



HAL
open science

Pollution de type urbaine au monoxyde de carbone et sensibilité du myocarde au syndrome d'ischémie-reperfusion : rôle cardioprotecteur de l'exercice

Grégory Meyer

► To cite this version:

Grégory Meyer. Pollution de type urbaine au monoxyde de carbone et sensibilité du myocarde au syndrome d'ischémie-reperfusion : rôle cardioprotecteur de l'exercice. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2010. Français. <NNT : 2010AVIG0702>. <tel-00595083>

HAL Id: tel-00595083

<https://theses.hal.science/tel-00595083v1>

Submitted on 23 May 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.



HAL Authorization

ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

THESE

Présentée à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPECIALITE :

Sciences du Mouvement Humain

**Pollution de type urbaine au Monoxyde de Carbone et sensibilité
du myocarde au syndrome d'ischémie-reperfusion : Rôle
Cardioprotecteur de l'Exercice**

Par

Grégory MEYER

Soutenue le 21 octobre 2010 devant le jury composé de :

M. François BOUCHER, Professeur à Université de Grenoble

Rapporteur

Mme. Monique BERNARD, DR à l'Université de Marseille

Rapporteur

M. Bernard JOVER, Docteur à l'Université de Montpellier

Examineur

M. Sylvain RICHARD, DR à l'INSERM de Montpellier

Examineur

M. Philippe OBERT, Professeur à l'Université d'Avignon

Directeur de thèse

M. Cyril REBOUL, MCF à l'Université d'Avignon

Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je voudrais témoigner ma très grande reconnaissance à tous ceux et celles qui ont su me soutenir et m'aider dans son élaboration.

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Philippe Obert, qui m'a accueilli, il y a trois ans dans son équipe. Je le remercie d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse ainsi que de m'avoir aidé lorsque c'était nécessaire.

Je remercie particulièrement le Docteur Cyril Reboul de m'avoir encadré durant ces trois années de thèse. Je le remercie de la confiance qu'il m'a témoigné durant ces années, merci pour son aide aussi bien professionnelle que personnelle.

Je remercie également le Professeur François Boucher et le docteur Monique Bernard d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que les docteurs Sylvain Richard et Bernard Jover d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Je remercie encore une fois Cyril. Un encadrant de thèse est souvent associé à un deuxième père ; ce n'est pas ton cas... Tu as été pendant ces trois années de thèse un grand frère qui a su encadrer ce travail de thèse avec la rigueur nécessaire mais également avec une grande sympathie. Tu as su me guider sur les chemins de la recherche mais également être un ami dans la vie de tous les jours. Pour tout cela je te remercie, et j'espère sincèrement avoir l'occasion de continuer à travailler avec toi par la suite.

Merci à Julien (Boissière), pour son aide au cours de cette thèse. Bien que ton départ vers les contrées nordiques fasse que tu n'étais pas présent cette dernière année, tu as su m'enseigner au cours des 2 premières années de ma thèse nombre de choses. Merci également à toi pour ta rigueur débordante et son amitié. J'espère qu'on aura à nouveau l'occasion de travailler ensemble et promis je marcherai doucement et je laisserai le chauffage à 37°C dans le labo.

Merci également à Stéphane (Tanguy), sans toi je n'aurai pu faire une belle thèse. Selon tes conseils j'ai quitté le but que j'envisageais pour avancer vers de plus grands objectifs. Grâce à toi on a appris à calculer en cent leçons et ne pas se tromper dans les doses. Voilà, des remerciements un peu particuliers, mais ne boude pas, ce n'est pas ton genre, il faut savoir prendre la chose en riant...

Merci à Sandrine (Gayraud, SDH) pour son aide. Pour avoir participé à ma formation à la vie pratique de laboratoire et m'avoir aidé dans mes manip et cela toujours dans la bonne humeur. Merci également à toi pour ton amitié et ton soutien moral tout au long de ces 3 années de thèse.

Merci à Charlotte (Farah) avec qui j'ai eu la chance de collaborer et que j'ai pu embêter ces 2 dernières années. Continue comme ça et ne te laisse pas trop influencer par tes papas ! J'espère avoir de nouveau l'occasion de travailler avec toi d'ici quelques temps.

Un grand merci à l'ensemble de ma promotion de thèse (2007-2010), à savoir Greg Doucende. Bien qu'on ait jamais réellement travaillé ensemble, nous avons toujours travaillé cote à cote et appris l'un de l'autre. Merci à toi pour ton amitié et j'espère avoir l'occasion de collaborer avec toi d'ici quelques années.

Merci à Lucas (Dédé) ; j'ai eu la chance de collaborer à distance avec toi. Je te souhaite bon courage pour ta thèse et ton futur, où qu'il soit...

Merci à l'ensemble des personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler au cours de cette thèse, notamment nos collaborateurs de l'U637 de Montpellier, du laboratoire UMR5525 de Grenoble et de l'INRA d'Avignon.

