27 ± 6.8	31 ± 8.3	42 ± 7.8	40 ± 8.8
I29	43 ± 4.9	45 ± 3.8	38 ± 3.9	37 ± 3.1	40 ± 3.7	39 ± 4.4
R15	54 ± 8.0	69 ± 3.1	72 ± 4.9	73 ± 6.1	72 ± 4.9	60 ± 7.5
R30	47 ± 8.1	59 ± 3.1	66 ± 5.1	64 ± 6.9	65 ± 2.8	53 ± 7.4
R60	44 ± 8.0	54 ± 3.8	60 ± 5.2	58 ± 6.7	59 ± 2.2	48 ± 7.4
R120	41 ± 7.0	49 ± 4.7	49 ± 7.5	51 ± 5.8	54 ± 2.5	46 ± 6.7
<b>HR (bpm)</b>						
S20	302 ± 10.8	307 ± 14.0	303 ± 7.9	294 ± 15.8	266 ± 4.1	305 ± 12.9
R15	259 ± 16.0	198 ± 13.2	186 ± 22.7	194 ± 26.2	206 ± 22.1	199 ± 38.8
R30	269 ± 14.5	192 ± 22.2	188 ± 13.7	186 ± 21.1	202 ± 22.2	238 ± 10.6
R60	281 ± 8.1	219 ± 18.3	209 ± 15.5	209 ± 25.8	204 ± 16.0	238 ± 17.6
R120	262 ± 14.2	243 ± 16.1	242 ± 19.8	242 ± 13.9	217 ± 16.3	239 ± 8.9
<b>CF (ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>)</b>						
S20	14 ± 0.9	15 ± 1.0	11 ± 1.7	13 ± 0.5	14 ± 0.6	15 ± 0.9
R15	8 ± 0.4	8 ± 0.6	5 ± 0.4	5 ± 1.6	6 ± 0.5	7 ± 0.8
R30	8 ± 0.4	6 ± 0.7	5 ± 0.5	6 ± 1.3	7 ± 0.4	8 ± 0.6
R60	7 ± 0.3	6 ± 0.5	4 ± 0.4	6 ± 0.4	6 ± 0.3	7 ± 0.6
R120	6 ± 0.4	4 ± 0.3	3 ± 0.5	5 ± 0.3	4 ± 0.2	5 ± 0.4

N group: control hearts perfused with KH buffer only from normoxic rat; IH group: hearts perfused with KH buffer only from hypoxic rat; N+EPOS group: hearts perfused with KH buffer containing 5 U ml<sup>-1</sup> rhEPO, 10 min before ischemia, from normoxic rats; IH+EPOS group: hearts perfused with KH buffer containing 5 U ml<sup>-1</sup> rhEPO, 10 min before ischemia, from hypoxic rats; N+EPOR group: hearts perfused with KH buffer containing 5 U ml<sup>-1</sup> rhEPO, the first 15 min of reperfusion, from normoxic rats; IH+EPOR group: hearts perfused with KH buffer containing 5 U ml<sup>-1</sup> rhEPO, the first 15 min of reperfusion, from hypoxic rats; S20: at 20 min of stabilisation; I15 and 29: at 15 and 29 min of ischemia, respectively; R15, 30, 60 and 120: at 15, 30, 60 and 120 min of reperfusion, respectively; LVDP: left ventricular developed pressure; LVEDP: left ventricular end-diastolic pressure; HR: heart rate; CF: coronary flow. Data are mean ± S.E.M. There was no significant difference between the six experimental groups.

Indeed, the binding of rhEPO to its receptor, expressed in the heart (Tramontano et al., 2003; Wright et al., 2004), induces the homodimerization and phosphorylation of the receptor via the activation of the Janus kinase 2 (Jak 2), leading to the activation of several intracellular signalization pathways. EPOR activation allows the recruitment of secondary messengers such as phosphatidylinositol-3 kinase (PI3 kinase) (Cai and Semenza, 2004), protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinases (MAP kinases, such as ERK 1/2 and p38) (Klingmuller, 1997; Shi et al., 2004).

PI3K and ERK 1/2, two key factors in protection against ischemia–reperfusion injury (Hausenloy and Yellon, 2004), have been recently identified as mediators of rhEPO's cardioprotection *in vitro* and *in vivo* in the rat (Bullard et al., 2005). Once activated, PKC is known to induce the opening of the ATP-dependent potassium channels (K<sub>ATP</sub>) (Ito et al., 2001), potentially through MAP kinases activation (Baines et al., 2002). These channels, expressed in the sarcolemma and the mitochondria of cardiac cells (Noma, 1983), are known to be mediators of cardioprotection induced by several preconditionings (Cole et al., 1991; Yellon and Baxter, 1995; Joyeux et al., 1998). Recently it has been shown that K<sub>ATP</sub> channel opening also mediate EPO-

induced cardioprotection (Shi et al., 2004; Joyeux-Faure et al., 2006).

Finally, nitric oxide (NO) seems to be also an important mediator of the cellular protection afforded by rhEPO. Indeed, this molecule stimulates NO release from endothelial cells (Wu et al., 1999) and the cellular effect of rhEPO has been reported to be mediated by the nitric oxide synthase (NOS) in cerebral arteries (Santhanam et al., 2006). In the rat heart, the NOS inhibitor L-NAME abrogates cardioprotection induced by a chronic rhEPO administration (Bullard and Yellon, 2005). Moreover, we showed recently in the rat that rhEPO-induced cardioprotection is also mediated by inducible NOS (iNOS) (Joyeux-Faure et al., 2006). Complementary studies are needed to clarify the exact mechanisms involved in cardioprotective effects conferred by rhEPO against ischemic injury, in the setting or not of IH.

So we showed in this study that rhEPO administration either before or after ischemia is able to reduce the infarct size, in a dose dependent manner, in a model of isolated-perfused rat heart. This protection is also observed in an experimental model of OSAS, where rats have been submitted to IH, 24 h before the ischemia–reperfusion sequence. It is the first time that cardio-

protective effect of rhEPO is shown in a pathological situation associated with higher sensitivity to the infarction. In conclusion our results suggest that the future of rhEPO therapy in ischemic disease is very promising. The protective effect of rhEPO could be of special interest during a cardiac surgery or transplantation, which need the heart to be stopped and so submitted to a cardiac ischemia. The efficiency of rhEPO could also have an interesting clinical potential in the treatment of patient suffering of myocardial infarction, since rhEPO administration should allow to reduce the cellular suffering at the moment of the reperfusion.

A better understanding of the cardioprotective mechanisms of rhEPO based on experimental investigation could lead to carefully conducted clinical studies comparing the relative effectiveness of this protection with more conventional therapeutic strategies. In this purpose, a clinical study to assess the cardioprotective effects of rhEPO against ischemia during cardiac surgery is in progress.

The identification of the cellular basis of the rhEPO preconditioning phenomenon should provide a conceptual framework for developing novel therapeutic strategies maintaining the heart in a sustained or chronic defensive state. We can hope that rhEPO administration will represent pharmacological approach to protection in upcoming years, leading to additional myocardial salvage of the reperfused myocardium.

Additional studies are needed to better understand mechanisms of action of the rhEPO and to determine the optimal dosage of rhEPO which best affords cardioprotection.

## Acknowledgement

This study was supported by a grant from the Conseil Scientifique AGIRadom (Association Grenobloise des Insuffisants Respiratoires, France).

## References

Baines, C.P., Zhang, J., Wang, G.W., Zheng, Y.T., Xiu, J.X., Cardwell, E.M., Bolli, R., Ping, P., 2002. Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ. Res.* 90, 390–397.

Beguín, P.C., Joyeux-Faure, M., Godin-Ribuot, D., Levy, P., Ribuot, C., 2005. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J. Appl. Physiol.* 99, 1064–1069.

Bernaudin, M., Marti, H.H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T., Petit, E., 1999. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 643–651.

Bogoyevitch, M.A., 2004. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc. Res.* 63, 208–216.

Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M., Cerami, A., 2000. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10526–10531.

Bullard, A.J., Govewalla, P., Yellon, D.M., 2005. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res. Cardiol.* 100, 397–403.

Bullard, A.J., Yellon, D.M., 2005. Chronic erythropoietin treatment limits infarct-size in the myocardium in vitro. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 19, 333–336.

Cai, Z., Manalo, D.J., Wei, G., Rodriguez, E.R., Fox-Talbot, K., Lu, H., Zweier, J.L., Semenza, G.L., 2003. Hearts from rodents exposed to intermittent

hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108, 79–85.

Cai, Z., Semenza, G.L., 2004. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 109, 2050–2053.

Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leń, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A., Brines, M., 2003. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodelling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4802–4806.

Cole, W.C., McPherson, C.D., Sontag, D., 1991. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ. Res.* 69, 571–581.

Ehrenreich, H., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Cepek, L., Lewczuk, P., Stiefel, M., Rustenbeck, H.H., Breiter, N., Jacob, S., Knerlich, F., Bohn, M., Poser, W., Ruther, E., Kochen, M., Gefeller, O., Gleiter, C., Wessel, T.C., De Ryck, M., Itri, L., Prange, H., Cerami, A., Brines, M., Siren, A.L., 2002. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol. Med.* 8, 495–505.

Fletcher, E.C., 2001. Invited review: physiological consequences of intermittent hypoxia—systemic blood pressure. *J. Appl. Physiol.* 90, 1600–1605.

Hausenloy, D.J., Yellon, D.M., 2004. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc. Res.* 61, 448–460.

Hirata, A., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Fujita, M., Tsukamoto, O., Wakeno, M., Myoishi, M., Okada, K., Koyama, H., Komamura, K., Takashima, S., Shinozaki, Y., Mori, H., Tomoike, H., Hori, M., Kitakaze, M., 2005. Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 19, 33–40.

Ito, K., Sato, T., Arita, M., 2001. Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels during reoxygenation in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* 532, 165–174.

Joyeux-Faure, M., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., 2005. Erythropoietin and myocardial protection: what's new? *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 439–446.

Joyeux-Faure, M., Ramond, A., Beguin, P.C., Belaidi, E., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., 2006. Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20, 51–56.

Joyeux, M., Amaud, C., Godin-Ribuot, D., Demenge, P., Lamontagne, D., Ribuot, C., 2002. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc. Res.* 55, 619–625.

Joyeux, M., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., 1998. Resistance to myocardial infarction induced by heat stress and the effect of ATP-sensitive potassium channel blockade in the rat isolated heart. *Br. J. Pharmacol.* 123, 1085–1088.

Juul, S.E., Yachnis, A.T., Christensen, R.D., 1998. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum. Dev.* 52, 235–249.

Klingmüller, U., 1997. The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells—signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur. J. Biochem.* 249, 637–647.

Noma, A., 1983. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147–148.

Parsa, C.J., Kim, J., Riel, R.U., Pascal, L.S., Thompson, R.B., Petrofski, J.A., Matsumoto, A., Stamler, J.S., Koch, W.J., 2004. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279, 20655–20662.

Partinen, M., Guilleminault, C., 1990. Daytime sleepiness and vascular morbidity at seven-year follow-up in obstructive sleep apnea patients. *Chest* 97, 27–32.

Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S., Masuda, S., Sasaki, R., 1998. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 26–32.

Santhanam, A.V., Smith, L.A., Nath, K.A., Katusic, Z.S., 2006. In vivo stimulatory effect of erythropoietin on endothelial nitric oxide synthase in cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*

- Shi, Y., Rafiee, P., Su, J., Pritchard Jr., K.A., Tweddell, J.S., Baker, J.E., 2004. Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res. Cardiol.* 99, 173–182.
- Stoohs, R., Guilleminault, C., 1992. Cardiovascular changes associated with obstructive sleep apnea syndrome. *J. Appl. Physiol.* 72, 583–589.
- Tramontano, A.F., Muniyappa, R., Black, A.D., Blendea, M.C., Cohen, I., Deng, L., Sowers, J.R., Cutaia, M.V., El-Sherif, N., 2003. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 990–994.
- van der Meer, P., Lipsic, E., Henning, R.H., de Boer, R.A., Suurmeijer, A.J., van Veldhuisen, D.J., van Gilst, W.H., 2004. Erythropoietin improves left ventricular function and coronary flow in an experimental model of ischemia–reperfusion injury. *Eur. J. Heart. Fail.* 6, 853–859.
- Williams, R.S., Benjamin, I.J., 2000. Protective responses in the ischemic myocardium. *J. Clin. Invest.* 106, 813–818.
- Wright, G.L., Hanlon, P., Amin, K., Steenbergen, C., Murphy, E., Arcasoy, M.O., 2004. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia–reperfusion injury. *FASEB J.* 18, 1031–1033.
- Wu, X.C., Johns, E.J., Richards, N.T., 1999. Relationship between erythropoietin and nitric oxide in the contraction of rat renal arcuate arteries and human umbilical vein endothelial cells. *Clin. Sci. (Lond.)* 97, 413–419.
- Yellon, D.M., Baxter, G.F., 1995. A “second window of protection” or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 1023–1034.

## 4.2 Effets de la trimétazidine sur les conséquences myocardiques délétères induites par l'hypoxie intermittente

Dans cette étude, nous avons étudié les mécanismes potentiellement impliqués dans la cardiosensibilisation à l'I/R provoquée par l'HI. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'une altération du métabolisme énergétique provoquée par l'HI pourrait être à l'origine d'une diminution du rendement énergétique, causée par une moins bonne utilisation de l'O<sub>2</sub> et donc une synthèse d'ATP moins efficace.

Dans cette optique, nous avons étudié chez le rat soumis ou non à l'HI, les effets d'un traitement chronique par la TMZ sur la taille de l'infarctus mesurée après une ischémie-reperfusion sur cœur isolé.

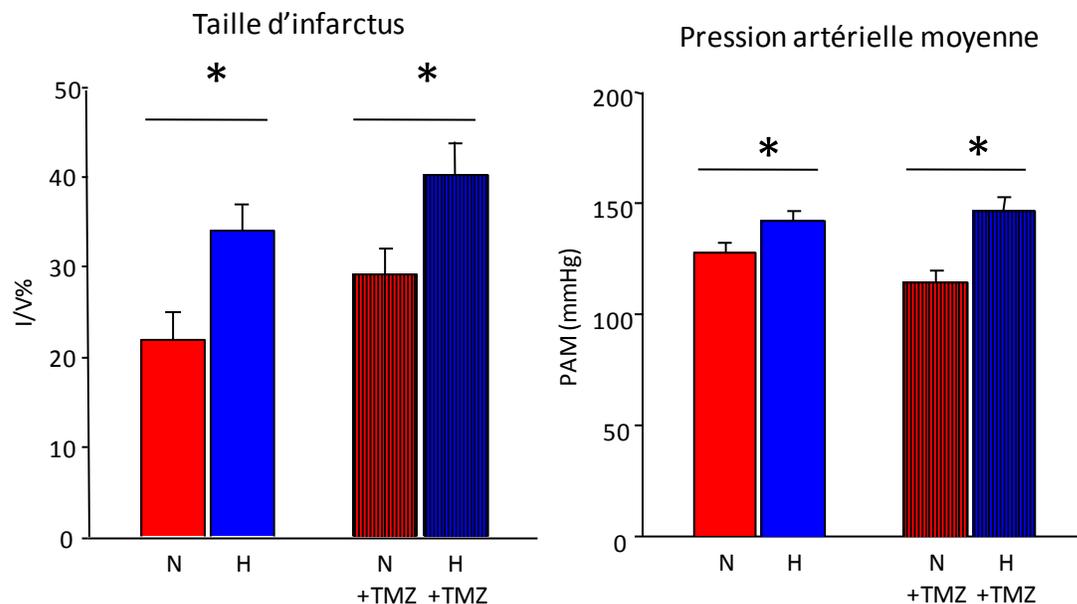
Des rats mâles Wistar ont été divisés en deux groupes expérimentaux, et soumis à une HI chronique (groupe HI) ou à la normoxie (groupe N). L'HI a consisté en des cycles répétés d'une minute (30 s de FiO<sub>2</sub> 5% suivies de 30 s de normoxie), 8 h par jour pendant la période de sommeil des animaux, et ce sur une durée de 14 jours. Les animaux contrôles ont été soumis à des cycles de normoxie se déroulant dans les mêmes conditions, à la différence près que la FiO<sub>2</sub> restait constante à 21%. Au terme des 14 jours d'exposition, la PAM a été mesurée par cathétérisme carotidien. Certains cœurs de rats ont ensuite été prélevés, isolés et perfusés, puis soumis à une I/R à la fin de laquelle la taille de l'infarctus a été évaluée.

La PAM a significativement augmentée dans le groupe HI comparé au groupe N, de même que les tailles d'infarctus, exprimées en pourcentage de la taille des ventricules ( $34,0 \pm 2,8\%$  dans le groupe HI versus  $21,8 \pm 3,1\%$  dans le groupe N).

Le traitement par la TMZ, administrée dans les croquettes (10 mg/jour), pendant les 14 jours d'HI, n'a pas empêché l'aggravation de l'infarctus induite par l'HI ( $40,1 \pm 3,6\%$  dans le groupe HI+TMZ versus  $29,1 \pm 2,9\%$  dans le groupe N+TMZ,  $p < 0,005$ ). La TMZ n'a pas eu plus d'effets sur l'augmentation de PAM.

En conclusion, il semblerait que l'aggravation de l'infarctus induite par l'HI n'implique pas de modification métaboliques.

Ces résultats, présentés à la figure 14, ont fait l'objet d'une présentation sous forme de poster au congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), du 2 au 3 avril 2009 à Nancy.



**Figure 14 : Effet de la trimétazidine sur la taille d'infarctus et la pression artérielle moyenne après 14 jours de traitement et d'HI**

I/V : taille de l'infarctus par rapport à celle du ventricule, exprimée en pourcentage  
PAM : pression artérielle moyenne

#### 4.3 Effets du tempol et de la mélatonine sur les conséquences myocardiques délétères induites par l'hypoxie intermittente

Dans cette étude, nous avons exploré les mécanismes délétères potentiellement impliqués dans la cardiosensibilisation du cœur à l'infarctus induite par l'HI, en nous intéressant plus particulièrement au rôle du stress oxydant et à l'action de deux agents anti-ischémiques, le tempol et la mélatonine.

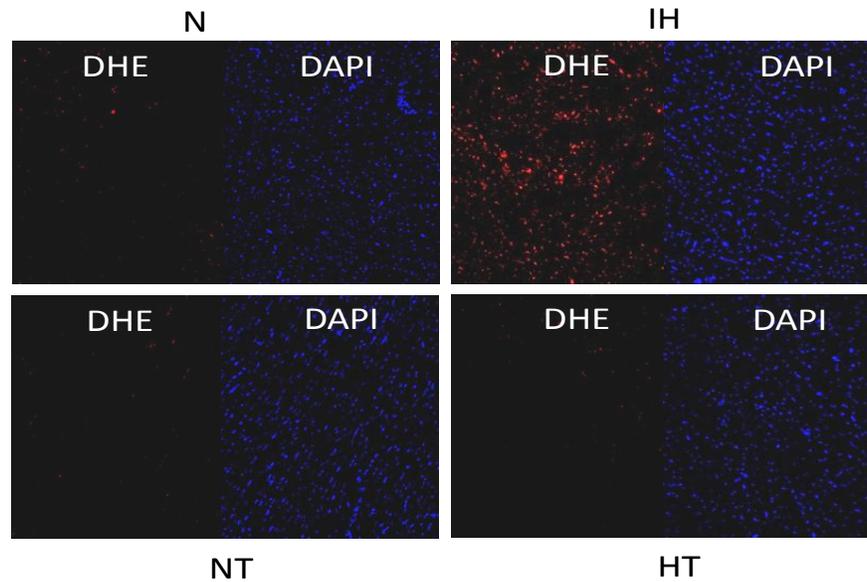
Des rats mâles Wistar ont été divisés en deux groupes expérimentaux, et soumis à une HI chronique (groupe HI) ou à la normoxie (groupe N). L'HI a consisté en des cycles répétés d'une minute (30 s de FiO<sub>2</sub> 5% suivies de 30 s de normoxie), 8 h par jour pendant la période de sommeil des animaux, et ce sur une durée de 14 jours. Les animaux contrôles ont été

soumis à des cycles de normoxie se déroulant dans les mêmes conditions, à la différence près que la  $FiO_2$  reste constante à 21%. Au terme des 14 jours d'exposition, la PAM a été mesurée par cathétérisme carotidien. Certains cœurs de rats ont ensuite été prélevés, isolés et perfusés, puis soumis à une I/R à la fin de laquelle la taille de l'infarctus a été évaluée.

D'autres cœurs de rats ont été utilisés pour évaluer la production in situ d' $O_2^-$ , au moyen d'un marquage au DHE. L'expression de la sous-unité activatrice de la NADPH oxydase, la protéine cytosolique p47-phox, a été évaluée par la technique de western blot.

Nous avons observé que la PAM augmente significativement dans le groupe HI, comparé au groupe N. La taille de l'infarctus, exprimée en pourcentage de la taille des ventricules, est significativement augmentée dans le groupe HI ( $34,0 \pm 2,8\%$  versus  $21,8 \pm 3,1\%$  dans le groupe N). Dans le groupe HI, le taux de stress oxydant est plus important que dans le groupe N. En effet, la fluorescence mesurée après le marquage au DHE dans le groupe HI ( $19,5 \pm 5,3$  unités arbitraires (UA)) est significativement plus élevée que celle mesurée dans le groupe N ( $6,3 \pm 1,0$  UA). Enfin, on observe dans le groupe HI une augmentation de l'expression de la sous-unité p47-phox de la NADPH oxydase, après 14 jours d'hypoxie.

Le tempol, administré dans l'eau de boisson à la dose de 1mM pendant les 14 jours d'exposition à l'HI, permet de prévenir ces effets puisque la taille de l'infarctus mesurée chez les animaux traités est comparable entre les groupes HI ( $24,8 \pm 2,8\%$ ) et N ( $27,9 \pm 4,0\%$ ), de même que la PAM après 14 jours d'HI. Le tempol prévient également la génération d' $O_2^-$  dans le cœur, puisque la fluorescence au DHE est comparable entre les animaux hypoxiques et normoxiques traités ( $2,8 \pm 0,8$  UA dans le groupe H versus  $5,9 \pm 1,2$  UA dans le groupe N, voir la figure 15 ci-après). Enfin, le traitement par le tempol empêche l'augmentation de l'expression de la p47-phox.



**Figure 15 : Complément des résultats sur le marquage au DHE, non présenté dans la publication suivante**

La mélatonine administrée dans l'eau de boisson à la dose de 100 mg/l pendant les 14 jours d'HI, prévient elle aussi la sensibilité à l'infarctus induite par l'HI puisque les valeurs de taille d'infarctus après traitement sont comparables entre les groupes HI ( $36,3 \pm 3,2\%$ ) et N ( $37,5 \pm 5,2\%$ ).

En conclusion, le stress oxydant semble jouer un rôle important dans les effets cardiovasculaires induit par l'HI chez le rat, en particulier dans l'augmentation de la susceptibilité myocardique à l'infarctus. Ceci pourrait être dû à une augmentation de la production d' $O_2^-$ , faisant suite à une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase.

Ces travaux, présentés ci-après, ont été soumis au *Journal of Applied Physiology* en novembre 2010.

**Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia**

Amandine Ramond<sup>a,b</sup>, Diane Godin-Ribuot<sup>a,b</sup>, Christophe Ribuot<sup>a,b</sup>, Sandrine Cachot<sup>a,b</sup>, Patrick Lévy<sup>a,b</sup>, Marie Joyeux-Faure<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM, ERI17, Grenoble, F-38042 France

<sup>b</sup> Université Grenoble 1, Faculté de Médecine, IFR1, Grenoble, F-38042 France

**Short title:** oxidative stress mediates IH-induced infarction aggravation

**\* Corresponding author**

Marie Joyeux-Faure

Laboratoire HP2

Université Grenoble 1,

Institut Jean Roget, BP 170

38042 GRENOBLE Cedex 9 – France

Tel: 33 476 637 413

Fax: 33 476 637 178

Email: marie.joyeux@ujf-grenoble.fr

## **Abstract**

We have previously shown that chronic intermittent hypoxia (IH), a component of the obstructive sleep apnea syndrome, increases heart sensitivity to infarction. We aimed to investigate the deleterious mechanisms potentially involved in the IH-induced infarction aggravation, investigating the role of oxidative stress.

Male Wistar rats were divided in two experimental groups subjected to chronic IH or normoxia (N). IH consisted of repetitive 1-min cycles (30 s with inspired O<sub>2</sub> fraction 5% followed by 30 s normoxia) and was applied for 8 h during daytime, for 14 days. After the 14-day exposure, mean arterial blood pressure (MABP) and infarct size, measured on isolated hearts after ischemia-reperfusion, were significantly increased by IH compared to normoxia exposure. Tempol treatment during the 14-day IH exposure prevented both deleterious effects. IH induced oxidative stress, as measured by dihydroethidium level and p47-phox expression (the cytosolic protein required for the activation of the NADPH oxidase). These effects were also abolished by tempol treatment.

Melatonin administration during the 14-day IH exposure also prevented both IH-induced infarction aggravation and increase in MABP.

In conclusion, oxidative stress appears to mediate the deleterious cardiovascular effects of IH in the rat and, in particular, the increased myocardial susceptibility to infarction.

**Keywords:** Intermittent hypoxia, Myocardial infarction, Tempol, Melatonin, Oxidative stress, Rats.

## Introduction

In the general US population, 2% of women and 4% of men are affected by obstructive sleep apnea (OSA) syndrome, characterized by episodic cessation of airflow during sleep (42). This syndrome is associated with an increased cardiovascular morbidity and mortality (24,26,35). Patients with OSA syndrome have higher rates of cardiovascular diseases such as systemic hypertension (8), coronary heart disease (31) and stroke (2,40). Moreover, sleep-disordered breathing is common in patients with cardiovascular diseases and is a significant predictor of coronary artery disease (31). In particular, sleep apnea is common in the setting of acute myocardial infarction and may be a factor predisposing to, or even causing, sudden death in patients with acute phase of myocardial infarction (10,29).

Recurrent intermittent hypoxia (IH) is a consequence of sleep apnea that seems to be the key factor involved in both acute and chronic cardiovascular consequences (19,28). Several animal models have been developed to address the effect of IH on the cardiovascular system (for review, see (6)). Thus, it has been described that repeated exposures to IH elicit persistent changes in a variety of physiological responses, in particular in vascular reactivity (17,21), and can also alter myocardial ischemia-reperfusion tolerance (4). In particular, we have shown in the rat that of a 14 or 35-day exposure to IH modify myocardial ischemia-reperfusion tolerance, increasing infarction (3,16). However, the exact mechanisms underlying the IH-related changes in ischemia-reperfusion tolerance are not yet elucidated. Thus we decided to investigate the role of oxidative stress in the deleterious mechanisms potentially involved in IH-induced infarction aggravation.

Tempol is a stable free radical that mimics the effect of superoxide dismutase (SOD), by reducing superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ). Unlike SOD, tempol permeates biologic membranes, and hence can prevent deleterious effects of  $O_2^{\cdot-}$  being produced intracellularly. Several studies evidenced the cardiovascular protective effect of this molecule, both *in vitro* and *in vivo*. Thus, two weeks of tempol treatment reduced MABP in spontaneously hypertensive rats (SHR) (38) as well as in Sprague Dawley rats exposed to eucapnic IH (39). Mac Donald et al. (25) showed that pretreatment of myocardial cells with tempol attenuated the mitochondrial respiration alterations induced by  $H_2O_2$ . Tempol administered at the time of reperfusion also reduced myocardial infarction following a regional ischemia caused by occlusion of the left ascending coronary artery *in vivo* in rodents (rats and rabbits). The same observation was made on isolated perfused rat

heart model, where hearts reperfused with tempol in the buffer solution exhibited a lower infarct size than control hearts (25).

Melatonin is a pineal hormone, secreted into the blood in a circadian manner regulating various physiological and neuroendocrine functions (37). It has been recently demonstrated that several rat tissues including thymus, spleen, liver, kidney and heart have the necessary machinery to synthesize melatonin, which would indicate an endogenous synthesis, and potential physiological actions of melatonin on these tissues (14). Melatonin is well known as a potent scavenger of toxic free radicals, such as peroxynitrites, hydroxyl and peroxy radicals (5,12,34). This hormone also activates antioxidative enzymes and modulates their gene expression by interacting with specific nuclear sites (1,36). Thus, melatonin has been found to be effective in protecting against the release of reactive oxygen species (ROS) in various conditions such as the ischemia-reperfusion sequence. Indeed, we have previously shown that melatonin is able to prevent ischemia-reperfusion injuries occurring in the isolated rat heart, decreasing arrhythmias occurrence and infarction development (18). Recent data have suggested that part of the cytoprotective effect of melatonin may be due to its action at the mitochondrial level (22). Indeed, Petrosillo et al. (32) previously reported that melatonin protected the heart from reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening which is considered as a critical event in heart reperfusion injury (15).

The aim of this study was therefore to investigate whether tempol and melatonin treatments could prevent the IH-related increase in infarction, by protecting the heart from ROS.

## **Material and methods**

The animal care complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (7th ed.), Nath. Acad. Press, 1996. Male Wistar rats (250-350 g) were provided by Janvier (Le Genest-St-Isle, France), housed in controlled conditions and provided with standard rat chow.

### *Intermittent hypoxia protocol*

Rats were separated randomly into two groups: in the first group (IH, n = 42) rats were exposed to intermittent hypoxia, in the second group (N, n = 42), rats were exposed to air. During intermittent hypoxia protocol, timed solenoid valves were used to distribute pure nitrogen to each

chamber where animals were housed *via* a balloon reservoir at a flow adjusted in order to reduce the ambient inspired oxygen fraction ( $FiO_2$ ) to 5% for 30 s. This was followed by infusion of compressed air for 30 s, allowing a rapid return of ambient air i.e.  $FiO_2$  of 21%. This 1-min cycle was repeated for 8 h during daytime on 14 consecutive days. At the same time that nitrogen was distributed to hypoxia chambers, compressed air was distributed at the same flow rate to normoxic chambers, thereby submitting normoxic and hypoxic animals to similar noise and airflow disturbances. A dampening device at the chamber intake was used to dissipate the air-stream arriving on the animals. The level of  $FiO_2$  in the chambers was controlled throughout the hypoxia protocol using a Beckman OM11  $O_2$  analyzer (Fullerton, CA, USA).

### *Experimental groups*

Six experimental groups were studied:

- two groups (n=8 in each group) were treated with melatonin (N-acetyl-5-methoxy-tryptamine, Sigma-Aldrich), administered in water (100 mg/l, (39)) changed each day, during the 14-day normoxia (N+mel group) or intermittent hypoxia (IH+mel group) exposure.
- two groups (n=11 in each group) were treated with tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl, Sigma-Aldrich), administered in water (1 mM, adapted from (41)) changed each day, during the 14-day normoxia (N+temp group) or intermittent hypoxia (IH+temp group) exposure. Some hearts were used for isolated heart preparation (n=7 in both N+temp and IH+temp groups). The rest was used for oxidative stress measurement (n=4 in each group for DHE staining and NADPH expression).
- two corresponding normoxic and hypoxic control groups (n=23 in each group) in which animal received regular water, but without drug. Some hearts were used for isolated heart preparation (n=19 in each N and IH group). The rest was used for oxidative stress measurement (n=4 in each N and IH group for DHE staining and NADPH expression).

### *Mean Arterial Blood Pressure Measurement*

The day after the completion of the 14-day normoxia or IH period, the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60 mg/kg, Sanofi, Libourne, France). Heparin (500 U/kg, Sanofi Winthrop, Gentilly, France) was injected intravenously and mean arterial blood pressure (MABP) was measured as previously described (16). The right carotid artery of the rats

was cannulated with polyethylene tubing (PE-50) connected to a pressure transducer (Statham), and arterial blood pressure was recorded on a data-acquisition system (PowerLab, ADInstruments). Hematocrit was measured by collecting blood in a specific glass tube (Brand, Finland) and centrifuging for 2 min at 1,000 rpm.

#### *Ischemia-reperfusion on isolated heart*

Hearts were rapidly excised and immersed in 4°C Krebs-Henseleit (KH) solution (in mM: 118.0 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 25.2 NaHCO<sub>3</sub>, and 11.0 glucose). The aortic stump was cannulated, and the heart was perfused using the Langendorff technique at a constant pressure (70 mmHg) with oxygenated Krebs-Henseleit buffer, as previously described (16). A water-filled latex balloon, coupled to a pressure transducer, was inserted into the left ventricular cavity via the left atrium for pressure recording. Left ventricular end-diastolic pressure was adjusted between 5 and 10 mmHg. Myocardial temperature was measured by a thermoprobe inserted into the left ventricle and was maintained constant close to 37°C. After 20 min of stabilization, a no-flow global ischemia was induced by stopping the perfusion for 30 min. Thereafter, the heart was reperfused for 120 min. Coronary flow (CF) was measured periodically throughout the ischemia-reperfusion procedure, by collecting the effluent. Heart rate (HR) and left ventricular developed pressure (LVDP = difference between left ventricular systolic pressure and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP)) were continuously recorded. At the end of the ischemia-reperfusion protocol, the atria were removed, and the heart was frozen at -20°C for 10 min. It was then cut into 2-mm transverse sections from apex to base (6–7 slices/heart). Once thawed, the slices were incubated at 37°C with 1% triphenyltetrazolium chloride in phosphate buffer (pH 7.4) for 10 min, fixed in 10% formaldehyde solution and photographed to clearly distinguish stained viable tissue from unstained necrotic tissue. Infarct size (I) was determined using a computerized planimetric technique (Image Tool for Windows) and expressed as a percentage of the ventricular size (V).

Only hearts with CF within 10-16 ml min<sup>-1</sup> and LVDP > 70 mmHg at the end of the stabilization period were included in this study.

### *Dihydroethidium staining*

Dihydroethidium (DHE), a molecule freely permeable to cells, was used to assess in situ the production of  $O_2^{\cdot-}$ . Indeed, in presence of  $O_2^{\cdot-}$ , DHE is oxidized in ethidium, a fluorescent product, who stains the nuclei by DNA-binding. Ethidium is non permeable to cell membranes. Thus, DHE fluorescence allows determining the levels of oxidative stress in cells. Hearts from N, IH, N+temp, IH+temp groups (n=4 per group) were rapidly frozen in optimum cutting temperature (OCT) compound (TissueTek) and stored at  $-80^{\circ}C$  until assayed. Frozen sections (8  $\mu m$ ) of myocardium were incubated with DHE in PBS (10  $\mu M$ ) at room temperature for 15 min in a light-protected and humidified chamber. In situ fluorescence was assessed using fluorescence microscopy. Images were analyzed using Image J software.

### *Western blot analysis of myocardial NADPH oxidase expression*

Total rat heart samples from N, IH, N+temp, H+temp groups (n=4 per group) submitted to 14 days of normoxia or IH were homogenized in lysis buffer (Tris HCl pH 7,4 50mM, EDTA 5 mM, NaF 1 mM, Orthovanadate 1 mM), and centrifuged at 100 000 g for 60 min to remove membrane, nuclei and debris. Supernatants were collected and protein concentrations assessed using Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Scientific). Proteins were separated on a 12% SDS-acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes, which were incubated with anti-p47-phox (1/500; Santa Cruz sc-14015) or p67-phox (1/500; Santa Cruz sc-15342) antibody, overnight at  $4^{\circ}C$ . Bound antibody was visualized by use of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1/5000; Santa Cruz sc-2004). Equal loading was confirmed by GAPDH immunoblotting, on deshybridated membranes. Relative densitometry was computerized (Image J software).

### *Statistical analysis of data*

Hemodynamic data, infarct size, DHE staining fluorescence intensity and western blot analysis relative densitometry data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (s.e.m.). Infarct size, MABP, DHE staining and western blot data were compared by using two-way analysis of variance (ANOVA), with exposure and treatment corresponding to each factor. Hemodynamic data were analyzed by using two-way repeated-measures ANOVA. *Post hoc* multiple comparisons were performed by using Tukey tests. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### *1. Body weight and hematocrit*

After the 14-day IH period, body weight was significantly lower and hematocrit was significantly higher in hypoxic than in normoxic groups, whatever the treatment (Table 1).

### *2. Effects of melatonin treatment*

*Effects on blood pressure:* MABP was significantly enhanced in the IH group compared with the N group. Melatonin treatment abolished the MABP increase induced by IH since there was no difference between MABP when comparing N+mel and IH+mel groups (Figure 1).

*Effects on myocardial infarction and ventricular function after ischemia-reperfusion:* In accordance with our previous results (3), figure 2 shows that infarct size was significantly higher in the IH ( $40.3 \pm 3.5\%$ ) than in the N ( $29.4 \pm 3.7\%$ ) groups. Melatonin treatment prevented the aggravation of infarction induced by IH exposure since the infarct size was comparable in the IH+mel ( $36.3 \pm 3.2\%$ ) and the N+mel ( $37.5 \pm 5.2\%$ ) groups.

As shown in Table 2, after 30-min global ischemia, CF, LVDP and its derivative ( $dP/dt_{max}$ , an index of contractility) decreased markedly at reperfusion in all hearts. Ischemia also significantly increased LVEDP in all hearts. All parameters measured (CF, HR, LVDP, LVEDP, and  $dP/dt_{max}$ ) were not significantly different between the four groups throughout the ischemia-reperfusion protocol. No difference in functional ventricular recovery was seen between the four groups during reperfusion. Hence, neither IH exposure nor melatonin treatment modified the ventricular functional recovery after ischemia-reperfusion.

### *3. Effects of tempol treatment*

*Effects on blood pressure:* As previously shown, MABP was significantly enhanced in the IH group compared with the N group. Tempol treatment abolished the MABP increase induced by IH since there was no MABP difference in N+temp and IH+temp (Figure 1).

*Effects on myocardial infarction and ventricular function after ischemia-reperfusion:* As previously shown, myocardial infarct size was significantly higher in the IH ( $34.0 \pm 2.8\%$ ) than in the N ( $21.8 \pm 3.1\%$ ) groups. Tempol treatment significantly prevented the aggravation of

infarction induced by IH exposure since the infarct size was not different between the IH+temp ( $24.8 \pm 2.8\%$ ) and N+temp ( $27.9 \pm 4.0\%$ ) groups (Figure 3).

As shown in Table 3, after 30-min global ischemia, CF, LVDP and  $dp/dt_{max}$ , decreased markedly at reperfusion and LVEDP increased significantly during ischemia in all hearts. All parameters measured were not significantly different between the four groups throughout the ischemia-reperfusion protocol. No difference in functional ventricular recovery was seen between the four groups during reperfusion. Hence, neither IH exposure nor tempol treatment modified the ventricular functional recovery after ischemia-reperfusion.

*Effects on myocardial oxidative stress:* The in situ production of  $O_2^-$ , evaluated by DHE fluorescence, was significantly enhanced in the IH group compared with the N group. Tempol treatment abolished the DHE fluorescence increase induced by IH since there was no difference between the N+temp and IH+temp groups (Figure 4).

*Effects on NADPH oxidase expression:* p47-phox expression was significantly higher in the IH group than in the N group. This increase was abolished by tempol treatment. However, no significant difference in p67-phox expression was observed in the IH group compared to the N group.

## **Discussion**

In this study, we have demonstrated that chronic treatment by tempol and melatonin were able to prevent the deleterious myocardial effects induced by intermittent hypoxia exposure. Indeed, both treatments when given concomitantly to the 14-day IH exposure prevented the infarct size increase observed after an ischemia followed by reperfusion, on isolated rat hearts. Tempol and melatonin treatments were also able to prevent IH-induced MABP increase in the rats. Moreover, we showed that tempol prevented the superoxide anion generation in hypoxic hearts, since the  $O_2^-$  levels in tempol treated hypoxic rat hearts were comparable to normoxic conditions. This beneficial effect is probably due to tempol antioxidant/SOD mimetic effect, but may also be mediated by a lesser activation of NADPH oxidase, since the increase in p47-phox subunit expression observed in the hypoxic group was abolished by tempol treatment.

It has been recently shown in Sprague Dawley rats that the TNF-induced increase in  $O_2^-$  contributes to mitochondrial damage in the left ventricle by impairing respiratory complex I

activity (23). These deleterious effects are prevented by tempol treatment which seems to interrupt primarily mitochondrial ROS generation in this model. Tempol also prevents post ischemic activation of NADPH oxidase and xanthine oxydase in isolated perfused guinea pigs hearts subjected to ischemia reperfusion (7). In this model, NADPH oxidase activation is mediated by endothelin-1 (ET-1) and  $O_2^-$  production (probably of mitochondrial origin), leading to endothelial dysfunction. In a model of Dahl salt-sensitive hypertensive rats, 10 weeks of tempol treatment allowed to slightly reduce the blood pressure, and to normalize the left ventricular hypertrophy. These effects were associated with a decrease in myocardial NADPH oxidase activity and p22-phox and gp91-phox expression (13). In a rabbit model of chronic heart failure (CHF), an increase in mRNA and protein expression of the rostral ventrolateral medulla (RVLM) p40-phox, p47-phox and p91-phox subunits of the NADPH oxidase was showed. However, as observed in our study on IH, the p67-phox mRNA and protein expression did not increase with CHF. This increased in NADPH oxidase expression was correlated with an increase of in situ  $O_2^-$  production in RVLM of these CHF rabbits. In this model, the enhanced renal sympathetic activity was reduced in a similar manner by tempol and apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, suggesting an action of tempol on this enzyme (11). Thus, all these studies suggest a relation between tempol and NADPH oxidase expression and/or activity. In vivo, when given at the time of reperfusion, tempol reduced the infarct size in rats or rabbits after coronary ligation and reperfusion (25). Tempol treatment also abolished the increase in MABP induced by a 14-day eucapnic IH exposure in rat and decreased both superoxide generation and ET-1 expression (39). Taken together with the present results, tempol appears to counteract IH-induced MABP increase and infarction aggravation, by reducing oxidative stress and  $O_2^-$  production.

Several recent studies reported evidence that melatonin has significant protective effects against cardiac alterations occurring during ischemia-reperfusion, through its action on mitochondria (30). In ischemic/reperfused rat heart, melatonin is able to lower lipid peroxidation, and to prevent loss in mitochondrial complex I and III activities. In addition, melatonin prevents the increase in  $H_2O_2$  production and cardiolipin peroxidation, and also directly protects mitochondrial electron transport chain complexes from oxidative damage (33). Moreover, melatonin inhibits MPTP opening induced by cardiac ischemia-reperfusion, thus reducing necrotic damage (32). Finally, melatonin is able to prevent hypoxia-induced cellular damage, as observed during asphyxia in newborns (9). Indeed, it reduced the level of oxidative and nitrosamide stress markers

in newborns who became asphyxic soon after birth, when compared to untreated children. This protective effect of melatonin may be due to its antioxidant properties as well as to its ability to increase the efficiency of mitochondrial electron transport.

Thus, the protective effects of the two anti-ischemic drugs tested in the present study, i.e. tempol and melatonin, suggest that oxidative stress plays a pivotal role in the deleterious cardiovascular consequences of IH. Since oxidative stress has been shown to be correlated to the severity of OSA (20,27), it could thus potentially contribute to the development of hypertension and coronary heart disease in OSA patients. Additional studies are now required to explore more precisely the mechanisms by which oxidative stress is involved in these deleterious cardiovascular effects and to enable the development of clinical perspectives and novel therapeutic strategies for OSA syndrome.

## List of Abbreviations

ANOVA	analysis of variance
AU	arbitrary units
CHF	chronic heart failure
CF	Coronary flow
DHE	dihydroethidium
ET-1	endothelin-1
FiO <sub>2</sub>	inspired oxygen fraction
HR	heart rate
IH	intermittent hypoxia
I	infarct size
LVDP	left ventricular developed pressure
LVEDP	left ventricular end-diastolic pressure
MABP	mean arterial blood pressure
MPTP	mitochondrial permeability transition pore
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoxide anion
OSA	obstructive sleep apnea
ROS	reactive oxygen species
RVLM	rostral ventrolateral medulla
SHR	spontaneously hypertensive rats
SOD	superoxide dismutase
V	ventricular size

## References

1. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, and Menendez-Pelaez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *Faseb J* 10: 882-890, 1996.
2. Arzt M, Young T, Finn L, Skatrud JB, and Bradley TD. Association of sleep-disordered breathing and the occurrence of stroke. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 1447-1451, 2005.
3. Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, and Godin-Ribuot D. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 53: 1309-1317, 2009.
4. Belaidi E, Ramond A, Joyeux-Faure M, Levy P, Ribuot C, and Godin-Ribuot D. *Contrasting effects of intermittent hypoxia on myocardial ischemic tolerance*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009, p. 2-18.
5. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, and Szabo C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 23: 106-116, 1997.
6. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, and Levy P. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *Ilar J* 50: 262-281, 2009.
7. Duda M, Konior A, Klemenska E, and Beresewicz A. Preconditioning protects endothelium by preventing ET-1-induced activation of NADPH oxidase and xanthine oxidase in post-ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol* 42: 400-410, 2007.
8. Duran-Cantolla J, Aizpuru F, Martinez-Null C, and Barbe-Illa F. Obstructive sleep apnea/hypopnea and systemic hypertension. *Sleep Med Rev* 13: 323-331, 2009.

9. Fulia F, Gitto E, Cuzzocrea S, Reiter RJ, Dugo L, Gitto P, Barberi S, Cordaro S, and Barberi I. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J Pineal Res* 31: 343-349, 2001.
10. Gami AS, Howard DE, Olson EJ, and Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 352: 1206-1214, 2005.
11. Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, and Zucker IH. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ Res* 95: 937-944, 2004.
12. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, and Szabo C. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 60: PL169-174, 1997.
13. Guo P, Nishiyama A, Rahman M, Nagai Y, Noma T, Namba T, Ishizawa M, Murakami K, Miyatake A, Kimura S, Mizushige K, Abe Y, Ohmori K, and Kohno M. Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of left ventricular failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats: effects of angiotensin II blockade. *J Hypertens* 24: 1097-1104, 2006.
14. Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 65: 2001-2018, 2008.
15. Hausenloy DJ, and Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 35: 339-341, 2003.
16. Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Beguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C, Launois SH, Bessard G, and Levy P. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol* 98: 1691-1696, 2005.
17. Julien C, Bayat S, and Levy P. Vascular reactivity to norepinephrine and acetylcholine after chronic intermittent hypoxia in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 139: 21-32, 2003.

18. Lagneux C, Joyeux M, Demenge P, Ribuot C, and Godin-Ribuot D. Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Life Sci* 66: 503-509, 2000.
19. Lavie L, and Lavie P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur Respir J* 33: 1467-1484, 2009.
20. Lavie L, Vishnevsky A, and Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 27: 123-128, 2004.
21. Lefebvre B, Godin-Ribuot D, Joyeux-Faure M, Caron F, Bessard G, Levy P, and Stanke-Labesque F. Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 150: 278-286, 2006.
22. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, and Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 75: 765-790, 2004.
23. Mariappan N, Elks CM, Fink B, and Francis J. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction. *Free Radic Biol Med* 46: 462-470, 2009.
24. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, and Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 365: 1046-1053, 2005.
25. McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J, Cuzzocrea S, and Thiernemann C. Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 27: 493-503, 1999.
26. McNicholas WT, and Bonsignore MR. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J* 29: 156-178, 2007.

27. Monneret D, Pepin JL, Godin-Ribuot D, Ducros V, Baguet JP, Levy P, and Faure P. Association of urinary 15-F<sub>2t</sub>-isoprostane level with oxygen desaturation and carotid intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients. *Free Radic Biol Med* 48: 619-625, 2010.
28. Morgan BJ. Vascular consequences of intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol* 618: 69-84, 2007.
29. Nakashima H, Katayama T, Takagi C, Amenomori K, Ishizaki M, Honda Y, and Suzuki S. Obstructive sleep apnoea inhibits the recovery of left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 27: 2317-2322, 2006.
30. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Reiter RJ, and Ruggiero FM. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res* 48: 297-310, 2010.
31. Peker Y, Hedner J, Kraiczi H, and Loth S. Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 81-86, 2000.
32. Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N, Fiore T, and Paradies G. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1487-1493, 2009.
33. Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, and Paradies G. Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *Faseb J* 17: 714-716, 2003.
34. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, and Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 55: PL271-276, 1994.
35. Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, Gottlieb DJ, Newman AB, O'Connor GT, Rapoport DM, Redline S, Resnick HE, Robbins JA, Shahar E, Unruh ML, and Samet JM. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med* 6: e1000132, 2009.

36. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, and Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 60: 2255-2271, 1997.
37. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 79: C153-158, 1991.
38. Schnackenberg CG, and Wilcox CS. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha. *Hypertension* 33: 424-428, 1999.
39. Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, and Kanagy NL. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H2971-2976, 2007.
40. Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, and Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med* 353: 2034-2041, 2005.
41. Yeung HM, Hung MW, and Fung ML. Melatonin ameliorates calcium homeostasis in myocardial and ischemia-reperfusion injury in chronically hypoxic rats. *J Pineal Res* 45: 373-382, 2008.
42. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, and Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 328: 1230-1235, 1993.

## Figure and table legends

Figure 1. Mean arterial blood pressure (MABP) assessed in anaesthetized rats previously exposed for 14 days to either intermittent hypoxia (IH group) or normoxia (N group) and treated with tempol (temp, 1 mM in water, n=11) or melatonin (mel, 100 mg/l in water, n=8) or untreated (n=11 in IH and N groups) throughout exposure.. Data are mean  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$  vs. N group, two-way ANOVA.

Figure 2. Infarct size expressed as a percentage of the ventricular size (I/V) in isolated hearts subjected to 30-min global ischemia followed by 120-min reperfusion, from rats exposed for 14 days to either intermittent hypoxia (IH group) or normoxia (N group) and treated or not with melatonin (mel, 100 mg/l in water) throughout exposure. Data are mean  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$  vs. N group, two-way ANOVA.

Figure 3. Infarct size expressed as a percentage of the ventricular size (I/V) in isolated hearts subjected to 30-min global ischemia followed by 120-min reperfusion, from rats exposed for 14 days to either intermittent hypoxia (IH group) or normoxia (N group) and treated or not with tempol (temp, 1 mM in water) throughout exposure. Data are mean  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$  vs. N group, two-way ANOVA.

Figure 4. Dihydroethidium (DHE) fluorescence expressed in arbitrary units (AU) in hearts of rats exposed for 14 days to either normoxia (N group) or intermittent hypoxia (IH group) and treated or not with tempol throughout exposure. Values are means  $\pm$  s.e.m. from 4 animals in each group.\* $P < 0.05$  vs. N group, two-way ANOVA.

Figure 5. Western blot analysis of (A) cytosolic ventricular p47-phox content and (B) cytosolic ventricular p67-phox content of rats exposed for 14 days to either normoxia (N group) or intermittent hypoxia (IH group) and treated or not with tempol throughout exposure. \* $P < 0.05$  vs. N group, two-way ANOVA. Density data are expressed in arbitrary units (AU) and are means  $\pm$  s.e.m. from 4 animals in each group.

Table 1. Body weight and hematocrit in the six experimental groups, after 14 days of exposure to intermittent hypoxia or normoxia.

Data are means  $\pm$  s.e.m.\* $P < 0.05$  vs. N corresponding group, two-way ANOVA.

Table 2. Hemodynamic data throughout the ischemia-reperfusion protocol in isolated hearts, from control and melatonin-treated groups.

S20: after 20 min of stabilization, R15: after 15 min of reperfusion, R30: after 30 min of reperfusion, R60: after 60 min of reperfusion, R120: after 120 min of reperfusion. Data are means  $\pm$  s.e.m.

Table 3. Hemodynamic data in isolated hearts throughout the ischemia-reperfusion protocol, from control and tempol-treated groups.

S20: after 20 min of stabilization, R15: after 15 min of reperfusion, R30: after 30 min of reperfusion, R60: after 60 min of reperfusion, R120: after 120 min of reperfusion. Data are means  $\pm$  s.e.m.

**Table 1.** Body weight and hematocrit in the six experimental groups, after the 14-days hypoxic or normoxic exposure.

Groups	N	IH	N+mel	IH+mel	N+temp	IH+temp
<b>Body weight (g)</b>	411 ± 5	382 ± 6*	401 ± 12	377 ± 15*	400 ± 8	385 ± 9*
<b>Hematocrit (%)</b>	46 ± 2	57 ± 2*	43 ± 1	53 ± 1*	44 ± 1	58 ± 2*

Data are means ± s.e.m.\* $P < 0.05$  vs. N corresponding group, two-way ANOVA.

**Table 2.** Hemodynamic data in isolated hearts throughout the ischemia-reperfusion protocol, from control and melatonin treated groups.

Groups		N	IH	N+mel	IH+mel
<b>LVDP (mmHg)</b>	S20	101 ± 7	106 ± 9	78 ± 5	94 ± 6
	R15	26 ± 8	15 ± 6	28 ± 10	23 ± 10
	R30	52 ± 8	22 ± 6	38 ± 10	37 ± 12
	R60	69 ± 4	54 ± 5	48 ± 7	55 ± 8
	R120	54 ± 5	48 ± 3	41 ± 4	46 ± 4
<b>LVEDP (mmHg)</b>	S20	10 ± 0	9 ± 1	10 ± 1	10 ± 1
	I15	53 ± 9	57 ± 9	44 ± 13	50 ± 1
	I29	51 ± 3	55 ± 4	41 ± 2	51 ± 12
	R15	98 ± 4	100 ± 4	87 ± 2	95 ± 6
	R30	84 ± 4	87 ± 5	79 ± 4	89 ± 6
	R60	75 ± 3	75 ± 6	66 ± 2	80 ± 5
	R120	67 ± 3	66 ± 7	60 ± 2	75 ± 6
<b>dP/dt<sub>max</sub> (mmHg.s<sup>-1</sup>)</b>	S20	2576 ± 249	2568 ± 281	1585 ± 128	2204 ± 301
	R15	452 ± 126	231 ± 61	498 ± 145	291 ± 114
	R30	904 ± 147	374 ± 93	720 ± 193	624 ± 213
	R60	1207 ± 107	960 ± 95	881 ± 143	881 ± 139
	R120	1046 ± 115	942 ± 87	706 ± 74	757 ± 100
<b>HR (bpm)</b>	S20	290 ± 13	294 ± 14	301 ± 14	324 ± 35
	R15	197 ± 64	177 ± 63	288 ± 55	67 ± 32
	R30	166 ± 28	167 ± 39	211 ± 52	186 ± 95
	R60	145 ± 21	244 ± 64	210 ± 24	186 ± 40
	R120	164 ± 21	205 ± 18	201 ± 17	195 ± 28
<b>CF (ml.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>)</b>	S20	13.0 ± 0.5	14.6 ± 0.6	13.7 ± 0.6	13.6 ± 0.8
	R15	4.9 ± 0.6	4.0 ± 0.4	5.7 ± 0.8	4.1 ± 0.7
	R30	4.4 ± 0.5	3.8 ± 0.4	5.5 ± 0.7	3.8 ± 0.7
	R60	4.2 ± 0.5	3.9 ± 0.4	4.7 ± 0.6	3.9 ± 0.7
	R120	3.5 ± 0.4	3.4 ± 0.3	3.8 ± 0.5	3.3 ± 0.6

S20: after 20 min of stabilization, R15: after 15 min of reperfusion, R30: after 30 min of reperfusion, R60: after 60 min of reperfusion, R120: after 120 min of reperfusion. Data are means ± s.e.m.

**Table 3.** Hemodynamic data in isolated hearts throughout the ischemia-reperfusion protocol, from control and tempol treated groups.

<b>Groups</b>	<b>N</b>	<b>IH</b>	<b>N+temp</b>	<b>IH+temp</b>	
<b>LVDP</b>					
<b>(mmHg)</b>	S20	112 ± 7	133 ± 10	103 ± 12	108 ± 7
	R15	32 ± 12	4 ± 2	20 ± 8	1 ± 1
	R30	42 ± 14	15 ± 7	53 ± 14	8 ± 6
	R60	70 ± 4	48 ± 12	68 ± 8	49 ± 10
	R120	61 ± 5	56 ± 5	59 ± 9	61 ± 5
<b>LVEDP</b>					
<b>(mmHg)</b>	S20	9 ± 0	9 ± 1	11 ± 1	10 ± 1
	I15	48 ± 13	58 ± 10	52 ± 13	74 ± 13
	I29	52 ± 4	60 ± 5	51 ± 4.9	58 ± 4
	R15	90 ± 7	104 ± 4	103 ± 8	107 ± 3
	R30	80 ± 8	90 ± 7	90 ± 9	99 ± 5
	R60	67 ± 9	75 ± 10	80 ± 8	87 ± 5
	R120	56 ± 11	61 ± 10	71 ± 8	75 ± 4
<b>dP/dt<sub>max</sub></b>					
<b>(mmHg.s<sup>-1</sup>)</b>	S20	3128 ± 223	3744 ± 255	2931 ± 250	3158 ± 119
	R15	569 ± 197	107 ± 32	333 ± 115	58 ± 17
	R30	782 ± 264	284 ± 121	880 ± 259	168 ± 79
	R60	1335 ± 144	937 ± 226	1294 ± 202	874 ± 185
	R120	1285 ± 129	1209 ± 76	1128 ± 146	1213 ± 79
<b>HR</b>					
<b>(bpm)</b>	S20	285 ± 21	309 ± 16	285 ± 14	305 ± 25
	R15	104 ± 31	119 ± 84	118 ± 40	14 ± 14
	R30	106 ± 31	122 ± 61	122 ± 39	30 ± 20
	R60	158 ± 17	229 ± 115	146 ± 32	143 ± 57
	R120	164 ± 23	176 ± 13	131 ± 21	163 ± 30
<b>CF</b>					
<b>(ml.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>)</b>	S20	11.7 ± 0.8	14.6 ± 0.4	12.3 ± 0.6	13.1 ± 0.3
	R15	3.9 ± 0.9	3.7 ± 0.5	3.4 ± 0.5	3.1 ± 0.3
	R30	3.5 ± 0.7	3.6 ± 0.6	3.5 ± 0.5	3.0 ± 0.4
	R60	3.4 ± 0.7	3.7 ± 0.6	3.3 ± 0.5	3.1 ± 0.3
	R120	2.8 ± 0.5	3.1 ± 0.4	2.8 ± 0.4	3.1 ± 0.3

S20: after 20 min of stabilization, R15: after 15 min of reperfusion, R30: after 30 min of reperfusion, R60: after 60 min of reperfusion, R120: after 120 min of reperfusion. Data are means ± s.e.m.

Figure 1

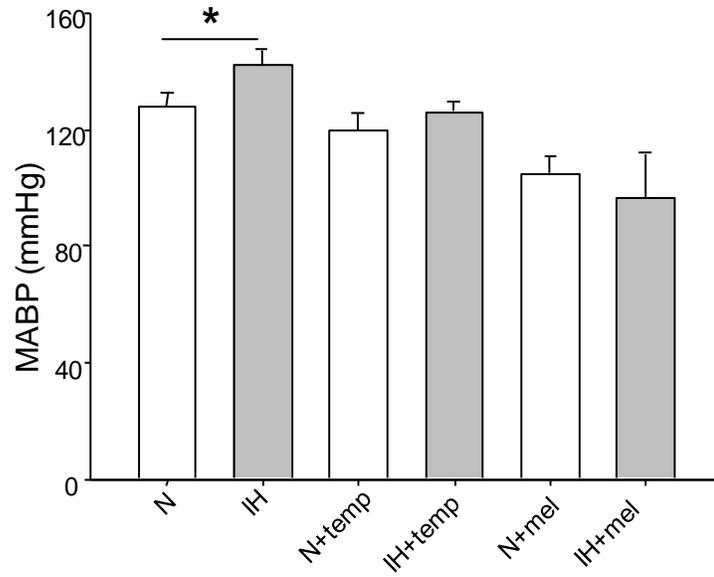


Figure 2

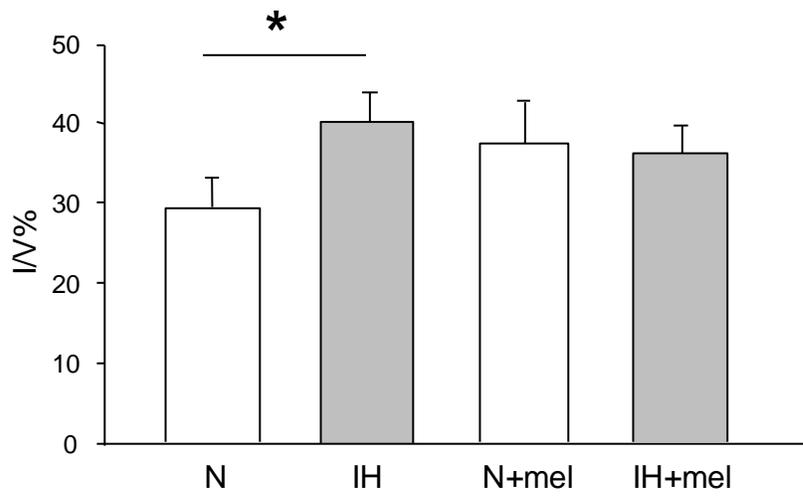


Figure 3

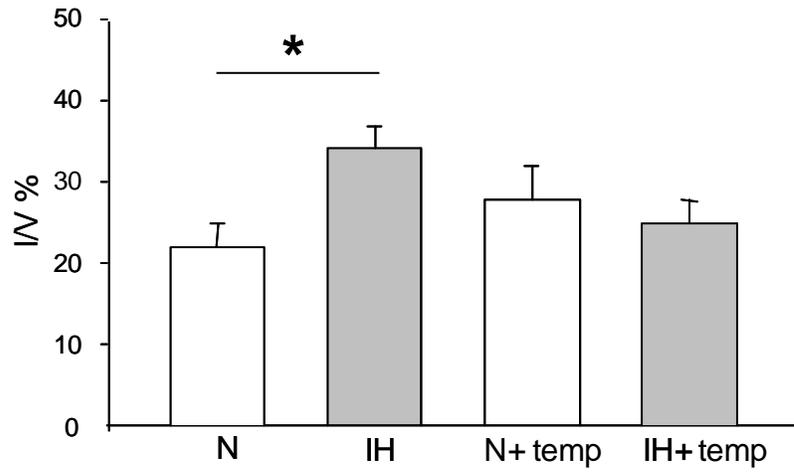


Figure 4

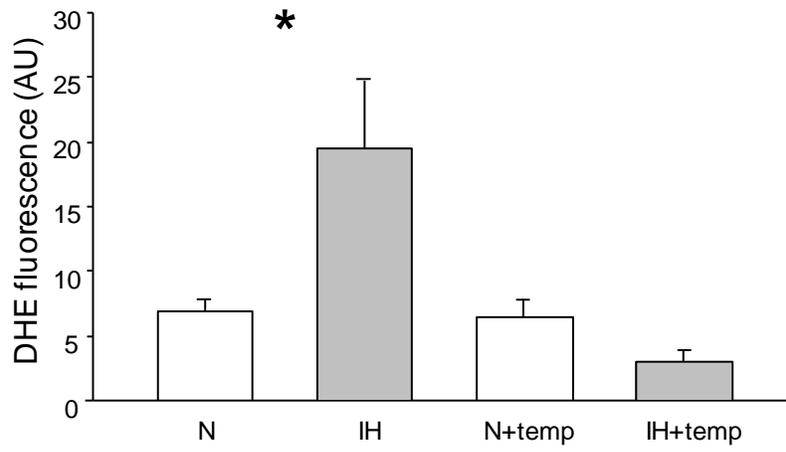
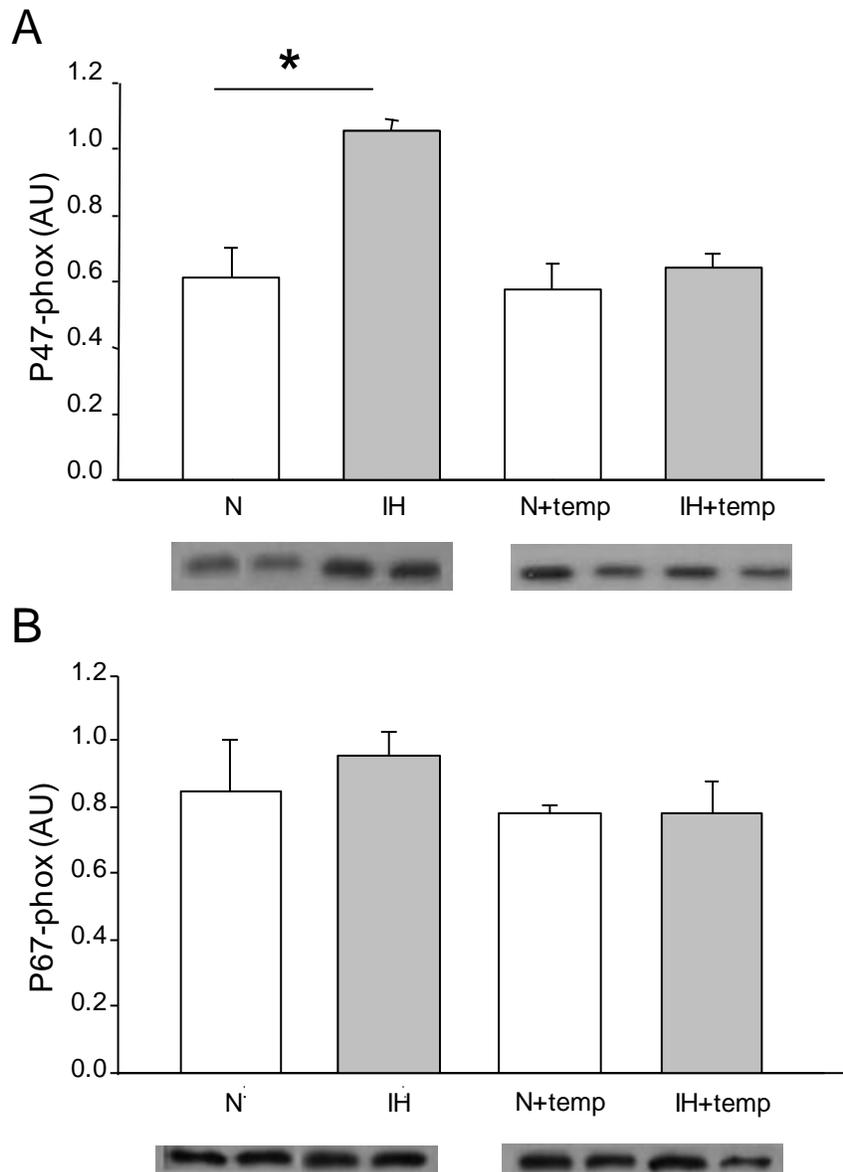


Figure 5



## **5 AUTRES TRAVAUX MENES EN PARALLELES**

En complément de ces travaux de thèse, plusieurs autres études ont été menées, en relation avec les effets cytoprotecteurs de l'EPO ou sur d'autres conséquences myocardiques de l'HI.

## **5.1 Travaux sur les effets protecteurs de l'EPO**

### **5.1.1 Cardioprotection par l'EPO et mécanismes impliqués**

L'administration d'EPO protège contre les lésions ischémiques cardiaques en améliorant la récupération fonctionnelle et en réduisant l'apoptose. Cependant les mécanismes sous-jacents restent inconnus. Dans cette étude, nous avons déterminé le rôle des NOS ainsi que celui des canaux  $K_{ATP}$  et des canaux potassiques calcium dépendants ( $K_{Ca}$ ) dans la cardioprotection précoce induite par l'EPO.

Des rats mâles Wistar ont été divisés en deux groupes expérimentaux traités par de l'EPOrh (5000 IU/kg, i.p.), ou par une solution saline (groupe contrôle). Une heure plus tard, les rats ont été anesthésiés, les cœurs isolés et perfusés selon la méthode Langendorff. Les cœurs ont ensuite été soumis à une ischémie globale et totale de 30 min suivie de 120 minutes de reperfusion.

La récupération fonctionnelle cardiaque, évaluée par la mesure de la pression développée par le ventricule gauche (PDVG), était significativement plus élevée dans le groupe traité par l'EPOrh (PDVG à 30 min de reperfusion : 71,7 +/- 2,3 mmHg), comparée à celle du groupe contrôle (57,4 +/- 5,8 mmHg). Les mêmes effets significatifs ont été observés sur les dérivés de la PDVG, qui sont des indices de contractilité (dP/dt max) et de relaxation (dP/dt min) du cœur.

Le bénéfice du traitement par l'EPOrh est annihilé lorsque les cœurs sont perfusés avant l'ischémie avec un inhibiteur non spécifique des NOS (le N-nitro-L-arginine méthyl ester ou L-NAME), ou avec un inhibiteur spécifique de la iNOS (le N-(3-(aminométhyl)benzyl)acetamidine ou 1400W).

Lorsque les cœurs sont perfusés avec un bloqueur des  $K_{ATP}$  mitochondriaux (5-hydroxydecanoic acid ou 5HD), les effets protecteurs de l'EPO sont également abolis. En

revanche, la paxilline, un inhibiteur des  $K_{Ca}$  n'a pas d'effet chez les animaux traités par l'EPO.

Ainsi, nous avons pu conclure que la iNOS et les  $K_{ATP}$  mitochondriaux sont impliqués dans l'effet protecteur de l'EPO, administrée avant la survenue d'une ischémie dans le cœur isolé de rat.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante.

# Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart

M. Joyeux-Faure\*, A. Ramond, P.C. Béguin, E. Belaïdi, D. Godin-Ribuot, C. Ribuot

Laboratoire HP2, Hypoxie Physio-Pathologie Respiratoire et Cardiovasculaire, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université Grenoble I, France, INSERM ERI 0017, EA 3745, France

## Keywords

erythropoietin,  
functional recovery,  
inducible NOS,  
K<sub>ATP</sub> channels,  
myocardial ischaemia,  
rat

Received 26 August 2005;  
revised 18 November 2005;  
accepted 30 November 2005

\*Correspondence and reprints:  
marie.faure@ujf-grenoble.fr

## ABSTRACT

Administration of recombinant human erythropoietin (rhEPO) is known to induce protection against cardiac ischaemia injury improving functional recovery and reducing apoptosis. But the underlying mechanisms are not elucidated. We determined the role of nitric oxide synthases (NOS) as well as ATP-dependent (K<sub>ATP</sub>) and calcium-activated (K<sub>Ca</sub>) potassium channels in the early cardioprotection induced by rhEPO. Wistar male rats were divided into two experimental groups treated by rhEPO (5000 IU/kg, i.p.) or saline (control group). One hour later, rats were anaesthetized, hearts isolated, retrogradely perfused and submitted to a 30-min no-flow global ischaemia followed by 120 min of reperfusion sequence. Cardiac functional recovery (left ventricular developed pressure, LVDP) was significantly higher in the group treated by rhEPO (LVDP at 30 min reperfusion: 71.7 ± 2.3 mmHg) compared with the control group (57.4 ± 5.8 mmHg). We observed the same significant effect on its derivative (dP/dt). The rhEPO-induced improvement in ventricular function was abolished by perfusion prior to ischaemia with either *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (*L*-NAME, a nonspecific NOS inhibitor) or *N*-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide (1400W, a specific inducible NOS inhibitor) or 5-hydroxydecanoic acid (5HD, a mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel blocker) but not with paxilline (a K<sub>Ca</sub> channel inhibitor). Thus, *in vivo* rhEPO administration provides early preconditioning against ischaemic injury in the isolated perfused rat heart that is dependent on iNOS and mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels.

## INTRODUCTION

Despite multiple significant therapeutic advances, myocardial ischaemia–reperfusion injury is still a major unsolved public health problem throughout the industrialized world. Novel approaches that protect and salvage injured heart tissue are needed to reduce cardiac cell dysfunction and death in patients presenting with acute myocardial ischaemia [1]. In this regard, use of recombinant human erythropoietin (rhEPO) is of special interest. *In vivo* administration of rhEPO to rodents induces dramatic protection against cardiac reperfusion

injury. Indeed, it inhibits apoptosis in rat ventricular myocytes exposed to hypoxia as well as in the *in vivo* rat model of myocardial ischaemia [2,3]. Moreover, rhEPO enhances functional recovery in mice and rat hearts subjected to ischaemia–reperfusion [2,4]. These initial studies did not address the molecular mechanisms underlying the observed cardiac protective effects of rhEPO systemic administration. Additional work has shown that direct perfusion of isolated rat hearts with rhEPO confers an immediate protection against ischaemia–reperfusion improving functional recovery. Rapid activation of potassium channels and various protein

kinases seems to mediate this cardioprotective effect [5,6]. In order to explore the mechanisms involved in the early cardioprotection conferred by prior *in vivo* rhEPO administration, we investigated the potential role of nitric oxide synthases (NOS), and in particular the inducible form (iNOS) using the nonspecific NOS inhibitor *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and the specific iNOS inhibitor 1400W [*N*-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide]. We also determined the role of mitochondrial ATP-dependent (mitoK<sub>ATP</sub>) and calcium-activated (K<sub>Ca</sub>) potassium channels, using specific inhibitors [5-hydroxydecanoic acid (5HD) and paxilline respectively].

## METHODS

### Experimental treatment groups

This investigation conforms to the 'Guide for Care and Use of Laboratory Animals' published by the US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996) and with French law and local ethical committee guidelines for animal research. Experiments were conducted on 76 adult male Wistar rats (weight range 280–350 g) from Elevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France) housed in controlled conditions and provided with standard rat chow.

The rats were randomly divided into two groups treated by either rhEPO (recombinant human epoietin  $\beta$ , 5000 IU/kg, *i.p.* [4]), or equivalent volume of saline (*i.p.*). One hour later, an ischaemia (30 min)/reperfusion (120 min) protocol was performed in isolated hearts. Some hearts were perfused with either  $3 \times 10^{-6}$  M L-NAME [7,8] or  $10^{-5}$  M 1400W [9] or  $10^{-4}$  M 5HD [10,11] or  $10^{-6}$  M paxilline [6], for 10 min before global ischaemia only and not during reperfusion ( $N = 6-8$  hearts per group). The experimental protocol is summarized in Figure 1.

### Ischaemia–reperfusion protocol

One hour after treatment, the rats were anaesthetized with 60 mg/kg *i.p.* sodium pentobarbital and treated with heparin (500 IU/kg, *i.v.*). Their heart was rapidly excised and immediately immersed in 4 °C Krebs–Henseleit buffer solution (mm: NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.2 and glucose 11.0) as in our previous works [8]. The aortic stump was cannulated and the heart perfused retrogradely using the Langendorff technique at a constant pressure (75 mmHg) with oxygenated Krebs–Henseleit buffer, as previously described [12]. A water-filled latex balloon (Hugo Sachs, no. 4), coupled to a pressure transducer, was inserted into the left ventricular cavity via the left atrium for pressure recording. Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) was adjusted between 5 and 10 mmHg. Myocardial temperature was measured by a thermoprobe inserted into the left ventricle and was maintained constant close to 37 °C. After 20 min of stabilization, a no-flow global ischaemia was induced by stopping the perfusion for 30 min. Thereafter the heart was reperfused for 120 min. Coronary flow (CF) was measured punctually throughout the ischaemia–reperfusion procedure, by collecting the effluent. Heart rate (HR) and left ventricular developed pressure (LVDP = difference between left ventricular systolic pressure and LVEDP) were continuously recorded (PC Lab 4S; AD Instruments, Paris, France). Rate pressure product (RPP) was calculated as product of HR and LVDP.

Only hearts with CF within 10–16 mL/min and LVDP > 70 mmHg at the end of the stabilization period were included in this study. Hearts that developed ventricular fibrillation during reperfusion, which could not be restored to normal sinus rhythm within 2 min, were excluded.

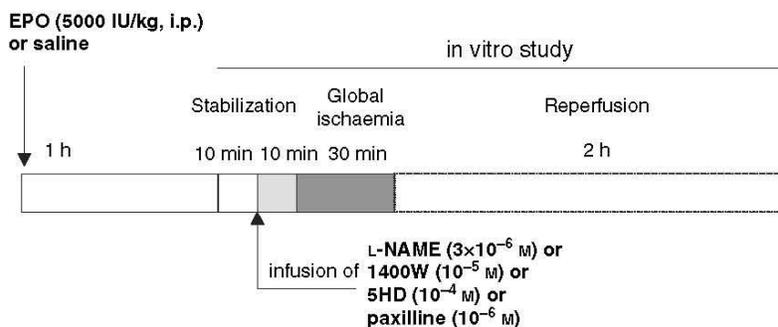


Figure 1 Description of the experimental protocol in rats treated by recombinant human erythropoietin (rhEPO) or saline.

## Materials

rhEPO was kindly provided by Roche (Neuilly sur Seine, France), L-NAME (a nonspecific NOS inhibitor) and 5HD (a  $K_{ATP}$  channel blocker) were from Sigma-Aldrich (Lyon, France), 1400W (a specific iNOS inhibitor) was from Acros Organics (Noisy le Grand, France), paxilline (a  $K_{Ca}$  channel blocker) was from Alexis Corporation (Paris, France).

## Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Infarct size values were compared using one-way analysis of variance (ANOVA). Haemodynamic data were analysed using two-way ANOVA. Post-hoc multiple comparisons were performed using Tukey tests. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

There was no statistically significant difference in CF and HR among the various experimental groups (Table I). Baseline haemodynamic parameters were not affected by the different drug perfusions as they were not different between the control group and all the other groups (Table I).

Upon reperfusion, cardiac functional recovery, as shown by RPP, LVDP and its first derivative ( $dP/dt$  max and min, which are indexes of contractility), was significantly higher in the EPO group than in the control group (Table I and Figure 2).

The rhEPO-induced improvement in heart function was abolished by L-NAME, 1400W and 5HD, but not by paxilline, perfusion (Table I and Figure 2).

## DISCUSSION

The results of this study support two major conclusions. First, rhEPO exerts a cardioprotective effect when administered in vivo, 1 h before an ischaemia-reperfusion sequence in isolated rat heart. Secondly, this form of rhEPO-induced cardioprotection is mediated by NOS, more specifically the inducible form, and by mito $K_{ATP}$  channels, but does not involve  $K_{Ca}$  channels.

### Early cardioprotection conferred by rhEPO

Recently, rhEPO has been shown to induce delayed cardioprotection against ischaemic injury, 12 h [13] to 24 h [4] after in vivo administration. A protective effect is also seen when rhEPO is administered directly to isolated hearts, 10–15 min before ischaemia [5,6,14].

Our study adds to these observations by providing a new window of cardioprotection, 1 h after rhEPO administration, which could have important clinical implications. Thus, erythropoietin can be considered as a pharmacological preconditioning agent representing a novel cardioprotective strategy in the setting of elective myocardial ischaemia as encountered during cardiac surgery and angioplasty.

### RhEPO-induced cardioprotection is mediated by iNOS and $K_{ATP}$ channels

Our results are the first to show that in vivo rhEPO administration can initiate within 1 h preconditioning mechanisms such as iNOS activation and mito $K_{ATP}$  channel opening, leading to cardioprotection against ischaemic injury. Indeed, the beneficial effects of rhEPO were blocked by both the nonspecific NOS inhibitor L-NAME and the specific iNOS inhibitor 1400W. Early activation of iNOS has also been demonstrated 1 h after ischaemic preconditioning [15,16]. In the light of the well-known role of iNOS in preconditioning [17], this should be sufficient to confer cardioprotection. As rhEPO is known to stimulate nitric oxide (NO) release from endothelial cells [18], additional work is needed to determine the localization of iNOS activation in rhEPO preconditioning.

To our knowledge, only one other study has addressed the mediators of rhEPO-induced cardioprotection. However, this study evaluated the direct, receptor-mediated effects, of rhEPO perfusion in the isolated rabbit heart and, consequently, did not observe an involvement of NOS but rather of protein kinases regulating sarcolemmal  $K_{ATP}$  and  $K_{Ca}$  channels [6]. In our study, rhEPO-induced improvement in functional recovery appears to involve mainly mito $K_{ATP}$  channels, as this effect was abolished in hearts perfused with the specific mito $K_{ATP}$  channel blocker 5HD. Opening of these channels has been related to protein kinase C activation [19], potentially through mitogen-activated protein kinases activation [20], and these kinases are activated by rhEPO [6]. But also, the iNOS-catalysed NO generation could potentially open mito $K_{ATP}$  channels, resulting in cardioprotection [21].

Another potassium channel known to protect the heart against ischaemia is the  $K_{Ca}$  channel, located in the inner mitochondrial membrane and the sarcolemma [22]. Direct acute protective effects of rhEPO have been shown to implicate these channels [6]. Our study shows that they do not appear to be involved in rhEPO-induced preconditioning as improvement of cardiac functional recovery was not abolished by perfusion with the  $K_{Ca}$

Table I Haemodynamic data for the 10 experimental groups.

Group	Stabilization	Drugs infusion	Reperfusion			
			15 min	30 min	60 min	120 min
HR (beats/min)						
Control ( <i>n</i> = 8)	316 ± 8	294 ± 7	238 ± 22	217 ± 15	249 ± 9	244 ± 10
EPO ( <i>n</i> = 8)	316 ± 11	285 ± 14	228 ± 18	229 ± 13	244 ± 11	245 ± 11
C + L-NAME ( <i>n</i> = 7)	301 ± 8	268 ± 10	212 ± 24	220 ± 11	260 ± 4	258 ± 11
EPO + L-NAME ( <i>n</i> = 7)	302 ± 11	279 ± 11	187 ± 30	238 ± 25	247 ± 16	241 ± 10
C + 1400W ( <i>n</i> = 6)	329 ± 9	307 ± 10	219 ± 25	256 ± 9	273 ± 6	268 ± 7
EPO + 1400W ( <i>n</i> = 6)	323 ± 12	298 ± 8	214 ± 16	266 ± 14	270 ± 11	270 ± 5
C + 5HD ( <i>n</i> = 7)	285 ± 24	272 ± 23	161 ± 18	198 ± 21	186 ± 22	221 ± 21
EPO + 5HD ( <i>n</i> = 7)	315 ± 9	285 ± 7	196 ± 11	242 ± 9	262 ± 8	243 ± 4
C + paxilline ( <i>n</i> = 6)	298 ± 10	285 ± 5	226 ± 26	204 ± 35	260 ± 12	241 ± 12
EPO + paxilline ( <i>n</i> = 6)	330 ± 6	311 ± 7	214 ± 34	232 ± 26	243 ± 23	264 ± 10
CF (mL/min)						
Control	17.5 ± 0.4	17.3 ± 0.3	10.3 ± 0.5	9.6 ± 0.4	8.5 ± 0.6	7.0 ± 0.6
EPO	16.7 ± 0.7	16.3 ± 0.8	10.7 ± 0.4	10.2 ± 0.3	8.8 ± 0.2	7.6 ± 0.3
C + L-NAME	15.9 ± 0.4	13.9 ± 0.3	8.9 ± 0.4	8.7 ± 0.4	8.1 ± 0.3	6.3 ± 0.3
EPO + L-NAME	18.2 ± 0.9	15.9 ± 0.8	9.6 ± 0.4	9.3 ± 0.4	7.8 ± 0.5	6.1 ± 0.5
C + 1400W	17.1 ± 1.3	17.1 ± 1.7	11.4 ± 0.7	10.9 ± 0.9	9.7 ± 0.6	8.3 ± 0.7
EPO + 1400W	15.7 ± 0.7	16.6 ± 1.1	10.9 ± 1.0	10.2 ± 1.0	9.2 ± 0.9	8.1 ± 0.8
C + 5HD	15.5 ± 0.8	14.9 ± 0.5	8.2 ± 0.6	8.1 ± 0.7	7.1 ± 0.5	6.1 ± 0.3
EPO + 5HD	15.0 ± 0.8	15.3 ± 0.5	9.3 ± 0.3	8.8 ± 0.3	7.5 ± 0.3	6.2 ± 0.2
C + paxilline	17.4 ± 1.2	15.8 ± 1.1	9.4 ± 0.8	9.0 ± 0.7	8.0 ± 0.3	6.8 ± 0.4
EPO + paxilline	16.5 ± 0.6	16.6 ± 0.4	10.0 ± 0.9	9.5 ± 0.9	8.9 ± 0.9	7.7 ± 0.8
LVDP (mmHg)						
Control	91.0 ± 5.2	105.1 ± 3.2	50.2 ± 5.1	57.4 ± 5.8	50.6 ± 5.2	35.9 ± 3.6
EPO	84.9 ± 4.4	93.7 ± 5.8	65.0 ± 3.3*	71.7 ± 2.3*	64.4 ± 2.7*	46.3 ± 2.8*
C + L-NAME	107.7 ± 7.7	116.2 ± 11.4	49.3 ± 7.6	63.1 ± 5.2	58.8 ± 3.7	39.8 ± 3.6
EPO + L-NAME	106.4 ± 7.7	113.1 ± 6.4	47.2 ± 2.7	62.9 ± 2.9	57.8 ± 2.7	44.1 ± 3.2
C + 1400W	86.1 ± 5.2	91.8 ± 5.3	51.2 ± 6.0	64.5 ± 6.8	59.5 ± 5.8	41.3 ± 4.7
EPO + 1400W	95.3 ± 9.5	98.6 ± 8.7	41.7 ± 7.1	57.3 ± 4.6	55.4 ± 4.0	41.0 ± 2.4
C + 5HD	106.3 ± 9.2	110.7 ± 9.4	34.0 ± 6.2	49.4 ± 6.2	46.5 ± 4.2	36.1 ± 3.6
EPO + 5HD	100.3 ± 6.7	115.1 ± 7.6	38.7 ± 8.7	52.4 ± 6.0	49.7 ± 3.0	37.0 ± 2.3
C + paxilline	104.9 ± 10.6	104.4 ± 9.1	42.8 ± 4.4	54.0 ± 7.7	53.1 ± 4.8	37.3 ± 3.8
EPO + paxilline	86.7 ± 4.6	85.5 ± 6.4	62.8 ± 8.4*	63.3 ± 5.3*	59.4 ± 4.8*	41.1 ± 3.7*
RPP (mmHg/min × 10 <sup>3</sup> )						
Control	28.7 ± 1.6	30.8 ± 3.2	11.6 ± 1.4	12.5 ± 1.4	12.5 ± 1.1	8.8 ± 1.0
EPO	26.7 ± 1.3	26.3 ± 1.4	15.0 ± 1.6*	16.6 ± 1.1*	15.9 ± 0.9*	11.8 ± 0.9*
C + L-NAME	30.3 ± 2.2	30.0 ± 2.8	10.0 ± 1.3	13.6 ± 1.0	12.2 ± 1.2	10.0 ± 0.7
EPO + L-NAME	29.9 ± 2.1	29.9 ± 1.9	9.9 ± 1.3	12.9 ± 1.3	12.1 ± 1.0	10.1 ± 0.7
C + 1400W	27.9 ± 1.4	28.3 ± 2.2	11.5 ± 1.9	12.6 ± 1.9	11.1 ± 1.5	10.0 ± 1.0
EPO + 1400W	29.0 ± 3.0	29.2 ± 2.3	9.9 ± 1.7	12.0 ± 2.2	11.8 ± 1.8	9.9 ± 2.4
C + 5HD	29.2 ± 1.9	29.7 ± 3.2	9.9 ± 1.2	10.7 ± 1.5	10.5 ± 1.9	8.9 ± 1.2
EPO + 5HD	30.1 ± 2.1	30.3 ± 1.9	9.8 ± 1.7	12.5 ± 1.2	12.0 ± 0.9	9.0 ± 0.9
C + paxilline	29.6 ± 2.5	29.8 ± 2.6	9.9 ± 1.4	11.6 ± 2.5	11.3 ± 0.9	9.8 ± 1.2
EPO + paxilline	27.6 ± 1.6	27.9 ± 1.5	13.1 ± 0.8*	15.2 ± 1.3*	14.9 ± 1.2*	11.5 ± 1.0*

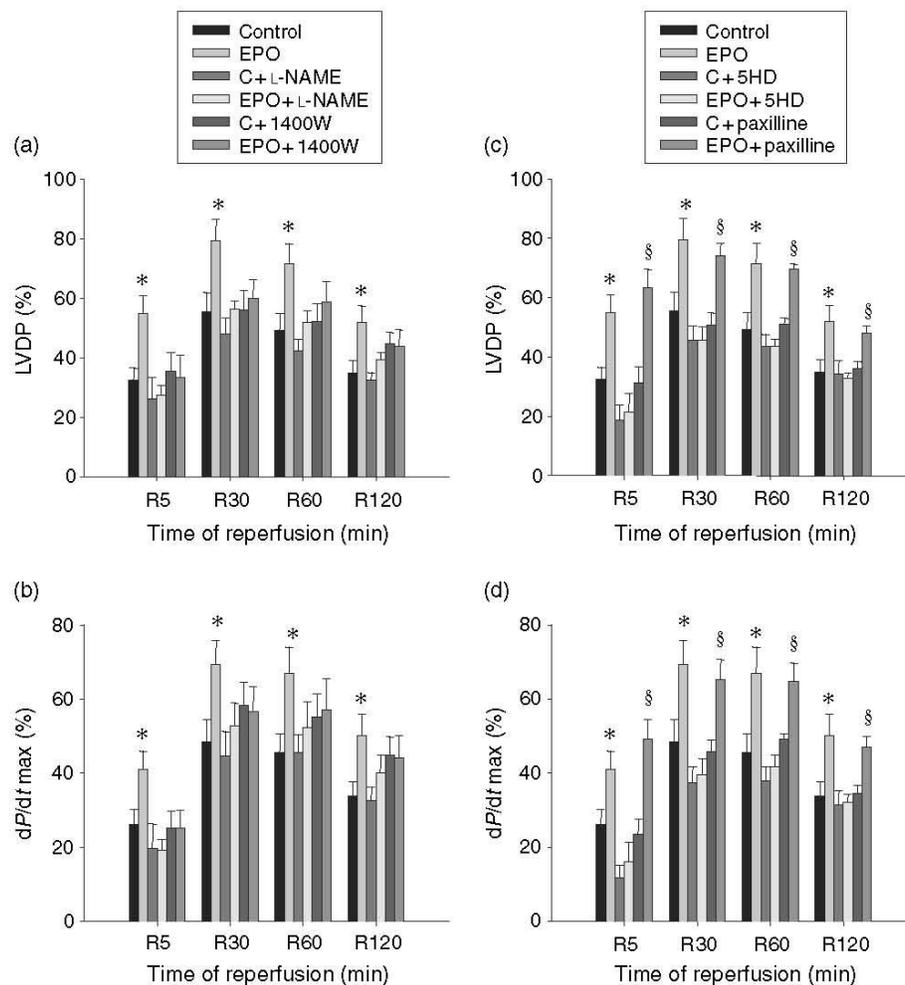
Data are mean ± SEM.

CF, coronary flow; HR, heart rate; LVDP, left ventricular developed pressure; RPP, rate pressure product (HR × LVDP).

\**P* < 0.05 vs. corresponding control group.

channel blocker paxilline. The discrepancy between our results and those from Shi *et al.* could be explained by the different windows of cardioprotection studied (isch-

aemia performed 80 min after *in vivo* rhEPO administration in our protocol and immediately after rhEPO perfusion in the work from Shi *et al.*) as well as



**Figure 2** Left ventricular developed pressure (LVDP: a, c) and maximal  $dP/dt$  (b, d), expressed as percentage of stabilization values, assessed in hearts from rats injected 1 h earlier with recombinant human erythropoietin (rhEPO, 5000 IU/kg, i.p.) or saline (control groups). Isolated hearts were perfused for 10 min with various drug treatments before a no-flow global ischaemia (30 min)/reperfusion (120 min) sequence. (a, b) Effects of *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (L-NAME, an NOS inhibitor,  $3 \times 10^{-6}$  M) or 1400W (a specific iNOS inhibitor,  $10^{-5}$  M) perfusion. (c, d) Effects of 5-hydroxydecanoic acid (5HD, a specific  $mitoK_{ATP}$  channel inhibitor,  $10^{-4}$  M) or paxilline (a specific  $K_{Ca}$  channel inhibitor,  $10^{-6}$  M) perfusion. Data are mean  $\pm$  SEM and were analysed using a two-way ANOVA. \* $P < 0.05$  vs. control group, § $P < 0.05$  EPO + paxilline group vs. C + paxilline group.

interspecies differences (rats were used in our study while Shi et al. used rabbits).

In conclusion, this study expands on recent observations on the time course of rhEPO-induced cardioprotection against ischaemic injury, demonstrating a new early pharmacological preconditioning, 1 h after in vivo EPO administration. We observed here for the first time that this cardioprotective effect is mediated by NOS, more specifically the inducible form. Finally, we also confirm

here the important role of  $mitoK_{ATP}$  channels in the mediation of rhEPO-induced cardioprotection. These observations could open a new field of therapeutic applications.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Conseil Scientifique AGIRadom (Association Grenobloise des

Insuffisants Respiratoires, France). We would like to thank Miss X.R. Chen for her excellent technical work.

## REFERENCES

- Williams R.S., Benjamin I.J. Protective responses in the ischemic myocardium. *J. Clin. Invest.* (2000) **106** 813–818.
- Calvillo L., Latini R., Kajstura J. et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) **100** 4802–4806.
- Tramontano A.F., Muniyappa R., Black A.D. et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) **308** 990–994.
- Cai Z., Manalo D.J., Wei G. et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* (2003) **108** 79–85.
- Cai Z., Semenza G.L. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* (2004) **109** 2050–2053.
- Shi Y., Raffee P., Su J., Pritchard K.A., Jr, Tweddell J.S., Baker J.E. Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res. Cardiol.* (2004) **99** 173–182.
- Yoshida K., Mizukami Y., Kitakaze M. Nitric oxide mediates protein kinase C isoform translocation in rat heart during postischemic reperfusion. *Biochim. Biophys. Acta* (1999) **1453** 230–238.
- Joyeux M., Arnaud C., Godin-Ribuot D., Demenge P., Lamontagne D., Ribuot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc. Res.* (2002) **55** 619–625.
- Price S., Mitchell J.A., Anning P.B., Evans T.W. Type II nitric oxide synthase activity is cardio-protective in experimental sepsis. *Eur. J. Pharmacol.* (2003) **472** 111–118.
- Grover G.J., Murray H.N., Baird A.J., Dzwonczyk S. The KATP blocker sodium 5-hydroxydecanoate does not abolish preconditioning in isolated rat hearts. *Eur. J. Pharmacol.* (1995) **277** 271–274.
- Joyeux M., Godin-Ribuot D., Ribuot C. Resistance to myocardial infarction induced by heat stress and the effect of ATP-sensitive potassium channel blockade in the rat isolated heart. *Br. J. Pharmacol.* (1998) **123** 1085–1088.
- Joyeux-Faure M., Stanke-Labesque F., Lefebvre B. et al. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J. Appl. Physiol.* (2005) **98** 1691–1696.
- Parsa C.J., Kim J., Riel R.U. et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J. Biol. Chem.* (2004) **279** 20655–20662.
- Wright G.L., Hanlon P., Amin K., Steenberg C., Murphy E., Arcasoy M.O. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* (2004) **18** 1031–1033.
- Wang Y., Guo Y., Zhang S.X. et al. Ischemic preconditioning upregulates inducible nitric oxide synthase in cardiac myocyte. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2002) **34** 5–15.
- Zhang F., Oswald T., Holt J., Gerzenshtein J., Lei M.P., Lineaweaver W.C. Regulation of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning of muscle flap in a rat model. *Ann. Plast. Surg.* (2004) **52** 609–613.
- Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2001) **33** 1897–1918.
- Wu X.C., Johns E.J., Richards N.T. Relationship between erythropoietin and nitric oxide in the contraction of rat renal arcuate arteries and human umbilical vein endothelial cells. *Clin. Sci. (Lond.)* (1999) **97** 413–419.
- Ito K., Sato T., Arita M. Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels during reoxygenation in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* (2001) **532** 165–174.
- Baines C.P., Zhang J., Wang G.W. et al. Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ. Res.* (2002) **90** 390–397.
- Han J., Kim N., Joe H., Kim E., Earm Y.E. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2002) **283** H1545–H1554.
- Xu W., Liu Y., Wang S. et al. Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* (2002) **298** 1029–1033.

### 5.1.2 EPO et protection contre l'arrêt cardiaque

L'EPO a de puissants effets cardioprotecteurs vis-à-vis de l'ischémie. Dans cette étude, nous avons voulu évaluer les possibles effets bénéfiques de l'EPO dans une situation de réanimation. Pour cela, l'EPO a été testée dans un modèle d'arrêt cardiaque chez le rat.

Des rats mâles Wistar ont été randomisés dans deux groupes (EPO versus contrôle, n=17 dans chaque groupe). Une fois les rats anesthésiés, les rats ont reçus un bolus intraveineux d'EPOrh (3000 UI/kg), 15 minutes avant l'arrêt cardiaque. Cette administration d'EPO se faisait en aveugle. L'arrêt cardiaque a été provoqué par asphyxie après blocage neuromusculaire. Après 6 min d'ischémie globale, les animaux ont été réanimés par compression externe de la poitrine combinée à une administration d'adrénaline.

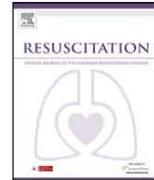
Les paramètres évalués étaient : la restauration de la circulation spontanée, la survie à 1, 24, 48 et 72 h, ainsi que les changements hémodynamiques après l'arrêt cardiaque.

L'injection d'EPO a permis d'améliorer significativement la survie à 72 h (n=15/17) par rapport au group contrôle (n=7/17). Tous les rats traités par l'EPO ont pu être réanimés, tandis que dans le groupe contrôle, seulement 13 rats sur 17 l'ont été. De plus, la dose requise d'adrénaline nécessaire pour réanimer les rats était significativement moindre dans le groupe EPO.

En revanche, aucune différence n'est apparue entre les deux groupes quant aux variations de pression artérielle après la réanimation.

Ainsi, nous avons montré que l'EPO, administrée avant un arrêt cardiaque chez le rat, améliore le taux de réanimation et augmente la survie post-réanimation.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante.



## Experimental paper

Erythropoietin improved initial resuscitation and increased survival after cardiac arrest in rats<sup>☆</sup>Pascal Incagnoli<sup>a,b</sup>, Amandine Ramond<sup>b</sup>, Marie Joyeux-Faure<sup>b,\*</sup>, Jean-Louis Pépin<sup>b</sup>, Patrick Lévy<sup>b</sup>, Christophe Ribuot<sup>b</sup><sup>a</sup> Service d'Anesthésie-Réanimation 2, CHU de Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble cedex 09, France<sup>b</sup> Laboratoire HP2, Hypoxie Physio-Pathologie Respiratoire et Cardiovasculaire, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université Grenoble I, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, EA 3745, Inserm ERI 0017, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 December 2008

Received in revised form 17 March 2009

Accepted 24 March 2009

## Keywords:

Cardiac arrest

Cardiopulmonary resuscitation

Post-resuscitation myocardial dysfunction

Erythropoietin

Survival

Rats

## ABSTRACT

**Introduction:** Recent data have demonstrated potent cardioprotective and neuroprotective effects of the application of growth hormones like erythropoietin (EPO) after focal cardiac or cerebral ischemia. In order to assess possible benefits regarding survival and resuscitation conditions, EPO was tested against placebo in a model of cardiac arrest in the rat.

**Methods:** Thirty-four male Wistar rats were randomized into two groups (EPO versus control;  $n = 17$  per group). Under anesthesia, cardiac arrest was induced by asphyxia after neuromuscular blockade. After 6 min of global ischemia, animals were resuscitated by external chest compression combined with epinephrine administration. An intravenous bolus of recombinant human EPO (rhEPO, 3000 UI kg<sup>-1</sup> body weight, i.v.) or saline (in control group) was performed 15 min before cardiac arrest, by a blinded investigator. Restoration of spontaneous circulation (ROSC), survival at 1, 24, 48 and 72 h and hemodynamic changes after cardiac arrest were studied.

**Results:** Survival to 72 h was significantly improved in the EPO group ( $n = 15/17$ ) compared to the control group ( $n = 7/17$ ). All the EPO-treated rats were successfully resuscitated whereas only 13 of 17 control animals resuscitated. EPO-treated animals required a significantly smaller dose of epinephrine before resuscitation, compared to control rats. Time course of systolic arterial blood pressure after resuscitation revealed no significant differences between both groups.

**Conclusion:** EPO, when administrated before cardiac arrest, improved initial resuscitation and increased the duration of post-resuscitation survival.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Sudden cardiac arrest claims approximately 350,000 lives annually in the United States. Although the initial success rate of cardiopulmonary resuscitation (CPR) is approximately 39%, only 2–12% of resuscitated patients are discharged from hospital in good neurological conditions.<sup>1</sup> Experimental and clinical investigations support the notion that deaths after initially successful resuscitation from cardiac arrest are caused by post-resuscitation impairment in myocardial function<sup>2</sup> and neurological dysfunction.<sup>3</sup> Up to now, despite extensive research, no specific pharmacological cardioprotective or neuroprotective therapy is available.<sup>4,5</sup> Several recent experimental studies suggest that administration of recom-

binant human erythropoietin (rhEPO) plays a neuroprotective<sup>6–9</sup> and cardioprotective<sup>10–13</sup> role in animal models of cerebral ischemia and cardiac ischemic injury due to its antiapoptotic properties.<sup>14–16</sup> One other report also suggests that the application of rhEPO reduces neurological dysfunction in humans suffering from stroke.<sup>17</sup> RhEPO is commonly known as a hematopoietic growth factor that has been in clinical use for the treatment of anemia and had been demonstrated to be safe in humans.<sup>17</sup> Expression of EPO is stimulated following hypoxemic-induced activation of hypoxia-inducible factor (HIF 1). Erythropoietin receptors (EPORs) have been identified in non-hematopoietic tissues, including myocardium, vascular endothelium, neurons and astrocytes.<sup>8,18</sup> These findings, which suggest that erythropoietin acts as a tissue-protective cytokine in the heart and brain, can be very interesting in cardiac arrest for the cell protection during the no-flow or low flow state of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation (CPR). We hypothesized that the administration of rhEPO before cardiac arrest would improve initial resuscitation and outcomes after resuscitation in an experiment model of global cardiac and cerebral ischemia.

<sup>☆</sup> A Spanish translated version of the summary of this article appears as Appendix in the final online version at doi:10.1016/j.resuscitation.2009.03.024.

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 76 63 74 75; fax: +33 4 76 63 71 78.

E-mail address: [marie.faire@ujf-grenoble.fr](mailto:marie.faire@ujf-grenoble.fr) (M. Joyeux-Faure).

## 2. Materials and methods

The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of our Institute. Human care was rendered to all animals in compliance with the “Principles of Laboratory Animal Care” formulated by the National Society for Medical Research and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH publication no. 86-32, revised 1985). All procedures conformed to the framework of the French legislation that control animal experimentation. This blinded, randomized study was performed on 34 male Wistar weighing 380–550 g. All animals were fasted overnight but allowed free access to water.

Rats were randomized into two groups receiving either rhEPO (3000 UI kg<sup>-1</sup>, EPO group) or vehicle (saline, control group) intravenously administered 15 min before the cardiac arrest induction, in an investigator blinded setting.

### 2.1. Animal preparation

The animals were anesthetized with the use of intraperitoneal injections of 45 mg kg<sup>-1</sup> pentobarbital. No additional dose was necessary during the 30 min before the induction of cardiac arrest. The animals were placed in a supine position on a surgical board and the extremities were immobilized. A conventional single lead electrocardiogram (ECG) was attached using subcutaneous needles. The trachea was orally intubated with a 14-gauge cannula mounted on a blunt-tipped needle (Abbotcath-T; Abbott Hospital Inc., North Chicago, Ill) with 145° angled tip. Rats were ventilated with controlled intermittent positive pressure ventilation (IPPV) (Harvard Rodent Ventilator Model, Model 683, Harvard apparatus, Holliston, MA, United States) with a tidal volume of 6.5 ml kg<sup>-1</sup>, a respiratory rate of 100 min<sup>-1</sup> and a fractional inspired oxygen reading of 1.0. A 23-gauge polyethylene catheter (PE 50, Becton Dickinson, Sparks, MD) was advanced into the dorsal vein of the penis for drug administration. A 23-gauge polyethylene catheter (PE 50, Becton-Dickinson, Sparks, MD) was advanced in the right carotid artery for measurement of aortic pressure (monitor Mac Lab 4S, AD instruments, Mountain view, CA). The rectal temperature was monitored and maintained at 37.0 ± 0.5 °C with the aid of warmed blanket (Homeothermic Blanket System, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, United States) during the preparation period, the CPR and the early phase after restoration of spontaneous circulation (ROSC).

### 2.2. Experimental protocol

After 10 min of stabilization, muscular relaxation had been obtained by administering Vecuronium 2 mg kg<sup>-1</sup> (Norcuron®, Organon, Puteaux, France). Fifteen minutes before cardiac arrest, the study drug was administered intravenously. Cardiac arrest was induced by stopping intermittent positive pressure ventilation during 2 min and confirmed by the abrupt decrease in systolic arterial pressure to less than 10 mmHg. After 6 min of global ischemia, advanced cardiac life support including mechanical ventilation (100% O<sub>2</sub>, respiratory rate 60 min<sup>-1</sup> before cardiac massage), closed chest cardiac massage (200 times min<sup>-1</sup>) performed always by the same investigator and epinephrine (0.02 mg kg<sup>-1</sup> body weight) was performed. ROSC was confirmed by spontaneous cardiac rhythm in conjunction with a rise in mean arterial pressure to greater than 50 mmHg for at least 5 min. After 5 min of unsuccessful CPR, resuscitation was stopped and the animals were declared dead. Hemodynamic measurements were continued for 1 h after resuscitation. Ventricular tachycardia and/or fibrillation, defined according to the Lambeth Conventions guidelines,<sup>19</sup> were con-

**Table 1**  
Physiological variables before cardiac arrest.

Groups	Control	EPO
Body weight (g)	464 ± 44	448 ± 44
Preparation time (min)	19 ± 4	19 ± 4
Systolic blood pressure (mmHg)	146 ± 22	151 ± 20
Body temperature (°C)	36.8 ± 0.1	36.7 ± 0.1

Physiological variables in the EPO-treated and control animals during the steady state phase preceding the induction of cardiac arrest. No statistically significant differences were observed between both groups (mean ± S.D.). n = 17 per group.

sidered as severe arrhythmias and were recorded for 1 h after resuscitation. Mechanical ventilation was continued for a total of 2 h. The endotracheal tube and catheters were removed. After recovery from anesthesia, animals were returned to their cages and survival was recorded at 1, 24, 48 and 72 h. After 72 h, the animals were euthanized with an intraperitoneal injection of 100 mg kg<sup>-1</sup> of pentobarbital.

### 2.3. Statistical analysis

Sample size was calculated according to prior data on cardiac arrest. If we assumed that in our model of cardiac arrest the mortality after 72 h will be 50% in the control group and that erythropoietin could decrease the mortality of 40%, with an alpha risk of 0.05 and a power of 0.8, the number of animals needed to be analyzed per group will be 17. Data are presented as mean ± standard deviation (S.D.). Characteristics of animals were compared by using Mann-Whitney or Fisher exact test as appropriate. Blood pressure after resuscitation time was compared between groups by using analysis of variance. Survival between both groups was plotted using Kaplan-Meier curves and compared using log rank tests. These tests are realized in bilateral situation. We considered *p* values of less than 0.05 significant. We used Medcalc (Gant, Belgium) and SAS software for analysis.

## 3. Results

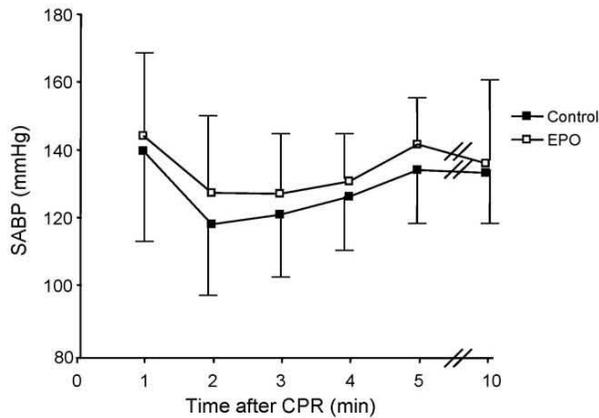
### 3.1. Cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation

Thirty-four rats were investigated. Before cardiac arrest, hemodynamic and physiologic variables were similar in both the EPO and control groups (Table 1). Time from the initiation of asphyxiation to cardiac arrest was similar between groups: 156 ± 44 s in the EPO group and 149 ± 70 s in the control group. No spontaneous ROSC were observed during the period of circulatory arrest. Cardiopulmonary resuscitation in term of ROSC was successful in all of the EPO-treated animals (17 of 17) and in 13 of 17 of the control animals (Table 2). In successfully resuscitated animals, there were no significant differences between the two groups with regard to the duration of cardiopulmonary resuscitation but there were

**Table 2**  
Outcome of cardiopulmonary resuscitation.

Groups	Control	EPO
Duration of asphyxia before cardiac arrest (s)	149 ± 70	156 ± 44
CPR time to ROSC (s)	187 ± 110	142 ± 84
Number of resuscitated animals	76%	100%
Dose of epinephrine for resuscitation (μg)	28 ± 17	16 ± 13*
Systolic arterial blood pressure at ROSC (mmHg)	140 ± 56	144 ± 50
Systolic arterial blood pressure 60 min after ROSC (mmHg)	115 ± 25	120 ± 25

The outcome of the resuscitation in the EPO-treated and control animals after the cardiac arrest. Data are expressed as mean ± S.D. or percentage. CPR: cardiopulmonary resuscitation. ROSC: restoration of spontaneous circulation. n = 17 per group. \* *p* < 0.05.



**Fig. 1.** Time course of systolic arterial blood pressure (SABP) after cardiopulmonary resuscitation (CPR), in EPO-treated or control rats subjected to 6 min of asphyxiation. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. No significant difference was seen between the two groups.

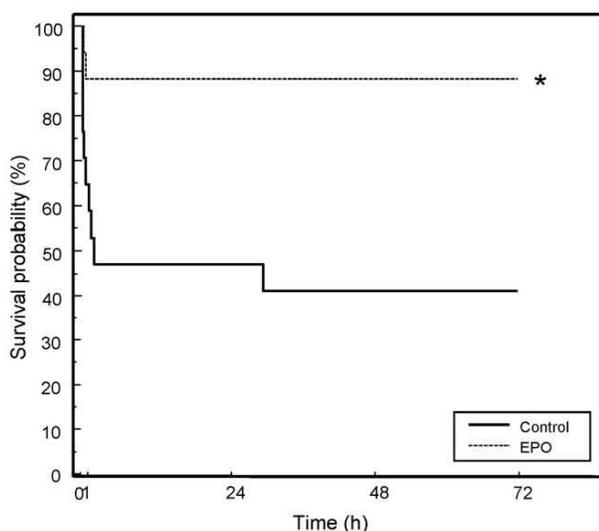
significant differences between the two groups with regard to the total epinephrine dose necessary to restore spontaneous circulation which was smaller in the EPO-treated animals.

### 3.2. Early reperfusion after cardiac arrest

After return of spontaneous cardiac function, there was a systolic peak of blood pressure during 1 min in the two groups. Then it returned to or below baseline, depending on the animal, but there were no major difference between the EPO and control groups (Fig. 1). Moreover in both groups, we did not observed severe arrhythmias at the phase of reperfusion.

### 3.3. Overall survival

Survival after cardiac arrest was monitored for 3 days. The survival rate was 88% in the EPO group (15 of 17) at 1, 24, 48 and 72 h versus 64% (11 of 17) at 1 h, 47% (8 of 17;  $p=0.028$ ) at 24 h, 41% (7 of 12;  $p=0.012$ ) at 48 and 72 h in the control group (Fig. 2).



**Fig. 2.** Kaplan–Meier plot of cumulative survival following 3 days after cardiac arrest revealed significant difference in survival at 24, 48 and 72 h after 6 min of asphyxial cardiac arrest, between the EPO and control groups. \* $p<0.05$ , by a log rank test.

## 4. Discussion

In the present experimental study, a single dose of EPO administered before cardiac arrest shows for the first time beneficial effect on ROSC and survival. We also demonstrated that the total dose of epinephrine necessary to restore spontaneous circulation was lower in the EPO group compared to the control group and that EPO administration did not lead to difference in hemodynamic variables after ROSC. After successful resuscitation from cardiac arrest, post-resuscitation myocardial dysfunction or neuronal damage has been implicated in early post-resuscitation death. In a recent experimental study,<sup>20</sup> repeated high doses of EPO (5 min before cardiac arrest and 24 and 72 h after cerebral ischemia) show no beneficial effects on neuronal recovery after global cerebral ischemia due to cardiac arrest induced by ventricular fibrillation. Neurological deficit scoring and neuronal survival reveal no difference in the EPO-treated group compared to the control group and the caspase activity assay to determine anti-apoptotic properties of EPO reveals no difference between the two groups. Beneficial effect of EPO on post-resuscitation myocardial dysfunction and survival following an asphyxial cardiac arrest has only been observed when EPO was administered 3 min after return of spontaneous circulation.<sup>21</sup> Here, we observed that EPO administration 15 min before cardiac arrest improved survival and resuscitation conditions, showing that EPO could be considered as a preconditioning agent inducing cellular protection in this setting.

In our study, the improved initial resuscitation from cardiac arrest, the faster ROSC and the lower dose of epinephrine used to restore spontaneous circulation seen in EPO-treated animals could be related to cardiac effect of EPO. This fact is in accordance with recent studies about the protective effect of EPO against cardiac ischemic injury (for a review see Ref.<sup>22</sup>). First, an antiapoptotic effect of rhEPO has been described in rat cardiac myocytes<sup>15,23</sup> and myoblasts<sup>11</sup> subjected to hypoxia. It has also been observed that brief exposure of isolated hearts to EPO improves myocardial functional recovery after ischemia probably due to preserved intracellular ATP levels.<sup>12</sup> Moreover, other studies have also shown that EPO administration (5000 UI kg<sup>-1</sup>, i.p.) in the rat in vivo, prevents cellular apoptosis and necrosis and improves functional recovery in isolated hearts subjected to global ischemia-reperfusion, 1 h<sup>13</sup> or 24 h<sup>14</sup> later. A protective effect is also seen when EPO is administered directly to the isolated rat<sup>12,24</sup> and rabbit<sup>25,26</sup> hearts, 10–15 min before ischemia. In our study, EPO was administered 15 min before cardiac arrest. Thus, cardioprotective properties of EPO observed in the setting of ischemic injury could explain the beneficial effect of EPO administration against cardiac arrest seen in our study.

EPO administration just before reperfusion also reduces both lethal ventricular arrhythmias and infarct size after cardiac ischemia in the dog.<sup>27</sup> In our study, at the state of reperfusion, rats never presented ventricular arrhythmias. This endpoint is particularly interesting in cardiac arrest because ventricular arrhythmias are often observed in patients following reperfusion therapy and they can be life-threatening.

Mechanisms of EPO-induced cellular protection in a global ischemia-reperfusion model like cardiac arrest remain unknown but several hypotheses could be proposed. First, in our study, considering the short time period between EPO administration and the observed effect, it seems that a new protein synthesis is not implicated in cardioprotection. It seems that protective effects of EPO were due to a direct action of this molecule on cardiac cells, independently of its hematopoietic effect. Indeed, the binding of EPO to its receptor (EPOR), expressed in the heart<sup>28</sup> induces the homodimerization and phosphorylation of the receptor via the activation of the Janus kinase 2 (Jak 2),<sup>29,30</sup> leading

to activation of several protective pathways and then switching the phenotype of cardiomyocytes to a defensive one.<sup>22,31</sup> Signaling through the EPOR is promoted by tyrosine phosphorylation of the cytosolic domain and the recruitment of secondary signaling molecules such as the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3 kinase). PI3 kinase then activates the antiapoptotic Akt pathway, which maintains the mitochondrial membrane potential, prevents the cellular release of cytochrome C and modulates caspase activity. Jak2 kinase is also able to phosphorylate and to activate the downstream antiapoptotic targets STAT3 and STAT5 or various kinases (p38 or p42/44 mitogen-activated protein kinases (MAPK) and protein kinase C) with antiapoptotic or antinecrotic properties. Indeed, Akt and p42/44 MAPK are involved in mechanisms underlying EPO-induced improvement of post-resuscitation myocardial dysfunction and survival following an asphyxial cardiac arrest.<sup>21</sup> Various mediators activated by these different pathways have been proposed. Among them, nitric oxide synthesis and ATP-sensitive potassium channel opening seem to mediate the EPO-induced cytoprotection.<sup>13,25</sup> In addition to preventing cellular death by apoptosis or necrosis, EPO also has been found to play a role in progenitor cell development through activation of nuclear factor- $\kappa$ B which is a key mediator of inflammatory response.<sup>32</sup> Finally, it has been suggested that the effect of EPO on cell survival might involve an interplay of growth factors and cytokines, e.g., transforming growth factor, tumor necrosis factor and interleukin-6.<sup>10</sup> Complementary studies are today needed to clarify the exact mechanisms underlying the cardioprotective effects conferred by EPO against ischemic injury, especially after cardiac arrest.

Finally, the animal model of asphyxia-induced cardiac arrest used in this study may not represent all pathophysiological changes caused by other mechanisms of cardiac arrest. If asphyxiation is more common in children, ventricular fibrillation is the leading cause of cardiac arrest in adults. Pathophysiological consequences differ between asphyxia- and arrhythmia-induced cardiac arrest. For example, the initial partial pressure of end-tidal CO<sub>2</sub> (correlated with cardiac output and CPR) is significantly higher in patients with asphyxial cardiac arrest than in patients with VT/VF cardiac arrest.<sup>33</sup> Moreover, in a rat model, asphyxial cardiac arrest results in lesser impairment of post-resuscitation myocardial function when compared with cardiac arrest caused by VF.<sup>34</sup> Thus, further investigations are needed to explore the effect of EPO in arrhythmia-induced cardiac arrest, allowing a better understanding of pathological changes associated with these both cardiac arrest models and their prevention.

In conclusion we showed in this study that EPO administration before ischemia is able to improve survival in a rat model of cardiac arrest by asphyxia. Despite extensive experimental and clinical research on cardiac arrest, only 2–12% of resuscitated patients are discharged from hospital in good neurological conditions. There is, therefore, a clear need for new therapies that improve survival after cardiac arrest. We can hope that EPO administration will represent pharmacological approach in upcoming years, leading to additional myocardial salvage of the reperfused myocardium.<sup>16</sup>

#### Conflict of interest statement

None to declare.

#### Acknowledgements

The authors thank Dr David Backer and Pr Bruno Riou for reviewing and constructive criticism of the manuscript and Pr Jean-François Timsit for his statistical support.

#### References

- Böttiger BW, Grabner C, Bauer H, et al. Long term outcome after out-of-hospital cardiac arrest with physician staffed emergency medical services: the Utstein style applied to a midsized urban/suburban area. *Heart* 1999;82:674–9.
- Gazmuri RJ, Weil MH, Bisera J, Tang W, Fukui M, McKee D. Myocardial dysfunction after successful resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care Med* 1996;24:992–1000.
- Vogel P, Putten H, Popp E, et al. Improved resuscitation after cardiac arrest in rats expressing the baculovirus caspase inhibitor protein p35 in central neurons. *Anesthesiology* 2003;99:112–21.
- Brain Resuscitation Clinical Trial I Study Group. Randomized clinical study of thiopental loading in comatose survivors of cardiac arrest. *N Engl J Med* 1986;314:397–403.
- Brain Resuscitation Clinical Trial II Study Group. A randomized clinical study of a calcium-entry blocker (lidoflazine) in the treatment of comatose survivors of cardiac arrest. *N Engl J Med* 1991;324:1225–31.
- Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:26–32.
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:643–51.
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10526–31.
- Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 2001;101:271–6.
- Moon C, Krawczyk M, Ahn D, et al. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11612–7.
- Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003;112:999–1007.
- Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenberg C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2004;18:1031–3.
- Joyeux-Faure M, Ramond A, Beguin PC, Belaidi E, Godin-Ribuot D, Ribuot C. Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart. *Fundam Clin Pharmacol* 2006;20:51–6.
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003;108:79–85.
- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodelling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4802–6.
- Joyeux-Faure M. Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications? *J Pharmacol Exp Ther* 2007;323:759–62.
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495–505.
- Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998;43:40–9.
- Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988;22:447–55.
- Popp E, Vogel P, Teschendorf P, Böttiger BW. Effects of the application of erythropoietin on cerebral recovery after cardiac arrest in rats. *Resuscitation* 2007;74:344–51.
- Huang CH, Hsu CY, Chen HW, et al. Erythropoietin improves the postresuscitation myocardial dysfunction and survival in the asphyxia-induced cardiac arrest model. *Shock* 2007;28:53–8.
- Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribuot C. Erythropoietin and myocardial protection: what's new? *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19:439–46.
- Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:990–4.
- Cai Z, Semenza GL. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2004;109:2050–3.
- Shi Y, Rafiee P, Su J, Pritchard Jr KA, Tweddell JS, Baker JE. Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res Cardiol* 2004;99:173–82.
- Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard Jr KA, Tweddell JS, Baker JE. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol* 2005;100:187–97.
- Hirata A, Minamino T, Asanuma H, et al. Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005;19:33–40.
- van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, et al. Erythropoietin improves left ventricular function and coronary flow in an experimental model of ischemia-reperfusion injury. *Eur J Heart Fail* 2004;6:853–9.

29. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227–36.
30. Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 2003;59:538–48.
31. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 2005;293:90–5.
32. Digidaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001;412:641–7.
33. Grmec S, Lah K, Tusek-Bunc K. Difference in end-tidal CO<sub>2</sub> between asphyxia cardiac arrest and ventricular fibrillation/pulseless ventricular tachycardia cardiac arrest in the prehospital setting. *Crit Care* 2003;7:R139–44.
34. Kamohara T, Weil MH, Tang W, et al. A comparison of myocardial function after primary cardiac and primary asphyxial cardiac arrest. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1221–4.

### 5.1.3 EPO et protection contre la cardiotoxicité induite par chimiothérapie

En oncologie, l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques, tels que les anthracyclines ou le trastuzumab, est limitée en raison de leur toxicité cardiaque. L'EPO est un agent cytoprotecteur avéré, protégeant le cœur des lésions d'ischémie, en améliorant la récupération fonctionnelle et en diminuant la mort cellulaire.

Le but de cette étude était de déterminer si un traitement par l'EPO pouvait protéger contre la cardiotoxicité aiguë induite par la doxorubicine et le trastuzumab, dans un modèle de cœur isolé de rat.

Les animaux ont été traités par l'EPOrh administrée par injection intrapéritonéale (5000 UI/kg). Les animaux contrôles ont reçu une solution saline. Une heure plus tard, les cœurs ont été prélevés et perfusés selon la méthode de Langendorff, à débit constant. Après 20 min de stabilisation, les cœurs ont été perfusés pendant 60 min avec du liquide de perfusion de Krebs contenant 6 mg/l de doxorubicine ou bien 10 mg/l de trastuzumab. Les cœurs perfusés avec de la doxorubicine ont été stimulés électriquement, en raison de la grande toxicité cardiaque de cette molécule. Les cœurs contrôles ont été perfusés par du liquide de Krebs seulement.

La doxorubicine a induit une diminution de la PDVG, d'environ 40% par rapport à la baseline. Une augmentation de la pression télédiastolique (PTD, + 390% par rapport à la valeur basale) et de la pression de perfusion coronaire (CPP, +70% par rapport à la valeur de base) ont également été observées. L'incidence des tachycardies ou fibrillations ventriculaires (VT/VF) a été aussi significativement augmentée par la doxorubicine comparé au groupe contrôle (86% versus 0%, respectivement).

Le trastuzumab a été responsable d'une augmentation de la CPP et de la PTD (d'environ 70% pour chacun des paramètres), en revanche la PDVG n'a pas varié.

Le prétraitement par l'EPO a permis de réduire significativement les effets délétères induits par la doxorubicine sur la PDVG, la PTD, la CPP et l'incidence des VT/VF. Les effets délétères du trastuzumab ont, eux aussi, été abolis par l'EPO.

Cette étude montre qu'un prétraitement par l'EPOrh protège le myocarde des dommages fonctionnels et électrophysiologiques induits par une exposition aiguë à la doxorubicine ou au trastuzumab. Cependant, des études supplémentaires sont requises afin de déterminer les mécanismes impliqués.

Ces travaux, menés en collaboration avec le professeur Mireille Mousseau (du service d'Oncologie du CHU de Grenoble), ont fait l'objet de la publication suivante.

# Erythropoietin Pretreatment Protects Against Acute Chemotherapy Toxicity in Isolated Rat Hearts

AMANDINE RAMOND,<sup>\*,†</sup> EUGÉNIE SARTORIUS,<sup>\*,†</sup> MIREILLE MOUSSEAU,<sup>‡</sup>  
CHRISTOPHE RIBUOT,<sup>\*,†</sup> AND MARIE JOYEUX-FAURE<sup>\*,†,1</sup>

*\*Laboratoire HP2, Hypoxie Physio-Pathologie Respiratoire et Cardiovasculaire, EA 3745, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université Grenoble I, France; †ERI 0017, Inserm, France; and ‡Department of Oncology and Haematology, CHU de Grenoble, France*

The use of chemotherapeutic agents, such as anthracycline or trastuzumab, in oncology is limited by their cardiac toxicity. Recent experimental studies suggest that recombinant human erythropoietin (rhEPO) can be considered as a protective agent because its administration protects against cardiac ischemic injury, improving functional recovery, and reducing cell death. The aim of this study was to investigate whether pretreatment by rhEPO protects against acute cardiotoxicity induced by doxorubicin and trastuzumab, using the isolated rat heart model. Rats were treated with rhEPO (5000 IU/kg, intraperitoneally [ip]) or vehicle. One hour later, hearts were isolated and retrogradely perfused at constant flow. Following 20 mins of stabilization, hearts were perfused for 60 mins with modified-Krebs solution containing 6 mg/l doxorubicin or 10 mg/l trastuzumab. Hearts receiving doxorubicin were paced; those receiving trastuzumab were unpaced. Control hearts were perfused with modified-Krebs solution only. Doxorubicin exposure decreased left ventricular developed pressure (LVDP; approximately -40% of baseline) and increased end diastolic pressure (EDP; approximately +390% of baseline) and coronary perfusion pressure (CPP; approximately +70% of baseline). Incidence of ventricular tachycardia or fibrillation (VT/VF) was also significantly enhanced (86% vs. 0% in control group). Trastuzumab exposure increased CPP and EDP (approximately +70% of baseline for the both) without affecting LVDP. Prior rhEPO treatment significantly prevented doxorubicin-induced deleterious effects on LVDP, EDP, and VT/VF incidence. rhEPO administration also

prevented trastuzumab-induced deleterious effects on CPP and EDP. This study shows that pretreatment by rhEPO protects myocardium against functional damage and electrophysiologic injury induced by acute doxorubicin or trastuzumab exposure. Further investigations are required to elucidate the precise mechanisms involved. *Exp Biol Med* 233:76-83, 2008

**Key words:** erythropoietin; doxorubicin; trastuzumab; cardiotoxicity; isolated rat heart

## Introduction

Although rare, cardiotoxicity is a serious complication of cancer treatment. The incidence and severity of cardiotoxicity are notably dependent on the type of drugs used (1). Indeed, the use of anthracycline antibiotics as anticancer agents is limited by the late and irreversible cardiomyopathy they produce. In humans, nonspecific electrocardiographic changes, characteristic modifications in nuclear and cytoplasmic structure, decreased ejection fraction and congestive heart failure with increased mortality have been reported (2-5). Animal studies have described altered nuclear and cytoplasmic structure (6), increased coronary resistance (7), electrocardiographic abnormalities (8), evidence of left ventricular failure (9, 10), and increased mortality (11, 12) following doxorubicin administration. Although the mechanisms responsible for these changes remain undefined, several hypotheses have been suggested. Drug exposure may cause cellular damage through lipid peroxidation by intracellular free-radical production (12-14), intercalation of doxorubicin into nuclear and mitochondrial DNA (15), cellular calcium overload (11), and release of histamine (16, 17). Finally, it seems that the chronic cardiomyopathy induced by doxorubicin may result, at least in part, from acute hemodynamic and metabolic effects accompanying each drug exposure (1, 18).

In the past decade, the new drug trastuzumab has yielded impressive results in the treatment of metastatic

---

This work was supported by a supply of rhEPO and doxorubicin from Dr. E. Brudieu and a supply of trastuzumab from Dr. M.-J. Robein-Dobremez from the Pharmacie du CHU de Grenoble, France.

---

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at Laboratoire HP2, Faculté de Pharmacie, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France. E-mail: Marie.Faure@ujf-grenoble.fr

---

Received June 1, 2007.  
Accepted September 7, 2007.

---

DOI: 10.3181/0706-RM-152  
1535-3702/08/2331-0076\$15.00  
Copyright © 2008 by the Society for Experimental Biology and Medicine

---

breast cancer but also unexpected cardiotoxicity (19, 20). This molecule is a recombinant monoclonal antibody targeted against human epidermal growth factor receptor-2 protein (HER2), which is overexpressed in approximately 30% of breast cancer (21). As a single agent, the cardiotoxicity rate of trastuzumab varies between 3% and 7%, expressing in congestive heart failure. When trastuzumab is associated to standard chemotherapy, a decrease in left ventricular function is observed in almost 30% of women (22). Several hypotheses regarding the pathogenesis of trastuzumab cardiotoxicity have been proposed. They include both immune-mediated and direct toxicity (23).

Very recently, a new cytoprotective property of erythropoietin (EPO) was identified. This cytokine is produced by the adult kidney and is indispensable for proliferation, survival, and differentiation of erythroid progenitor cells (24). Erythropoietin receptors (EPOR) have been identified in nonhematopoietic tissues, including the heart (25), that could explain other cellular response activated following the binding of EPO to its receptor. Indeed, many recent experimental studies suggest that exogenous recombinant human EPO (rhEPO) administration exerts a cardioprotective effect against infarction and ischemia-reperfusion injury (26–28) and could be considered as a preconditioning agent (29). Moreover, two studies in rodents showed that rhEPO is also able to prevent cardiac dysfunction in chronic model of doxorubicin-induced cardiomyopathy (30, 31).

We have thus investigated in this study whether rhEPO preconditioning could protect the myocardium against acute hemodynamic and electrophysiologic damages induced by doxorubicin or trastuzumab, using the isolated rat heart model.

## Material and Methods

**Animals and Experimental Design.** The animal care complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (7th ed.), Washington, DC: National Academy Press, 1996. Male Wistar rats (250–350 g) were provided by Janvier (Le Genest-St-Isle, France).

This study was conducted in two parts. In the first part, rats were treated with either rhEPO or its vehicle. Subsequently, all animals were allowed to recover for 1 h. In the second part, isolated hearts were perfused for 60 mins with or without doxorubicin or trastuzumab added in the perfusion buffer. The dose of doxorubicin (Pfizer, Paris, France) used (6 mg/l of modified-Krebs or 10.3  $\mu$ M) was in accordance with numerous previous works studying doxorubicin toxicity on isolated rat hearts (7, 32–34). The dose of trastuzumab (10 mg/l of modified Krebs) was determined according to serum level measured in patients receiving the weekly dose (100 mg per week) likely to achieve clinical efficacy (35).

**Experimental Groups.** The rats were divided into eight experimental groups ( $n = 7$  in each group):

Group C1. Hearts from rats treated with saline (1 ml/kg, ip) were perfused with modified-Krebs buffer only and paced throughout the protocol.

Group D. Hearts from rats treated with saline (1 ml/kg, ip) were perfused with modified-Krebs containing 6 mg/l doxorubicin and paced throughout the protocol.

Group E1. Hearts from rats treated with rhEPO (5000 IU/kg, ip) were perfused with modified-Krebs only and paced throughout the protocol.

Group ED. Hearts from rats treated with rhEPO (5000 IU/kg, ip) were perfused with modified-Krebs containing 6 mg/l doxorubicin and paced throughout the protocol.

Group C2. Hearts from rats treated with saline (1 ml/kg, ip) were perfused with modified-Krebs buffer only and unpaced.

Group T. Hearts from rats treated with saline (1 ml/kg, ip) were perfused with modified-Krebs containing 10 mg/l trastuzumab and unpaced.

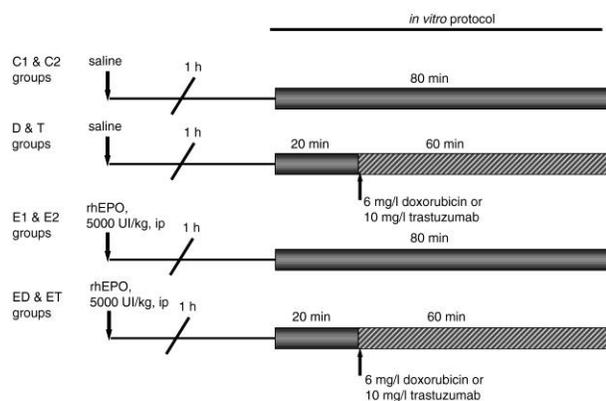
Group E2. Hearts from rats treated with rhEPO (5000 IU/kg, ip) were perfused with modified-Krebs only and unpaced.

Group ET. Hearts from rats treated with rhEPO (5000 IU/kg, ip) were perfused with modified-Krebs containing 10 mg/l trastuzumab and unpaced.

Because of nonspecific electrocardiographic changes induced by doxorubicin, hearts treated by that anthracyclin were classically paced (7, 33). As no such changes were observed, neither in patient treated with trastuzumab nor in rodent hearts perfused with trastuzumab (preliminary experiments), hearts perfused by that molecule were not paced. The experimental protocol is summarized in Figure 1.

**Perfusion Protocol on Isolated Heart.** One hour after the administration of rhEPO or its vehicle, rats were heparinized (1000 U/kg, ip) and anesthetized with 60 mg/kg ip sodium pentobarbitone. The heart was rapidly excised and immediately immersed in 4°C modified-Krebs solution (NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.2, and glucose 11.0 mM). The aortic stump was then cannulated and the heart perfused retrogradely using the Langendorff technique at constant flow (15 ml/min) with oxygenated modified-Krebs solution.

A water-filled balloon coupled to a pressure transducer was inserted into the left ventricular cavity *via* the left atrium for left ventricular balloon pressure (LVBP) recording. Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) was adjusted between 8 and 12 mm Hg. Myocardial temperature was measured by a thermoprobe inserted into the left ventricle and was maintained close to a constant 37°C. After 10 mins of stabilization, hearts from C1, D, E1, and ED groups were paced at 300 bpm by means of stainless steel electrodes attached to the apex and to the aortic cannula, which was maintained throughout the protocol. Hearts from C2, T, E2, and ET were not paced. Following a 20-min stabilization period, hearts were perfused for 60 mins with or without doxorubicin or trastuzumab added in the perfusion buffer.



**Figure 1.** Experimental protocol. Hearts from C1, D, E1 and ED groups were paced at 300 bpm. Hearts from C2, T, E2 and ET were not paced.

Coronary perfusion pressure (CPP), left ventricular developed pressure (LVDP = difference between left ventricular systolic pressure and LVEDP), and heart rate (HR, in unpaced hearts) were continuously recorded. LVBP inflation, measured throughout this protocol, reflected both the compliance of the ventricle and the balloon. However, because the balloon volume was held constant, changes in LVBP represented changes in LVEDP. Moreover, percentages of change in LVBP were due to changes in LVEDP. The cardiac contractility was assessed measuring the first derivative of LVDP,  $dP/dt$  max and min indexes. Arrhythmias were classified in accordance with the Lambeth Convention guidelines (36). Pressure recordings were analyzed for the incidence (%) of ventricular tachycardia or fibrillation (VT/VF) occurring during the 60-min perfusion period.

**Statistical Analysis of Data.** All data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Baseline hemodynamic data were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA). Comparison of CPP, LVEDP, LVDP, and  $dP/dt$  data were performed by a two-way repeated-measures ANOVA with *post hoc* multiple-comparison Tukey tests.  $P$  values  $\leq 0.05$  were considered significant. Arrhythmia incidences, expressed as percentages, were compared using Fisher's Exact tests.

## Results

**Baseline Hemodynamic Data.** At the end of the stabilization, LVEDP, LVDP, and CPP data were not different among the C1, D, E1, and ED groups or among the C2, T, E2, and ET groups, as shown in Table 1. Moreover, HR baseline values were not different among C2, T, E2, and ET groups, as shown in Table 3.

**Effects of Doxorubicin. On Coronary Perfusion Pressure.** After 60-min perfusion with doxorubicin, CPP significantly rose to  $169\% \pm 3\%$  of the baseline level, whereas in hearts perfused with normal buffer it was  $100\% \pm 5\%$  of baseline (Fig. 2). The same effect was seen in

**Table 1.** Baseline Hemodynamic Data<sup>a</sup>

Groups	CPP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	LVDP (mm Hg)
C1	$72 \pm 7$	$10 \pm 1$	$90 \pm 9$
D	$69 \pm 4$	$10 \pm 1$	$94 \pm 8$
E1	$65 \pm 3$	$10 \pm 1$	$79 \pm 9$
ED	$74 \pm 5$	$11 \pm 2$	$82 \pm 6$
C2	$60 \pm 3$	$11 \pm 1$	$94 \pm 4$
H	$70 \pm 4$	$10 \pm 1$	$111 \pm 4$
E2	$59 \pm 3$	$9 \pm 2$	$110 \pm 10$
EH	$57 \pm 2$	$12 \pm 4$	$99 \pm 8$

<sup>a</sup> Coronary perfusion pressure (CPP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), and left ventricular developed pressure (LVDP) measured at the end of the 20-min-stabilization period in groups C1 (paced hearts from saline-treated rats perfused by normal buffer), D (paced hearts from saline-treated rats perfused by buffer containing 6 mg/l doxorubicin), E1 (paced hearts from rhEPO-treated rats perfused by normal buffer), ED (paced hearts from rhEPO-treated rats perfused by buffer containing 6 mg/l doxorubicin), C2 (hearts from saline-treated rats perfused by normal buffer), T (hearts from saline-treated rats perfused by buffer containing 10 mg/l trastuzumab), E2 (hearts from rhEPO-treated rats perfused by normal buffer), and ET (hearts from rhEPO-treated rats perfused by buffer containing 10 mg/l trastuzumab). Data are mean  $\pm$  SEM. No statistical difference was seen among the four corresponding groups for each hemodynamic parameter.

hearts from rhEPO treated rats (ED:  $174\% \pm 12$  vs. E1:  $117\% \pm 10\%$  of baseline CPP). Because coronary perfusion flow rate was held constant, the increase in CPP induced by doxorubicin exposure can be attributed to an increase in coronary resistance.

**On Left Ventricular Function.** During 60-min perfusion with doxorubicin, LVBP rose markedly (to  $489\% \pm 80\%$  of the baseline level in D group vs.  $139\% \pm 12\%$  in C1 group) and LVDP steadily decreased (to  $60\% \pm 5\%$  of the baseline level in D group vs.  $93\% \pm 3\%$  in C1 group). Prior rhEPO treatment significantly prevented both these deleterious effects induced by doxorubicin perfusion (ED:  $189\% \pm 30$  vs. E1:  $107\% \pm 8\%$  of baseline LVBP, and ED:  $93\% \pm 10\%$  vs. E1:  $100\% \pm 13\%$  of baseline LVDP) (Fig. 2). By the same manner, the cardiac contractility (shown by  $dP/dt$  max and min indexes) was identically affected by doxorubicin exposure, and that deleterious effect was also prevented by prior rhEPO treatment (data not shown).

**On Ventricular Arrhythmias.** Table 2 presents the incidence of VT/VF recorded throughout the 60-min perfusion period in the four experimental groups. A high incidence of VT/VF was observed in the presence of doxorubicin (six of seven rats), which was attenuated by prior rhEPO treatment (three of seven rats).

**Effects of Trastuzumab. On Coronary Perfusion Pressure.** After 60-min perfusion with trastuzumab, CPP significantly rose to  $169\% \pm 15\%$  of the baseline level, whereas in hearts perfused with normal buffer it was  $141\% \pm 5\%$  of baseline (Fig. 3). Prior rhEPO treatment significantly prevented that deleterious effect (ET:  $135\% \pm 7\%$  vs. E2:  $130\% \pm 5\%$  of baseline CPP; Fig. 3). Because coronary perfusion flow rate was held constant, the

**Table 2.** Ventricular Arrhythmias Data<sup>a</sup>

Groups	C1	D	E1	ED
VT/VF (%)	0	86*	0	43

<sup>a</sup> Incidence of ventricular tachycardia or fibrillation (VT/VF) recorded throughout the 60-min perfusion period in groups C1 (paced hearts from saline-treated rats perfused by normal buffer), D (paced hearts from saline-treated rats perfused by buffer containing 6 mg/l doxorubicin), E1 (paced hearts from rhEPO-treated rats perfused by normal buffer), and ED (paced hearts from rhEPO-treated rats perfused by buffer containing 6 mg/l doxorubicin).

\*  $P \leq 0.05$  vs. C1 group.

increase in CPP induced by trastuzumab exposure can be attributed to an increase in coronary resistance.

**On Left Ventricular Function.** During 60-min perfusion with trastuzumab, LVBP rose markedly (to 173%  $\pm$  47% of the baseline level in T group vs. 83%  $\pm$  16% in C2 group). Prior rhEPO treatment significantly prevented that deleterious effect induced by trastuzumab perfusion (ET: 84%  $\pm$  7% vs. E2: 96%  $\pm$  13% of baseline LVBP; Fig. 3). LVDP was not modified following 60-min perfusion with trastuzumab, and that parameter was not statistically different among C2 (122%  $\pm$  8% of baseline), T (104%  $\pm$  4% of baseline), E2 (100%  $\pm$  8% of baseline), and ET (111%  $\pm$  5% of baseline) groups. HR was also not modified following 60-min perfusion with trastuzumab, and that parameter was not statistically different among the four groups, as shown in Table 3.

**On Ventricular Arrhythmias.** No arrhythmias were seen in hearts perfused with trastuzumab, indicating no deleterious electrophysiologic effect of this drug.

A specific comment about CPP in C1 and C2 groups can be made. Indeed, CPP were statistically different among those groups, with an increase in CPP over time in the C2 group. Both groups were identical except for pacing (doxorubicin treated hearts were paced, whereas trastuzumab treated hearts were unpaced). The increase in CPP observed in C2 group could thus be related to the uncontrolled heart rate.

## Discussion

In this study, we observed that acute doxorubicin or trastuzumab exposure induced cardiotoxicity in terms of hemodynamic and electrophysiologic damages. Prior rhEPO administration was able to prevent that chemotherapy-induced cardiotoxicity.

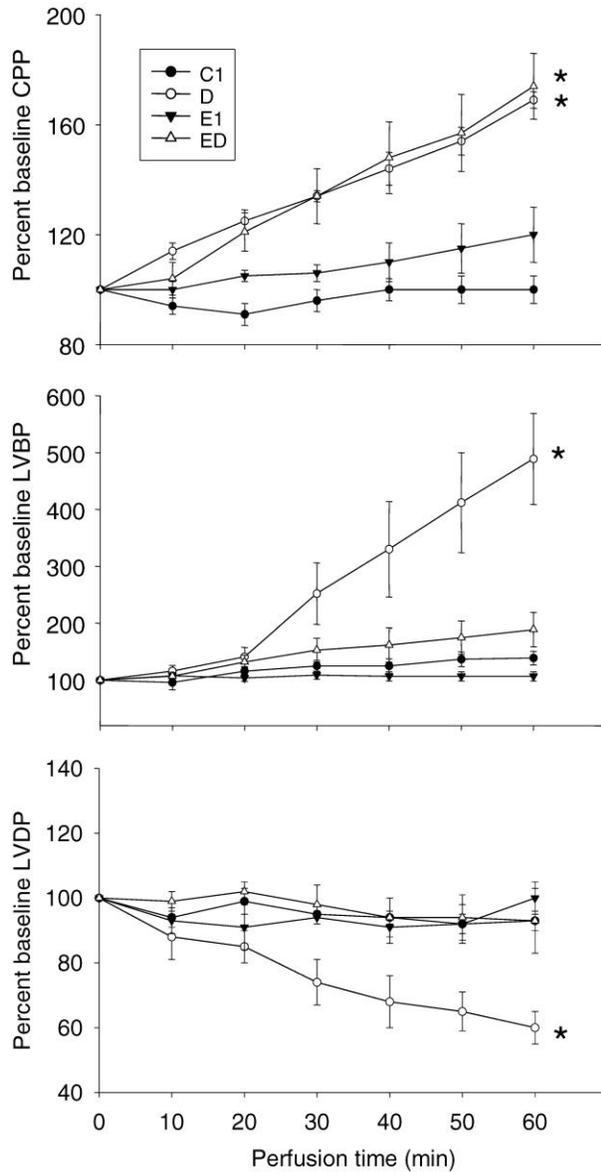
**Cardiotoxic Effects Induced by Doxorubicin.** In accordance with previous works (7, 32–34), we observed that an acute exposure to doxorubicin induced a rise in CPP related to an increase in coronary resistance, and alterations in systolic function and diastolic properties. Elevation of coronary resistance could result from a direct coronary vasoconstriction or by an alteration in ventricular compliance with compression of intramural arteries (7). We also observed that doxorubicin exposure induced ventricular electrophysiologic damages and arrhythmia. Indeed, a high incidence of ventricular fibrillation and tachycardia were observed during doxorubicin perfusion, which is in accordance with previous works showing a proarrhythmic effect of this anthracycline (32, 33, 37). There is evidence that acute cardiotoxicity of doxorubicin depends on oxygen-derived free radical generation and lipid peroxidation (12, 14, 15). Indeed, many compounds possessing antioxidant properties are able to protect the myocardium against doxorubicin-induced toxicity (38–42). Finally, free radical-mediated damage induced by doxorubicin may lead to cellular membrane alteration, resulting in myocyte death, which, in turn, could cause the biochemical and functional changes observed, that is, the rise in EDP and the fall in LVDP, phosphocreatine, and ATP content (7).

**Prevention of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by EPO Pretreatment.** Many recent experimental studies have highlighted the cytoprotective role of rhEPO in ischemia-reperfusion injury independent of its hematopoietic action (26–28). Indeed, rhEPO (administered at the same dose used in this study) improves ventricular function, reduces infarction, and prevents apoptosis following ischemia-reperfusion in the rat heart (28, 43). Numerous other recent works in different animal species have shown that rhEPO enhances the survival of ischemic cardiomyocytes (44–47). Finally, it seems that rhEPO could have anti-

**Table 3.** Heart Rate Data<sup>a</sup>

Groups	C2	T	E2	ET
Stabilization	271 $\pm$ 11	281 $\pm$ 13	260 $\pm$ 12	250 $\pm$ 10
Perfusion 10 mins	276 $\pm$ 11	238 $\pm$ 11	254 $\pm$ 13	253 $\pm$ 12
Perfusion 20 mins	273 $\pm$ 9	240 $\pm$ 12	252 $\pm$ 11	243 $\pm$ 4
Perfusion 30 mins	261 $\pm$ 8	245 $\pm$ 6	258 $\pm$ 9	239 $\pm$ 4
Perfusion 40 mins	255 $\pm$ 6	242 $\pm$ 8	257 $\pm$ 10	231 $\pm$ 5
Perfusion 50 mins	253 $\pm$ 6	256 $\pm$ 11	247 $\pm$ 12	236 $\pm$ 5
Perfusion 60 mins	238 $\pm$ 8	254 $\pm$ 10	230 $\pm$ 10	230 $\pm$ 7

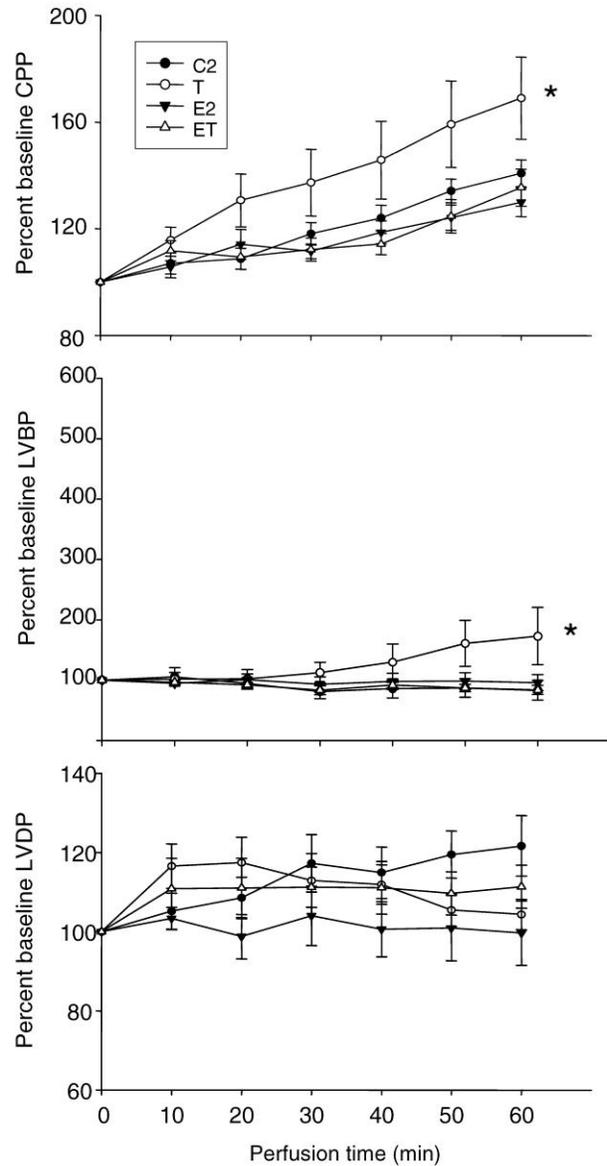
<sup>a</sup> Heart rate (in bpm) measured at the end of the 20-min stabilization period and throughout the perfusion protocol in groups C2 (hearts from saline-treated rats perfused by normal buffer), T (hearts from saline-treated rats perfused by buffer containing 10 mg/l trastuzumab), E2 (hearts from rhEPO-treated rats perfused by normal buffer), and ET (hearts from rhEPO-treated rats perfused by buffer containing 10 mg/l trastuzumab). Data are mean  $\pm$  SEM. No statistical difference was seen among the four groups.



**Figure 2.** CPP, LVBP, and LVDP, expressed as percentage of baseline values, measured during the 60 mins of perfusion in groups C1 (paced hearts from saline-treated rats perfused by normal buffer), D (paced hearts from saline-treated rats perfused by buffer containing 6 mg/l doxorubicin), E1 (paced hearts from rhEPO-treated rats perfused by normal buffer), and ED (paced hearts from rhEPO-treated rats perfused by buffer containing 6 mg/l doxorubicin). Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0.05$  vs. the other groups (without \*), globally.

inflammatory and antioxidant properties because rhEPO reduces inflammation and cytokine production and attenuates oxidative stress when chronically administered during heart failure (48).

In this study, we showed that prior rhEPO administration was able to protect the myocardium against acute doxorubicin-induced contractile dysfunction, preventing EDP increase as well as LVDP decrease, but was unable



**Figure 3.** CPP, LVBP, and LVDP, expressed as percentage of baseline values, measured during the 60 mins of perfusion in groups C2 (hearts from saline-treated rats perfused by normal buffer), T (hearts from saline-treated rats perfused by buffer containing 10 mg/l trastuzumab), E2 (hearts from rhEPO-treated rats perfused by normal buffer), and ET (hearts from rhEPO-treated rats perfused by buffer containing 10 mg/l trastuzumab). Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0.05$  vs. the other groups (without \*), globally.

to prevent CPP increase. The doxorubicin-induced proarrhythmic effect was also significantly attenuated by rhEPO administration. It has been shown in canine heart that rhEPO administration could also prevent arrhythmias triggered by an ischemia-reperfusion sequence (49).

Thus, rhEPO-induced protection against doxorubicin cardiotoxicity could be due to the antioxidant and cytoprotective properties of this compound, preventing arrhythmia occurrence and ventricular function alteration.

Because the rise in CPP induced by doxorubicin was not prevented by rhEPO administration, it seems that cardiotoxic effect is independent of the others, perhaps depending on coronary flow disturbances. Indeed, when coronary resistance is altered, it may result in an abnormal distribution of coronary flow, potentially resulting in localized areas of ischemia and functional damage (7). That hypothesis remains to be tested.

Moreover, two studies recently showed that rhEPO is able to prevent cardiac dysfunction in a model of cardiomyopathy induced by chronic doxorubicin exposure. Thus, chronic administration of rhEPO attenuates left ventricular dysfunction and cardiomyocytes atrophy and degeneration, potentially, through anti-inflammatory or proangiogenic mechanisms (30, 31). However, the cardiotoxic effects of acute doxorubicin exposure differ from those of chronic administration (where vascular density and histologic modifications appear). Therefore, it is important to study the acute cardiotoxicity of doxorubicin, reflecting what happens during each administration and to identify potential protective agent, such as rhEPO. Finally, in our isolated rat heart model of acute doxorubicin toxicity, it is important to note that rhEPO protection occurred independent of rhEPO hematopoietic action.

**Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity and Prevention by EPO Pretreatment.** In this study, we observed for the first time that acute trastuzumab exposure induced cardiotoxicity in terms of contractile dysfunction, using the isolated rat heart model. Indeed, we showed here that trastuzumab perfusion induced a rise in CPP related to an increase in coronary resistance. This could result from a direct effect of trastuzumab causing coronary vasoconstriction. The increase in EDP observed during trastuzumab exposure could be related to a change in the diastolic properties of the ventricle consistent with a decrease in ventricular compliance. We also observed that systolic function was not altered by trastuzumab exposure.

Trastuzumab specifically binds to the extracellular portion of HER2. That receptor family is involved in cell-cell and cell-stromal communication, primarily through a process known as signal transduction, in which external growth factors or ligands affect the transcription of various genes by phosphorylating or dephosphorylating a series of transmembrane proteins and intracellular signaling intermediates, many of which possess enzymatic activity (50). It has been shown that adult mutant mice carrying a cardiac-restricted deletion of HER2 exhibited multiple independent parameters of dilated cardiomyopathy, suggesting the essential role of the HER2 signaling in the cardiomyopathy prevention (51). Moreover, HER2 signaling seems to be implicated in apoptosis prevention because activation of that receptor promotes survival and inhibits apoptosis *in vitro* in cardiomyocytes (52), whereas its inhibition induces apoptotic activation with cytochrome C release, an increase in DNA fragmentation, and significant mitochondrial dysfunction (53, 54).

Prior rhEPO administration conferred myocardial protection against trastuzumab-induced toxicity by preventing coronary vasoconstriction and the increase in LVEDP. Because rhEPO prevents apoptosis in various situations, it could represent one of the mechanisms underlying its protective effect against trastuzumab cardiotoxicity. Further investigations are needed to confirm that hypothesis.

**Clinical Perspectives.** The increasing used of doxorubicin and trastuzumab as adjuvant breast cancer therapy and the growing population of long-term pediatric cancer survivors mean that, more than ever, cardiotoxicity is an important issue for oncology. Cardiomyopathy induced by chronic chemotherapy may result, at least in part, from acute cardiotoxic effects accompanying each drug exposure (1, 18). Therefore, it is of interest to identify new protective agents that prevent those deleterious cardiac effects during chemotherapy administration. Today, rhEPO is known to protect cells against various stresses. Here, we observed, for the first time, that the drug prevents cardiac damage induced by acute doxorubicin or trastuzumab exposure. In this study, doses of doxorubicin or trastuzumab used in isolated rat hearts correspond to those measured in serum level of patients after each chemotherapy administration. rhEPO administration could, therefore, be used during each chemotherapy administration to reduce acute cardiotoxic effects accompanying each drug exposure and, potentially, to prevent long-term development of cardiomyopathy. Further clinical investigations are now needed to explore the potential benefit of rhEPO in oncology.

Finally, because one isolated rhEPO administration has no hematopoietic consequence, the therapeutic scheme of rhEPO administration proposed here (before each chemotherapy exposure only) does not present the adverse consequences associated with chronic rhEPO administration, such as hypertension or thrombosis (26).

In summary, this study suggests that rhEPO preconditioning can protect the myocardium against hemodynamic damages and electrophysiologic disturbances induced by an acute doxorubicin or trastuzumab exposure. The exact mechanisms involved in the cardioprotection conferred by rhEPO against chemotherapy toxicity, and in particular, the antioxidant role of this compound, should be determined. This study opens the way to clinical applications where prevention of acute cardiotoxic effects of chemotherapy could be envisaged.

1. Ng R, Better N, Green MD. Anticancer agents and cardiotoxicity. *Semin Oncol* 33:2-14, 2006.
2. Bristow MR, Thompson PD, Martin RP, Mason JW, Billingham ME, Harrison DC. Early anthracycline cardiotoxicity. *Am J Med* 65:823-832, 1978.
3. Singer JW, Narahara KA, Ritchie JL, Hamilton GW, Kennedy JW. Time- and dose-dependent changes in ejection fraction determined by radionuclide angiography after anthracycline therapy. *Cancer Treat Rep* 62:945-948, 1978.
4. Goorin AM, Borow KM, Goldman A, Williams RG, Henderson IC,

- Sallan SE, Cohen H, Jaffe N. Congestive heart failure due to Adriamycin cardiotoxicity: its natural history in children. *Cancer* 47:2810–2816, 1981.
5. Bristow MR, Mason JW, Billingham ME, Daniels JR. Dose-effect and structure-function relationships in doxorubicin cardiomyopathy. *Am Heart J* 102:709–718, 1981.
  6. Taylor AL, Bulkley BH. Acute Adriamycin cardiotoxicity: morphologic alterations in isolated perfused rabbit heart. *Lab Invest* 47:459–464, 1982.
  7. Pelikan PC, Weisfeldt ML, Jacobus WE, Miceli MV, Bulkley BH, Gerstenblith G. J Acute doxorubicin cardiotoxicity: functional, metabolic, and morphologic alterations in the isolated, perfused rat heart. *Cardiovasc Pharmacol* 8:1058–1066, 1986.
  8. Cargill C, Bachmann E, Zbinden G. Effects of daunomycin and anthramycin on electrocardiogram and mitochondrial metabolism of the rat heart. *J Natl Cancer Inst* 53:481–486, 1974.
  9. Jaenke RS. An anthracycline antibiotic-induced cardiomyopathy in rabbits. *Lab Invest* 30:292–304, 1974.
  10. Mettler FP, Young DM, Ward JM. Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res* 37:2705–2713, 1977.
  11. Olson HM, Capen CC. Subacute cardiotoxicity of Adriamycin in the rat: biochemical and ultrastructural investigations. *Lab Invest* 37:386–394, 1977.
  12. Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 197:165–167, 1977.
  13. Dalloz F, Maingon P, Cottin Y, Briot F, Horiot JC, Rochette L. Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat. *Free Radic Biol Med* 26:785–800, 1999.
  14. Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 65:128–135, 1980.
  15. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res* 38:1745–1750, 1978.
  16. Bristow MR, Sageman WS, Scott RH, Billingham ME, Bowden RE, Kernoff RS, Snidow GH, Daniels JR. Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: the cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. *J Cardiovasc Pharmacol* 2:487–515, 1980.
  17. Bristow MR, Kantrowitz NE, Harrison WD, Minobe WA, Sageman WS, Billingham ME. Mediation of subacute anthracycline cardiotoxicity in rabbits by cardiac histamine release. *J Cardiovasc Pharmacol* 5:913–919, 1983.
  18. Torti FM, Bristow MR, Howes AE, Aston D, Stockdale FE, Carter SK, Kohler M, Brown BW Jr, Billingham ME. Reduced cardiotoxicity of doxorubicin delivered on a weekly schedule: assessment by endomyocardial biopsy. *Ann Intern Med* 99:745–749, 1983.
  19. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783–792, 2001.
  20. Seidman A, Hudis C, Pierrri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, Murphy M, Stewart SJ, Keefe D. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 20:1215–1221, 2002.
  21. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177–182, 1987.
  22. Routledge HC, Rea DW, Steeds RP. Monitoring the introduction of new drugs—Herceptin to cardiotoxicity. *Clin Med* 6:478–481, 2006.
  23. Schneider JW, Chang AY, Garratt A. Trastuzumab cardiotoxicity: speculations regarding pathophysiology and targets for further study. *Semin Oncol* 29:22–28, 2002.
  24. Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish HF. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 81:2223–2236, 1993.
  25. Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 18:1031–1033, 2004.
  26. Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc Res* 63:208–216, 2004.
  27. Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribuoat C. Erythropoietin and myocardial protection: what's new? *Fundam Clin Pharmacol* 19:439–446, 2005.
  28. Joyeux-Faure M, Ramond A, Beguin PC, Belaidi E, Godin-Ribuot D, Ribuoat C. Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart. *Fundam Clin Pharmacol* 20:51–56, 2006.
  29. Baker JE. Erythropoietin mimics ischemic preconditioning. *Vascul Pharmacol* 42:233–241, 2005.
  30. Hamed S, Barshack I, Luboshits G, Wexler D, Deutsch V, Keren G, George J. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur Heart J* 27:1876–1883, 2006.
  31. Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, Kanamori H, Khai NC, Maruyama R, Ogino A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation* 113:535–543, 2006.
  32. Lambert C, Mossiat C, Tanniere-Zeller M, Maupoil V, Rochette L. Antiarrhythmic effect of amiodarone on doxorubicin acute toxicity in working rat hearts. *Cardiovasc Res* 24:653–658, 1990.
  33. Joyeux M, Godin-Ribuot D, Faure P, Demenge P, Ribuoat C. Heat stress protects against electrophysiological damages induced by acute doxorubicin exposure in isolated rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 15:219–224, 2001.
  34. Chicco AJ, Schneider CM, Hayward R. Voluntary exercise protects against acute doxorubicin cardiotoxicity in the isolated perfused rat heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R424–R431, 2005.
  35. Leyland-Jones B. Dose scheduling—Herceptin. *Oncology* 61(Suppl 2):31–36, 2001.
  36. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW, Higgins AJ, Julian DG, Lab MJ, Manning AS, Northover BJ, Parratt JR, Riemersma RA, Riva E, Russell DC, Sheridan DJ, Winslow E, Woodward B. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 22:447–455, 1988.
  37. Pye MP, Cobbe SM. Arrhythmogenesis in experimental models of heart failure: the role of increased load. *Cardiovasc Res* 32:248–257, 1996.
  38. Monti E, Cova D, Guido E, Morelli R, Oliva C. Protective effect of the nitroxide tempol against the cardiotoxicity of adriamycin. *Free Radic Biol Med* 21:463–470, 1996.
  39. Morishima I, Matsui H, Mukawa H, Hayashi K, Toki Y, Okumura K, Ito T, Hayakawa T. Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 63:511–521, 1998.
  40. Venkatesan N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *Br J Pharmacol* 124:425–427, 1998.
  41. Balli E, Mete UO, Tuli A, Tap O, Kaya M. Effect of melatonin on the cardiotoxicity of doxorubicin. *Histol Histopathol* 19:1101–1108, 2004.
  42. Deres P, Halmosi R, Toth A, Kovacs K, Palfi A, Habon T, Czopf L,

- Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. *J Cardiovasc Pharmacol* 45:36–43, 2005.
43. Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 44:473–479, 2004.
44. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108:79–85, 2003.
45. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4802–4806, 2003.
46. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11612–11617, 2003.
47. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 112:999–1007, 2003.
48. Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 71:684–694, 2006.
49. Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Fujita M, Tsukamoto O, Wakeno M, Myoishi M, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 19:33–40, 2005.
50. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Puzstai L, Hortobagyi GN. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 3:379–398, 2004.
51. Negro A, Brar BK, Lee KF. Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res* 59:1–12, 2004.
52. Zhao YY, Sawyer DR, Baliga RR, Opel DJ, Han X, Marchionni MA, Kelly RA. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes: persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 273:10261–10269, 1998.
53. Grazette LP, Boecker W, Matsui T, Semigran M, Force TL, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Inhibition of ErbB2 causes mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes: implications for Herceptin-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 44:2231–2238, 2004.
54. Rohrbach S, Muller-Werdan U, Werdan K, Koch S, Gellerich NF, Holtz J. Apoptosis-modulating interaction of the neuregulin/erbB pathway with anthracyclines in regulating Bcl-xS and Bcl-xL in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 38:485–493, 2005.

#### **5.1.4 EPO et cardioprotection de rats diabétiques**

Le rat diabétique de type I, dont le diabète a été induit par la streptozotocine, est connu pour être plus sensible à l'ischémie-reperfusion cardiaque, montrant une aggravation de la taille de l'infarctus. Plusieurs études expérimentales ont montré récemment que l'EPO pouvait être considérée comme un agent pharmacologique cardioprotecteur puisque son administration protège contre les lésions ischémiques en diminuant les dysfonctions ventriculaires et en réduisant l'apoptose et la nécrose.

Le but de cette étude a été de rechercher si l'effet cardioprotecteur de l'EPO pouvait s'appliquer en situation de diabète de type I.

Les rats mâles (Wistar) ont été divisés en 2 groupes expérimentaux : le groupe C (contrôle, traité par le véhicule), le groupe D (diabétique, traité par la streptozotocine, 55 mg/kg, iv).

Après 8 semaines, leur cœur a été isolé et perfusé à pression constante. Une ischémie (de 30 min)-reperfusion (de 120 min) a été réalisée. Les paramètres hémodynamiques et la taille de l'infarctus ont été mesurés. Certains cœurs ont été perfusés par de l'EPOrh (avant ou après l'ischémie), groupes C+EPO et D+EPO.

Le groupe C+EPO a montré des lésions ischémiques diminuées par rapport au groupe C, que l'EPO ait été administrée avant ou après l'ischémie. Le groupe D a montré des lésions ischémiques comparables par rapport au groupe C. L'EPO, administrée au groupe D, avant ou après l'ischémie, n'a pas diminué ces lésions.

Cette étude suggère que l'administration d'EPO ne prévient pas les lésions ischémiques du cœur de rat diabétique, contrairement aux animaux sains.

Ces résultats, ont fait l'objet d'une présentation sous forme de poster (présenté ci-après), à la Journée Thématique de l'Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques (ALFEDIAM) Cœur et Diabète, le 7 décembre 2007, à Paris.

# L'érythropoïétine ne protège pas contre les lésions ischémiques cardiaques chez le rat diabétique de type I

Amandine Ramond, Patrice Faure, Christophe Ribuot, Patrick Lévy, Marie Joyeux-Faure.

Laboratoire HP2 Hypoxie PhysioPathologie, INSERM ERI 17, Faculté de Médecine-Pharmacie, Grenoble, France,

## Objectif de l'étude

Le rat diabétique de type I, traité par la streptozotocine, est connu pour être plus sensible à l'ischémie-reperfusion cardiaque ; montrant une aggravation de la taille de l'infarctus. Plusieurs études expérimentales ont montré récemment que l'érythropoïétine recombinante humaine (EPOrh) pouvait être considérée comme un agent pharmacologique cardioprotecteur puisque son administration protège contre les lésions ischémiques en diminuant les dysfonctions ventriculaires et en réduisant l'apoptose et la nécrose. Le but de cette étude a été de rechercher si l'effet cardioprotecteur de l'EPOrh pouvait s'appliquer au rat diabétique de type I, traité par la streptozotocine.

## Méthodes

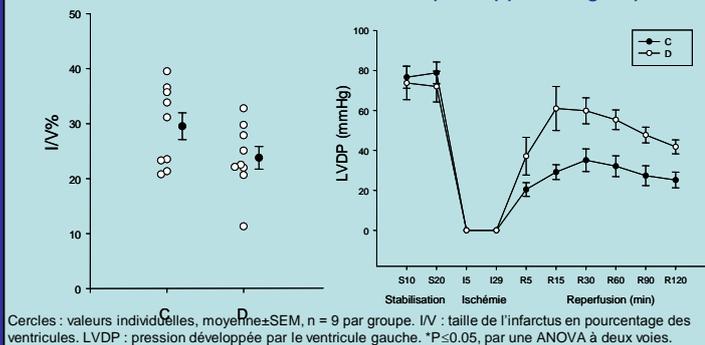
- Les rats (mâles, Wistar, n = 54) ont été divisés en 2 groupes expérimentaux :
  - le groupe C (contrôle, traité par le véhicule),
  - le groupe D (diabétique, traité par la streptozotocine, 55 mg/kg, iv).
- Après 8 semaines, leur cœur a été isolé et perfusé à pression constante.
  - Une ischémie (de 30 min)-reperfusion (de 120 min) a été réalisée.
  - Les paramètres hémodynamiques et la taille de l'infarctus ont été mesurés.
  - Certains cœurs ont été perfusés par de l'EPOrh (5 U/ml, 15 min avant ou après l'ischémie), groupes C+EPO et D+EPO.

## Conclusion

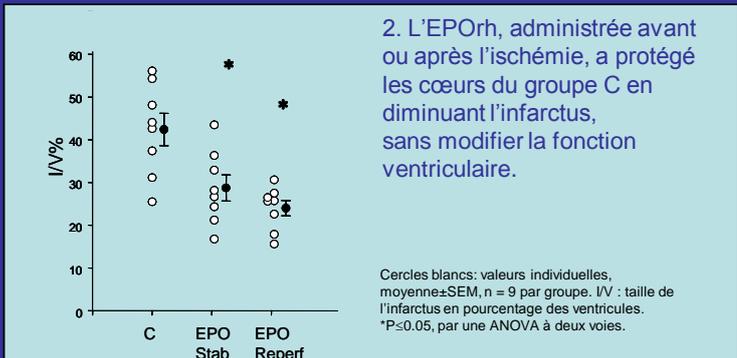
Cette étude suggère que l'EPOrh, administrée avant ou après l'ischémie, ne prévient pas les lésions ischémiques du cœur de rat diabétique, contrairement aux animaux sains.

## Résultats

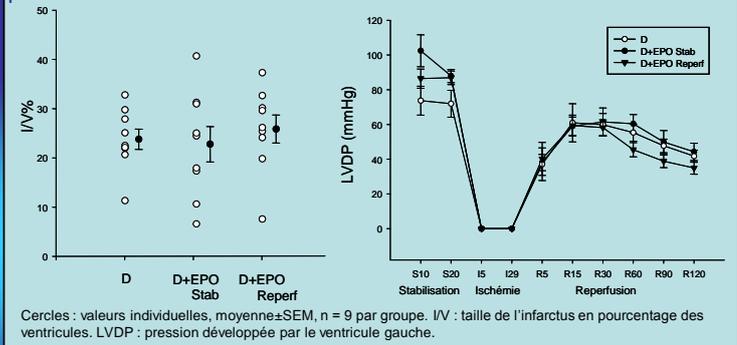
1. Le groupe D a montré des lésions ischémiques comparables et une amélioration de sa fonction ventriculaire, par rapport au groupe C.



2. L'EPOrh, administrée avant ou après l'ischémie, a protégé les cœurs du groupe C en diminuant l'infarctus, sans modifier la fonction ventriculaire.



3. L'EPOrh administrée au groupe D, avant ou après l'ischémie, n'a pas diminué l'infarctus ni modifié la fonction ventriculaire.



## 5.2 Travaux sur d'autres conséquences de l'HI chronique

### 5.2.1 Etude de la fonction mitochondriale cardiaque lors d'une HI chronique

Le but de cette étude était de déterminer l'effet de l'HI sur la fonction mitochondriale cardiaque. En effet, une altération de la fonction mitochondriale pourrait être impliquée dans les effets délétères induits par l'HI et être à l'origine de l'aggravation de la sensibilité à l'infarctus observée.

Des rats mâles adultes ont été exposés à l'HI (cycles d'une minute, alternant  $FiO_2$  5% et  $FiO_2$  21%) ou à la normoxie, 8 h par jours pendant 35 jours. Le jour suivant, la capacité oxydative mitochondriale et la fonction des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale ont été déterminées, par respiration mitochondriale *in situ*.

La fonction mitochondriale a donc été étudiée *in situ* sur 20-50 mg de fibres musculaires issues du VG perméabilisées à la saponine. Cette technique a nécessité une préparation des fibres à partir de tissus « frais ». La consommation d' $O_2$  a été mesurée à l'aide d'une électrode de Clark dans une chambre d'oxygraphie thermostatée.

La préparation des fibres musculaires cardiaques a été réalisée dans différents bains et solutions à  $+4^\circ C$ . Dans un premier temps, les fibres ont été disséquées sous loupe binoculaire dans la solution « *Skimming* » (solution S), dont la composition correspond à celle du milieu intracellulaire, riche en phosphates.

Les cellules ont ensuite été perméabilisées par une incubation sous agitation pendant 30 min dans la solution S additionnée de  $50 \mu g \cdot mL^{-1}$  de saponine (détergent d'affinité importante pour le cholestérol). Cette opération consiste à créer des pores dans les membranes sarcolemmales pour permettre la pénétration des substrats et *des inhibiteurs* utilisés dans les expériences oxymétriques. Les membranes mitochondriales sont moins sensibles au détergent, du fait de leur plus faible contenu en groupements cholestérol. Si le temps d'incubation dans le bain de perméabilisation est bien respecté, seules les membranes des cellules musculaires sont perméabilisées, laissant intactes les membranes mitochondriales.

La préparation était ensuite rincée dans de la solution S afin d'éliminer la saponine, puis dans une solution de respiration (solution R) afin de laver les fibres de leur contenu en ADP. La composition de cette solution est proche de la solution S : alors qu'elle ne contient pas de composé à haut potentiel énergétique, elle comprend des substrats

(glutamate et malate) et de l'albumine bovine (protection des fibres et des mitochondries de l'effet des protéases libérées par le muscle).

Afin de mesurer la consommation d'oxygène, les échantillons ont été placés dans une chambre d'oxygraphie hermétique contenant 1,5 mL de solution de respiration R, maintenue à +22°C et en agitation continue. La consommation d'O<sub>2</sub> par les mitochondries a alors été mesurée par une électrode à oxygène type «électrode de Clark» (Hansatech Instruments, Norfolk, Royaume-Uni). L'évolution de la concentration en O<sub>2</sub> dissout a été enregistrée par un logiciel spécifique permettant le calcul de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub>. Le fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire a été évalué par l'administration d'inhibiteurs et de substrats spécifiques. En fin de protocole, les fibres ont été récupérées, séchées et pesées afin de déterminer leur poids sec. Les paramètres de respiration des muscles ont été exprimés en  $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de poids sec.

Les résultats obtenus n'ont montré aucune variation de la capacité oxydative mitochondriale ni du fonctionnement des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale au niveau cardiaque, suite à l'exposition à l'HI chronique de 35 jour. Ceci suggère donc que la fonction mitochondriale ne semble pas impliquée dans l'aggravation de la sensibilité à l'infarctus induite par l'HI.

Ces résultats ont fait l'objet d'une présentation sous forme de poster (voir page 152) au congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T), du 9 au 11 avril 2008, à Clermont-Ferrand.

### **5.2.2 Angiogenèse et mesure de VEGF**

Le but de cette étude était de déterminer l'effet de l'HI sur l'angiogenèse myocardique. En effet, une modification des taux de facteurs de croissance vasculaire cardiaques ou une altération de la densité vasculaire myocardique pourrait être impliquées dans les effets délétères induits par l'HI, participant à l'aggravation de la sensibilité à l'infarctus.

Des rats mâles adultes ont été exposés à l'HI (cycles d'une minute, alternant FiO<sub>2</sub> 5% et FiO<sub>2</sub> 21%) ou à la normoxie, 8 h par jours pendant 14 ou 35 jours.

Le jour suivant, les différentes mesures détaillées ci-après ont été réalisées :

- Le taux de facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) a été déterminé après 14 et 35 jours d'exposition, par une analyse western blot. Pour cela, les cœurs ont été prélevés, rapidement rincés et nettoyés dans du sérum physiologique froid, puis congelés dans de l'azote liquide. Ils ont ensuite été conservés à -80°C. L'extraction des protéines totales a été réalisée de la façon suivante. Les cœurs congelés ont été homogénéisés au polytron (3 fois 20 secondes) dans 10 volumes de tampon de lyse RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, sodium déoxycholate 0,5%, pastille d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche®), pH ajusté à 7,4). Les homogénats obtenus ont été centrifugés 20 min à 4°C, à 13000 rpm. Le surnageant obtenu comprenait les protéines totales. Il a été aliquoté et congelé à -80°C. Il a servi au dosage des protéines (par la méthode de Bradford) et au western blot. Les protéines ont été séparées sur gel SDS-acrylamide à 12% puis transférées sur une membrane de PDVF qui a ensuite été incubée avec un anticorps primaire anti-VEGF (1/1000; Abcam ab1316) durant la nuit à 4°C. Les anticorps accrochés à la protéine d'intérêt ont été détectés grâce à un anticorps secondaire conjugué avec la horseradish peroxidase (HRP, 1/2000; Abcam ab6728). Le chargement des protéines a été contrôlé par immunoblotting de la GAPDH, après déshybridation des membranes.

- La densité vasculaire myocardique a été déterminée après 35 jours d'exposition, en mesurant les densités capillaires et artériolaires de l'endocarde, au moyen d'un marquage immunohistochimique. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Jane-Lise Samuel (U689 INSERM CRIL, Université Paris Diderot- Paris).

Au lendemain de la fin de leur exposition, les rats ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (60 mg/kg), avant que leur cœur ne soit stoppé en diastole par injection intraveineuse d'une solution de chlorure de potassium. Les cœurs ont ensuite été rapidement excisés, pesés et coupés transversalement dans la partie moyenne de l'axe long du ventricule gauche. Les parties supérieures des cœurs ont été immergées dans de l'OCT. Elles ont ensuite été congelées progressivement dans de l'isopentane refroidi par immersion dans de l'azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80°C en attendant d'être coupés par cryosection (5µm d'épaisseur).

Les coupes de ventricules ont alors été marquées au moyen d'un double immunomarquage. Les coupes ont été successivement incubées en présence d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre l' $\alpha$ -actine du muscle lisse (Dako,

France, dilution 1:50) et des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la cavéoline (dilution 1:50). Les coupes ont ensuite été mises en présence d'une immunoglobuline G (IgG) antisouris biotinylée (1:200, Vector Laboratories, France), avec une IgG antilapin couplée à la fluoresceine (Amersham, France), et finalement avec un complexe Texas Red streptavidine (1:50, Amersham) réagissant avec la biotine. Les coupes ont ensuite été montées dans le milieu de montage Fluoprep (Biomerieux, France) et observée au moyen d'un microscope Leica (Leica, France) relié à une caméra.

Pour chaque cœur, l'analyse morphométrique des densités capillaire et artériolaire a été réalisée sur trois coupes non consécutives. L'agrandissement total utilisé pour la quantification (en combinant les agrandissements de l'objectif, de l'oculaire et de la caméra) était de 100. La taille du champ observé de 0,48 mm<sup>2</sup>. Le nombre de champs par sections variait de 10 à 20, selon la taille de la circonférence du VG.

La densité en vaisseaux a été évaluée dans l'endocarde (tiers interne de la paroi ventriculaire), sur l'ensemble du VG. La densité capillaire a été mesurée sur les coupes marquées par l'anticorps anti-cavéoline. Seules les structures cellulaires marquées, de forme circulaire et dont la taille de la lumière était inférieure à 8 µm ont été comptabilisées. Les artérioles ont été quantifiées dans les coupes marquées par l'anticorps dirigés contre l'α-actine du muscle lisse. Seuls les petits vaisseaux (diamètre de la lumière < 50 µm) entourés par au moins une couche de muscle lisse marquée par l'anticorps, et orientés transversalement sont comptabilisés.

La densité vasculaires (en nombre de vaisseaux / mm<sup>2</sup>) a été calculée en divisant le nombre de vaisseaux (capillaires ou artérioles) dans chaque champ observé par la surface de ce même champ. Les valeurs données dans la section des résultats sont les moyennes calculées dans l'aire correspondant à la totalité du tiers interne du VG. Les données présentées pour chaque cœur correspondent à la moyenne de la quantification de trois coupes.

Voici les résultats obtenus concernant les différents paramètres mesurés :

- Après 14 jours d'exposition, aucune différence d'expression du VEGF n'a été observée entre les groupes N et HI (résultats non communiqués) .

Par contre après 35 jours d'exposition, nous avons observé une augmentation (+74,6%) du taux de VEGF dans les ventricules des rats hypoxiques par rapport aux normoxiques.

- Après 35 jours d'HI chronique, les densités capillaire ( $2335 \pm 102 / \text{mm}^2$ ) et artériolaire ( $33 \pm 5 / \text{mm}^2$ ) sont aussi augmentées dans les cœurs des animaux hypoxiques, comparés aux animaux normoxiques ( $1991 \pm 77$  and  $21 \pm 2 / \text{mm}^2$ , respectivement). Cette augmentation pourrait être due à l'augmentation du taux de VEGF myocardique observée au même temps d'exposition.

Il semble que cette augmentation de densité vasculaire myocardique induite par l'HI n'ait pas d'incidence sur les fonctions mitochondriales cardiaques, puisque celles-ci n'ont pas varié après 35 jours d'exposition à l'HI.

Enfin il est aussi à noter que cette augmentation de densité vasculaire, bénéfique pour myocarde, n'est pas capable de prévenir la cardiosensibilisation à l'infarctus induite par une exposition à l'HI de 35 jours observée précédemment [58].

Ces résultats ont fait l'objet d'une présentation sous forme de poster (voir page ci-après) au congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T), du 9 au 11 avril 2008, à Clermont-Ferrand.

# Effect of chronic intermittent hypoxia on cardiac angiogenesis and mitochondrial function

Amandine Ramond<sup>1</sup>, Jane-Lyse Samuel<sup>2</sup>, Julia Tonini<sup>1</sup>, Hervé Sanchez<sup>3</sup>, Christophe Ribuot<sup>1</sup>, Patrick Lévy<sup>1</sup>, Diane Godin-Ribuot<sup>1</sup>, Marie Joyeux-Faure<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM ERI17, Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38042, France

<sup>2</sup> INSERM U689, Paris, France

<sup>3</sup> CRSSA, La Tronche, France

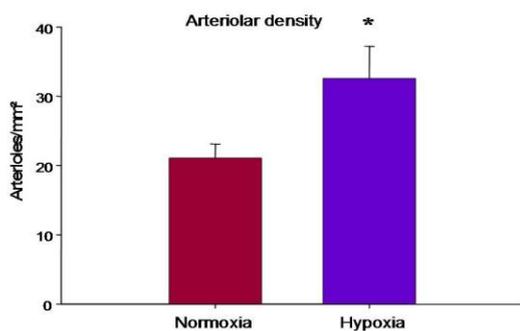
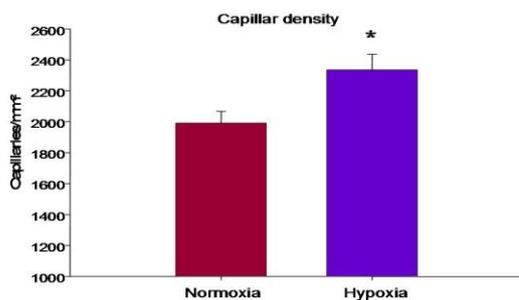
## Background

We have previously shown that chronic intermittent hypoxia (IH) aggravates the ischemia-reperfusion consequences, in the isolated rat heart. The aim of this study was to investigate the role of cardiac angiogenesis and mitochondrial function in this deleterious effect. Indeed, altered cardiac vascular density or mitochondrial function could represent potential mechanisms underlying the cardioprotection to infarction induced by chronic IH.

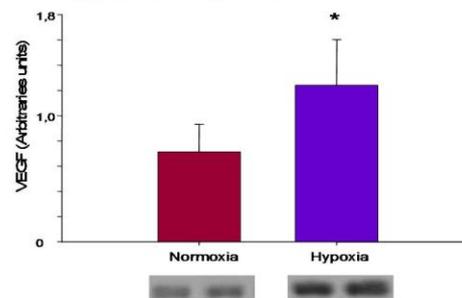
## Methods and Results

Conscious adult male rats were exposed to intermittent hypoxia (1-min cycles of hypoxia (FiO<sub>2</sub> 5%) / normoxia (FiO<sub>2</sub> 21%)) or normoxic conditions, 8 h / day, for 35 days. On the day 36, vascular coronary density was determined in isolated hearts, measuring capillaries and arterioles densities in the endomyocardium using immunolabeled ventricular cryosections. Ventricular vascular endothelium growth factor (VEGF) content was assessed by electrophoresis coupled with western blot analysis. Mitochondrial oxidative capacity and each respiratory mitochondrial chain (RMC) complex function were assessed in additional animals using *in situ* mitochondrial respiration.

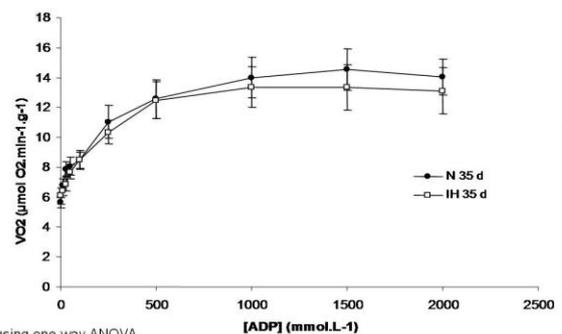
### > Higher cardiac vascular density in rat heart, after 35 days of IH



### > Higher VEGF expression



### > No variation of left ventricular mitochondrial oxidative capacity



\* p < 0,05, using one-way ANOVA

## Conclusion

The higher cardiac vascular density induced after chronic IH did not affect mitochondrial function and did not prevent deleterious cardioprotection to infarction observed after in these conditions.

## **6 DISCUSSION**

## DISCUSSION

### *Effets des agents anti-ischémiques sur l'I/R après une HI*

Dans un premier temps, nous avons montré chez le rat, que l'EPO protège le cœur contre l'infarctus induit par une I/R, qu'elle soit administrée avant ou après l'ischémie. De plus, nous avons montré que cet effet cardioprotecteur est dose-dépendant, puisque la protection conférée par l'EPO est efficace à la dose de 5 U/ml mais pas à 0,5 U/ml ni à 10 U/ml.

Nous avons ensuite confirmé les résultats précédemment obtenus dans le laboratoire, concernant les conséquences délétères de l'HI en termes d'aggravation de la sensibilité cardiaque à l'infarctus [78]. En effet, nous avons montré une augmentation de la taille de l'infarctus après une I/R dans les cœurs de rats préalablement exposés à 4 h d'HI, comparé aux cœurs de rats exposés à la normoxie. En ce qui concerne les effets cardioprotecteurs de l'EPO, c'est la première fois qu'ils ont été observés dans une situation de stress, comme l'HI, associée à une augmentation de la sensibilité à l'I/R. Nous avons alors déterminé une dose efficace d'EPO (5 U/ml, administrée avant ou après l'ischémie) contre l'augmentation de la cardiosensibilité à l'infarctus induite par l'HI. En effet, dans les deux groupes hypoxiques traités par EPO, la taille de l'infarctus est similaire à celle des groupes normoxiques, traités ou non avec de l'EPO.

Dans un second temps nous avons étudié l'effet d'agents anti-ischémiques administrés cette fois-ci de façon chronique, afin d'évaluer leur effet à long terme dans un modèle d'HI chronique mimant le SAOS.

La trimétazidine, administrée à la dose de 10 mg/j dans la nourriture, n'a pas eu d'effet sur la sensibilité à l'I/R des cœurs de rats soumis à l'HI.

En revanche, nous avons montré que le traitement chronique par le tempol (1 mM, dans l'eau de boisson) ou la mélatonine (100 mg/l, dans l'eau de boisson) permet de prévenir les effets myocardiques délétères induits par l'HI. En effet, les deux traitements, lorsqu'ils sont administrés de manière concomitante à l'exposition à l'HI de 14 jours, préviennent l'augmentation de la taille de l'infarctus observée après une I/R, dans le cœur isolé de rat.

Ces deux traitements sont également capables de prévenir l'augmentation de PAM chez le rat. De plus, nous avons montré que le tempol empêche la génération d'anions superoxydes dans les cœurs hypoxiques, puisque les taux d' $O_2^{\cdot-}$  chez les rats hypoxiques traités par le tempol sont comparables à ceux observés en conditions normoxiques.

### *Mécanismes impliqués dans les effets cardioprotecteurs de ces agents*

Comme l'EPO a été directement perfusée dans les cœurs isolés, nous avons conclu que les effets protecteurs observés sont dus à une action directe de cette molécule sur les cellules cardiaques, indépendamment de son effet hématopoïétique. Etant donné la courte période entre l'administration d'EPO et les effets observés, il semblerait que l'induction de l'expression de nouveaux gènes ne soit pas impliquée dans la cardioprotection observée ici.

Les mécanismes impliqués dans la prévention de la nécrose cellulaire induite par l'EPO restent mal connus. Cependant plusieurs hypothèses peuvent être proposées. En effet, la liaison de l'EPO à son récepteur permet l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire telles que la voie phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-kinase) Akt-dépendante [88, 93, 125, 126], la voie de la protéine kinase C (PKC) activant les canaux  $K_{ATP}$  [89, 127], et les mitogen-activated protein kinases (MAP kinases, telles que ERK 1/2 et p38) [89, 128]. Enfin, le NO semble également être un médiateur important de la cardioprotection induite par l'EPO [127, 129].

L'EPO semble aussi jouer un rôle dans la régulation du stress oxydant. En effet, lorsque des cardiomyocytes sont prétraités avec de l'EPO avant d'être mis en présence d' $H_2O_2$ , les dommages oxydants observés sont diminués. La wortmannin, un inhibiteur de la voie PI3K/Akt, est capable d'abolir cet effet bénéfique, suggérant que les effets antioxydants de l'EPO sont médiés par cette voie [130].

Des études complémentaires sont nécessaires pour clarifier les mécanismes exacts impliqués dans les effets cardioprotecteurs de l'EPO contre les lésions ischémiques, dans le cadre d'une exposition à une HI ou non. De plus, étant donné que nous avons exclu le traitement chronique par EPO en raison de ses effets hématopoïétiques, nous avons choisi une exposition aiguë à l'HI, capable d'induire une aggravation de la sensibilité à l'I/R au même titre qu'une exposition chronique. Il serait cependant intéressant d'étudier les effets d'une administration unique d'EPO sur des cœurs de rats ayant été exposés à l'HI chronique, afin de se rapprocher de la physiopathologie du SAOS, et d'évaluer quels pourraient être les effets de l'EPO chez des patients SAOS en situation d'infarctus du myocarde ou de chirurgie cardiaque.

Il pourrait être aussi intéressant de mesurer l'influence de l'HI chronique sur les taux sanguins d'EPO endogène dans notre modèle de rats hypoxiques et d'étudier son rôle dans la sensibilité à l'I/R.

Administrée de façon chronique et concomitante à l'exposition à l'HI, la TMZ n'a pas eu d'effet chez les rats exposés à l'HI. Notre hypothèse de départ était que cette molécule, en inhibant une enzyme clé de la  $\beta$ -oxydation des AGL, permettrait de modifier le métabolisme énergétique cardiaque en le redirigeant vers l'utilisation du glucose, plus favorable en termes de rendement énergétique. L'absence d'effet observée pourrait être due à l'utilisation d'une dose de TMZ trop faible pour être efficace contre les effets délétères de l'HI. La dose utilisée dans notre étude et qui permet d'obtenir chez le rat des taux plasmatiques comparables à ceux des patients traités par la TMZ contre l'angor [122], était peut-être trop faible pour protéger contre la nécrose cardiaque.

L'absence de cardioprotection observée pourrait aussi provenir du fait que les effets délétères de l'HI ne dépendent du métabolisme énergétique cardiaque.

Enfin nous avons étudié l'effet de deux agents anti-ischémiques, le tempol et la mélatonine, qui ont montré des effets protecteurs vis-à-vis de l'I/R dans notre modèle d'HI, probablement via leurs propriétés antioxydantes.

Ainsi, il semble que le tempol empêche l'augmentation de PAM et de taille d'infarctus induite par l'HI en diminuant le stress oxydant et la production de d'anion superoxyde. Le tempol est capable de mimer l'action de la SOD, mais il pourrait aussi diminuer l'activation de la NADPH oxydase, puisque l'augmentation de l'expression de l'unité p47-phox observée dans le groupe hypoxique est abolie par le traitement au tempol. Dans notre étude, les taux de p47-phox ont été mesurés dans la fraction cytosolique. Or c'est la quantité de p47-phox à la membrane qui reflète plus précisément l'activation de la NADPH oxydase. Nous avons tenté de réaliser le dosage de cette sous-unité dans la fraction membranaire, malheureusement nos échantillons étaient trop peu concentrés en protéines et nos résultats inexploitable. Ainsi il serait intéressant de réaliser de nouveaux travaux visant à confirmer l'implication de la NADPH oxydase confirmer l'implication de cette enzyme dans les lésions délétères induites par l'HI (par l'augmentation du recrutement de p47-phox au niveau membranaire ou la mesure directe de son activité), et de rechercher les facteurs responsables de son activation, comme potentiellement l'endothéline-1 (ET-1) [68].

Plusieurs études récentes ont illustré les effets protecteurs de la mélatonine contre les altérations cardiaques survenant à l'I/R, via son action sur la mitochondrie [120]. Dans le cœur de rat ayant subi une I/R, la mélatonine est capable de diminuer la peroxydation lipidique, et de prévenir la baisse d'activité des complexes I et III mitochondriaux. De plus, la

mélatonine inhibe l'ouverture du mPTP induite par une I/R cardiaque, réduisant ainsi la nécrose [119].

Afin de faire la relation entre la mélatonine et le stress oxydant dans notre modèle, des expériences de marquages au DHE et de dosage de la sous-unité p47-phox de la NADPH oxydase sont en cours.

Ainsi, les effets protecteurs de ces deux agents anti-ischémiques testé dans notre étude, le tempol et la mélatonine, suggère un rôle prépondérant du stress oxydant dans les conséquences cardiovasculaires délétères de l'HI. Des études additionnelles sont requises pour explorer plus précisément les mécanismes oxydants dans le développement des effets délétères de l'HI, comme l'implication de la xanthine oxydase, du glutathion ou de la SOD. Le rôle de la mitochondrie, génératrice d'ERO, devrait aussi être étudié dans ce phénomène.

#### *Perspectives cliniques*

A terme, cela pourrait permettre de développer de nouvelles perspectives cliniques et de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le SAOS. Ainsi, une étude clinique visant à évaluer l'efficacité de l'atorvastatine dans le SAOS est actuellement en cours. En plus de son action principale hypocholestérolémiante, l'atorvastatine a également des propriétés anti-oxydantes. Dans un premier temps les patients sont randomisés dans deux bras, l'un recevant l'atorvastatine, l'autre recevant un placebo, et ce pendant 3 mois. Au bout de ces 3 mois, les patients de chaque bras sont de nouveau randomisés, et reçoivent en plus de leur traitement atorvastatine/placebo un traitement par PPC efficace ou non. Au total 4 groupes sont ainsi étudiés : atorvastatine+PPC efficace, atorvastatine+PPC sham, placebo+PPC efficace, placebo+PPC sham. Différents paramètres biologiques sont mesurés tout au long de l'étude, parmi lesquels des marqueurs de stress oxydant.

En fonction des résultats obtenus chez l'animal, une étude clinique similaire pourrait être envisagée avec la mélatonine, en recherchant ses effets vis-à-vis du SAOS, indépendamment ou non de ses effets sur les troubles du sommeil [131].

## **7 BIBLIOGRAPHIE**

1. Opie, L., *The Heart: physiology, from cell to circulation*. 1998, Philadelphia: Lippincott-Raven
2. Stanley, W.C., et al., *Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions*. *Cardiovasc Res*, 1997. 33(2): p. 243-57.
3. Liu, B., et al., *Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons*. *Circ Res*, 1996. 79(5): p. 940-8.
4. ten Hove, M., et al., *Combined blockade of the Na<sup>+</sup> channel and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger virtually prevents ischemic Na<sup>+</sup> overload in rat hearts*. *Mol Cell Biochem*, 2007. 297(1-2): p. 101-10.
5. Baartscheer, A., *Chronic inhibition of na(+)/h(+)-exchanger in the heart*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006. 4(1): p. 23-9.
6. Lemasters, J.J., et al., *The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes*. *Exs*, 1996. 76: p. 99-114.
7. Tani, M. and J.R. Neely, *Role of intracellular Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange*. *Circ Res*, 1989. 65(4): p. 1045-56.
8. Turer, A.T. and J.A. Hill, *Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy*. *Am J Cardiol*, 2010. 106(3): p. 360-8.
9. Bush, L.R., et al., *Effect of diltiazem on extent of ultimate myocardial injury resulting from temporary coronary artery occlusion in dogs*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1982. 4(2): p. 285-96.
10. du Toit, E.F. and L.H. Opie, *Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion*. *Circ Res*, 1992. 70(5): p. 960-7.
11. Krause, S. and M.L. Hess, *Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia*. *Circ Res*, 1984. 55(2): p. 176-84.
12. Kaplan, P., et al., *Effect of ischemia and reperfusion on sarcoplasmic reticulum calcium uptake*. *Circ Res*, 1992. 71(5): p. 1123-30.
13. Kusuoka, H., et al., *Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca<sup>2+</sup> activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts*. *J Clin Invest*, 1987. 79(3): p. 950-61.
14. Nayler, W.G., *The role of calcium in the ischemic myocardium*. *Am J Pathol*, 1981. 102(2): p. 262-70.
15. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. 35(4): p. 339-41.
16. Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera, *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(7): p. 552-65.
17. Kim, J.S., Y. Jin, and J.J. Lemasters, *Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 290(5): p. H2024-34.
18. Rajesh, K.G., et al., *Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(5): p. H2171-8.
19. Schild, L. and G. Reiser, *Oxidative stress is involved in the permeabilization of the inner membrane of brain mitochondria exposed to hypoxia/reoxygenation and low micromolar Ca<sup>2+</sup>*. *Febs J*, 2005. 272(14): p. 3593-601.

20. Thompson-Gorman, S.L. and J.L. Zweier, *Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury*. J Biol Chem, 1990. 265(12): p. 6656-63.
21. Xia, Y. and J.L. Zweier, *Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart*. J Biol Chem, 1995. 270(32): p. 18797-803.
22. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. 357(11): p. 1121-35.
23. Zorov, D.B., et al., *Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore*. Cardiovasc Res, 2009. 83(2): p. 213-25.
24. Zorov, D.B., et al., *Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes*. J Exp Med, 2000. 192(7): p. 1001-14.
25. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. 61(3): p. 481-97.
26. Loke, K.E., et al., *Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption*. Circ Res, 1999. 84(7): p. 840-5.
27. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium*. Lancet, 1987. 2(8567): p. 1057-8.
28. Ma, X.L., et al., *Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium*. Circ Res, 1993. 72(2): p. 403-12.
29. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(4): p. 1620-4.
30. Wang, P. and J.L. Zweier, *Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury*. J Biol Chem, 1996. 271(46): p. 29223-30.
31. Darra, E., et al., *Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation*. Thromb Haemost, 2010. 104(2): p. 200-6.
32. Schulz, R., M. Kelm, and G. Heusch, *Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. 61(3): p. 402-13.
33. Patel, V.C., et al., *Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. 194(1): p. 234-8.
34. Young, T., P.E. Peppard, and D.J. Gottlieb, *Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 165(9): p. 1217-39.
35. Jennum, P. and R.L. Riha, *Epidemiology of sleep apnoea/hypopnoea syndrome and sleep-disordered breathing*. Eur Respir J, 2009. 33(4): p. 907-14.
36. Mazza, S., et al., *Driving ability in sleep apnoea patients before and after CPAP treatment: evaluation on a road safety platform*. Eur Respir J, 2006. 28(5): p. 1020-8.
37. Dematteis, M., et al., *Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease*. Ilar J, 2009. 50(3): p. 262-81.
38. Marin, J.M., et al., *Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study*. Lancet, 2005. 365(9464): p. 1046-53.
39. McNicholas, W.T. and M.R. Bonsignore, *Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities*. Eur Respir J, 2007. 29(1): p. 156-78.

40. Punjabi, N.M., et al., *Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study*. PLoS Med, 2009. 6(8): p. e1000132.
41. Duran-Cantolla, J., et al., *Obstructive sleep apnea/hypopnea and systemic hypertension*. Sleep Med Rev, 2009. 13(5): p. 323-31.
42. Peker, Y., et al., *Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(1): p. 81-6.
43. Mehra, R., et al., *Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 173(8): p. 910-6.
44. Arzt, M., et al., *Association of sleep-disordered breathing and the occurrence of stroke*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. 172(11): p. 1447-51.
45. Yaggi, H.K., et al., *Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death*. N Engl J Med, 2005. 353(19): p. 2034-41.
46. Alchanatis, M., et al., *Evidence for left ventricular dysfunction in patients with obstructive sleep apnoea syndrome*. Eur Respir J, 2002. 20(5): p. 1239-45.
47. Baguet, J.P., et al., *The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence*. Chest, 2005. 128(5): p. 3407-12.
48. Brooks, D., et al., *Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model*. J Clin Invest, 1997. 99(1): p. 106-9.
49. Lavie, L. and P. Lavie, *Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link*. Eur Respir J, 2009. 33(6): p. 1467-84.
50. Morgan, B.J., *Vascular consequences of intermittent hypoxia*. Adv Exp Med Biol, 2007. 618: p. 69-84.
51. MacMahon, S., et al., *Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias*. Lancet, 1990. 335(8692): p. 765-74.
52. Nieto, F.J., et al., *Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study*. Jama, 2000. 283(14): p. 1829-36.
53. Lavie, P., P. Herer, and V. Hoffstein, *Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study*. Bmj, 2000. 320(7233): p. 479-82.
54. Peppard, P.E., et al., *Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension*. N Engl J Med, 2000. 342(19): p. 1378-84.
55. Becker, H.F., et al., *Effect of nasal continuous positive airway pressure treatment on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea*. Circulation, 2003. 107(1): p. 68-73.
56. Pepperell, J.C., et al., *Ambulatory blood pressure after therapeutic and subtherapeutic nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised parallel trial*. Lancet, 2002. 359(9302): p. 204-10.
57. Fletcher, E.C., et al., *Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats*. Hypertension, 1992. 19(6 Pt 1): p. 555-61.
58. Joyeux-Faure, M., et al., *Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart*. J Appl Physiol, 2005. 98(5): p. 1691-6.
59. Campen, M.J., L.A. Shimoda, and C.P. O'Donnell, *Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice*. J Appl Physiol, 2005. 99(5): p. 2028-35.
60. Belaidi, E., et al., *Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea*. J Am Coll Cardiol, 2009. 53(15): p. 1309-17.

61. Fletcher, E.C., *Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure.* J Appl Physiol, 2001. 90(4): p. 1600-5.
62. Lai, C.J., et al., *Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats.* J Appl Physiol, 2006. 100(6): p. 1974-82.
63. Dematteis, M., et al., *Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice.* Am J Respir Crit Care Med, 2008. 177(2): p. 227-35.
64. Arnaud, C., et al., *Obstructive sleep apnea, immuno-inflammation, and atherosclerosis.* Semin Immunopathol, 2009. 31(1): p. 113-25.
65. Kanagy, N.L., B.R. Walker, and L.D. Nelin, *Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension.* Hypertension, 2001. 37(2 Part 2): p. 511-5.
66. Allahdadi, K.J., B.R. Walker, and N.L. Kanagy, *Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension.* Hypertension, 2005. 45(4): p. 705-9.
67. Tahawi, Z., et al., *Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats.* J Appl Physiol, 2001. 90(5): p. 2007-13; discussion 2000.
68. Troncoso Brindeiro, C.M., et al., *Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 293(5): p. H2971-6.
69. Jelic, S., et al., *Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea.* Circulation, 2008. 117(17): p. 2270-8.
70. Lefebvre, B., et al., *Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat.* Respir Physiol Neurobiol, 2006. 150(2-3): p. 278-86.
71. Koskenvuo, M., et al., *Snoring as a risk factor for hypertension and angina pectoris.* Lancet, 1985. 1(8434): p. 893-6.
72. Peker, Y., et al., *An independent association between obstructive sleep apnoea and coronary artery disease.* Eur Respir J, 1999. 14(1): p. 179-84.
73. Young, T. and P. Peppard, *Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: epidemiologic evidence for a relationship.* Sleep, 2000. 23 Suppl 4: p. S122-6.
74. Saletu, M., et al., *Structural and serum surrogate markers of cerebrovascular disease in obstructive sleep apnea (OSA): association of mild OSA with early atherosclerosis.* J Neurol, 2006. 253(6): p. 746-52.
75. Gami, A.S., et al., *Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea.* N Engl J Med, 2005. 352(12): p. 1206-14.
76. Nakashima, H., et al., *Obstructive sleep apnoea inhibits the recovery of left ventricular function in patients with acute myocardial infarction.* Eur Heart J, 2006. 27(19): p. 2317-22.
77. Belaidi, E., et al., *Contrasting effects of intermittent hypoxia on myocardial ischemic tolerance.* Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms To Clinical Applications, ed. T.V.S. Lei Xi. 2009, New York: Nova Science Publishers, Inc.
78. Beguin, P.C., et al., *Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia.* J Appl Physiol, 2005. 99(3): p. 1064-9.
79. Ramond, A., et al., *Deleterious myocardial consequences induced by intermittent hypoxia are reversed by erythropoietin.* Respir Physiol Neurobiol, 2007. 156(3): p. 362-9.
80. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.* Circulation, 1986. 74(5): p. 1124-36.
81. Semenza, G.L., *Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences.* Biochem Pharmacol, 2000. 59(1): p. 47-53.

82. Baker, J.E., *Erythropoietin mimics ischemic preconditioning*. *Vascul Pharmacol*, 2005. 42(5-6): p. 233-41.
83. Fisher, J.W., *Erythropoietin: physiology and pharmacology update*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2003. 228(1): p. 1-14.
84. Brines, M.L., et al., *Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(19): p. 10526-31.
85. van der Meer, P., et al., *Erythropoietin improves left ventricular function and coronary flow in an experimental model of ischemia-reperfusion injury*. *Eur J Heart Fail*, 2004. 6(7): p. 853-9.
86. Juul, S.E., A.T. Yachnis, and R.D. Christensen, *Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus*. *Early Hum Dev*, 1998. 52(3): p. 235-49.
87. Joyeux-Faure, M., *Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications?* *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. 323(3): p. 759-62.
88. Cai, Z. and G.L. Semenza, *Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Circulation*, 2004. 109(17): p. 2050-3.
89. Shi, Y., et al., *Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels*. *Basic Res Cardiol*, 2004. 99(3): p. 173-82.
90. Wright, G.L., et al., *Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury*. *Faseb J*, 2004. 18(9): p. 1031-3.
91. Parsa, C.J., et al., *Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts*. *J Biol Chem*, 2004. 279(20): p. 20655-62.
92. Lipsic, E., et al., *Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004. 44(4): p. 473-9.
93. Bullard, A.J., P. Govewalla, and D.M. Yellon, *Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo*. *Basic Res Cardiol*, 2005. 100(5): p. 397-403.
94. Lopaschuk, G.D., et al., *Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase*. *Circ Res*, 2003. 93(3): p. e33-7.
95. Kantor, P.F., et al., *The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase*. *Circ Res*, 2000. 86(5): p. 580-8.
96. Guarnieri, C. and C. Muscari, *Effect of trimetazidine on mitochondrial function and oxidative damage during reperfusion of ischemic hypertrophied rat myocardium*. *Pharmacology*, 1993. 46(6): p. 324-31.
97. Ruixing, Y., L. Wenwu, and R. Al-Ghazali, *Trimetazidine inhibits cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia-reperfusion*. *Transl Res*, 2007. 149(3): p. 152-60.
98. Di Napoli, P., et al., *Trimetazidine improves post-ischemic recovery by preserving endothelial nitric oxide synthase expression in isolated working rat hearts*. *Nitric Oxide*, 2007. 16(2): p. 228-36.
99. Belardinelli, R., et al., *Trimetazidine improves endothelial dysfunction in chronic heart failure: an antioxidant effect*. *Eur Heart J*, 2007. 28(9): p. 1102-8.

100. Williams, F.M., et al., *Trimetazidine inhibits neutrophil accumulation after myocardial ischaemia and reperfusion in rabbits*. J Cardiovasc Pharmacol, 1993. 22(6): p. 828-33.
101. Tritto, I., et al., *The anti-anginal drug trimetazidine reduces neutrophil-mediated cardiac reperfusion injury*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. 46(1): p. 89-98.
102. Hahn, S.M., et al., *Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics*. Free Radic Biol Med, 1999. 27(5-6): p. 529-35.
103. Zollner, S., et al., *Nitroxides increase the detectable amount of nitric oxide released from endothelial cells*. J Biol Chem, 1997. 272(37): p. 23076-80.
104. Glebska, J., et al., *Structure-activity relationship studies of protective function of nitroxides in Fenton system*. Biometals, 2001. 14(2): p. 159-70.
105. Onuma, S. and K. Nakanishi, *Superoxide dismutase mimetic tempol decreases blood pressure by increasing renal medullary blood flow in hyperinsulinemic-hypertensive rats*. Metabolism, 2004. 53(10): p. 1305-8.
106. Rak, R., et al., *Neuroprotection by the stable nitroxide Tempol during reperfusion in a rat model of transient focal ischemia*. J Neurosurg, 2000. 92(4): p. 646-51.
107. Mitchell, J.B., et al., *Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics*. Biochemistry, 1990. 29(11): p. 2802-7.
108. Schnackenberg, C.G. and C.S. Wilcox, *Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha*. Hypertension, 1999. 33(1 Pt 2): p. 424-8.
109. McDonald, M.C., et al., *Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion*. Free Radic Biol Med, 1999. 27(5-6): p. 493-503.
110. Reiter, R.J., *Melatonin: the chemical expression of darkness*. Mol Cell Endocrinol, 1991. 79(1-3): p. C153-8.
111. Hardeland, R., *Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites*. Cell Mol Life Sci, 2008. 65(13): p. 2001-18.
112. Gilad, E., et al., *Melatonin is a scavenger of peroxynitrite*. Life Sci, 1997. 60(10): p. PL169-74.
113. Cuzzocrea, S., et al., *Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity*. J Pineal Res, 1997. 23(2): p. 106-16.
114. Pieri, C., et al., *Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E*. Life Sci, 1994. 55(15): p. PL271-6.
115. Reiter, R., et al., *Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology*. Life Sci, 1997. 60(25): p. 2255-71.
116. Antolin, I., et al., *Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes*. Faseb J, 1996. 10(8): p. 882-90.
117. Lagneux, C., et al., *Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart*. Life Sci, 2000. 66(6): p. 503-9.
118. Leon, J., et al., *Melatonin and mitochondrial function*. Life Sci, 2004. 75(7): p. 765-90.
119. Petrosillo, G., et al., *Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. 297(4): p. H1487-93.
120. Paradies, G., et al., *Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease*. J Pineal Res, 2010. 48(4): p. 297-310.

121. Petrosillo, G., et al., *Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin*. *Faseb J*, 2003. 17(6): p. 714-6.
122. Tabbi-Anneni, I., et al., *Prevention of heart failure in rats by trimetazidine treatment: a consequence of accelerated phospholipid turnover?* *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. 304(3): p. 1003-9.
123. Yeung, H.M., M.W. Hung, and M.L. Fung, *Melatonin ameliorates calcium homeostasis in myocardial and ischemia-reperfusion injury in chronically hypoxic rats*. *J Pineal Res*, 2008. 45(4): p. 373-82.
124. Guichard, C., et al., *[The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases]*. *Med Sci (Paris)*, 2006. 22(11): p. 953-9.
125. van der Meer, P., et al., *Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(1): p. 125-33.
126. Burger, D., et al., *Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase*. *Cardiovasc Res*, 2006. 72(1): p. 51-9.
127. Joyeux-Faure, M., et al., *Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2006. 20(1): p. 51-6.
128. Klingmuller, U., *The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor*. *Eur J Biochem*, 1997. 249(3): p. 637-47.
129. Bullard, A.J. and D.M. Yellon, *Chronic erythropoietin treatment limits infarct-size in the myocardium in vitro*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2005. 19(5): p. 333-6.
130. Li, Y., et al., *Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure*. *Cardiovasc Res*, 2006. 71(4): p. 684-94.
131. Series, F., *Can improving sleep influence sleep-disordered breathing?* *Drugs*, 2009. 69 Suppl 2: p. 77-91.