Un grand merci à l'ensemble du personnel du pôle sportif (enseignants ou non). Merci tout particulièrement à Sandrine Girard (SDB) pour son aide dans tout ce qui était administratif et sa bonne humeur au quotidien. A Yann, Julie et Allal pour leur gentillesse et leur aide.

Merci à tous mes collègues de bureau, anciens et nouveaux pour leur aide et leur soutien (Tom, Damien, Aurelien, Adrien, Faycal, Sabe(u)r, Amine, David, Eddy. Je souhaite à tous les nouveaux de prendre autant de plaisir que j'en ai eu à réaliser ce travail de thèse.

Merci également aux autres Maitres de conférences et Professeurs du laboratoire (Steph Noltin, Agnès Vinet, Guillaume Walther, Pascal Laurant) avec qui je n'ai pas eu l'occasion de travailler directement mais avec qui j'ai quand même appris et passé de bons moments.

Un grand merci à John Scotch, pour son aide dans la mise au point des manip et le bon déroulement de celles-ci.

Merci également à Hilary, Julien et Agatha pour votre aide dans la rédaction en Anglais des articles.

Merci à mes amis et ma famille et plus particulièrement à mon frère qui m'ont toujours soutenu et aidé quand ils le pouvaient.

Un merci à tous mes petits rats, bien que l'on passe souvent pour des tortionnaires, c'est sûrement nous qui les aimons le plus et sans eux rien n'aurait été possible.

Enfin, un grand merci à mes parents sans qui tout cela n'aurait été possible. Ils m'ont soutenu moralement et financièrement tout au long de mon cursus universitaire, mais m'ont également donné les bases me permettant de réussir celui-ci. Merci pour l'amour qu'ils m'ont porté ainsi que pour leur soutien et confiance inconditionnels.

A mes parents et mon frère...

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE..... 15

REVUE DE LITTERATURE 20

I. ISCHEMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE21

1. Généralités 21

1.1. L'ischémie..... 21

1.1.1. Lésions réversibles suite à une ischémie de courte durée 22

1.1.2. Lésions irréversibles suite à une ischémie prolongée 23

1.2. La reperfusion 24

1.3. La mort cellulaire au cours de l'IR..... 26

1.4. Les troubles du rythme au cours de la reperfusion post-ischémique..... 27

1.5. Les troubles fonctionnels au cours de l'IR..... 28

1.6. Le phénomène de no-reflow 28

2. Stress oxydant et Ca^{2+} intracellulaire au cours de l'IR myocardique..... 30

2.1. Rôle du stress oxydant 30

2.1.1. Généralités..... 30

a- Facteurs pro-oxydants..... 30

b- Facteurs antioxydants..... 32

2.1.2. Les radicaux libres au cours de l'IR..... 33

a- Les radicaux libres de l'oxygène 33

b- Le monoxyde d'azote..... 35

2.2. Rôle du Ca^{2+} intracellulaire..... 40

2.2.1. Régulation du Ca^{2+} intracellulaire et couplage excitation contraction..... 40

2.2.2. Trouble de l'homéostasie calcique au cours du syndrome d'IR..... 42

a- Au cours de l'ischémie..... 42

b- Au cours de la reperfusion..... 43

2.3. Lésions d'IR : Rôle du stress oxydant et de la surcharge calcique 46

2.3.1.	Mort cellulaire au cours de l'IR.....	46
2.3.2.	Sidération myocardique	49
2.3.3.	Arythmies de reperfusion post-ischémique	50
2.3.4.	Phénomène de no-reflow.....	50
II.	LE MONOXYDE DE CARBONE	52
1.	<i>Le CO exogène</i>	<i>53</i>
1.1.	Effets cardiovasculaires d'une exposition à de fortes concentrations de CO.....	53
1.1.1.	Données épidémiologiques	53
1.1.2.	Données expérimentales.....	54
1.2.	Effets cardiovasculaires d'une exposition à de faibles concentrations de CO.....	55
1.2.1.	Données épidémiologiques	56
1.2.2.	Données expérimentales.....	56
a-	Remodelage morphologique et fonctionnel cardiaque	56
b-	Statut redox cellulaire	58
c-	Homéostasie calcique cellulaire	59
d-	Perfusion myocardique.....	60
1.3.	Le CO endogène	62
2.	<i>CO et IR myocardique</i>	<i>63</i>
2.1.	Exposition au CO exogène.....	63
2.2.	CO endogène	64
III.	EXERCICE D'ENDURANCE ET CARDIOPROTECTION.....	65
1.	<i>Données épidémiologiques</i>	<i>65</i>
2.	<i>Données expérimentales</i>	<i>65</i>
2.1.	Statut antioxydant.....	66
2.2.	Homéostasie calcique	67
2.2.1.	Généralités.....	68
2.2.2.	Dans le cadre de pathologies.....	70
2.3.	Autres facteurs	71

MATERIEL ET METHODE	73
I. POPULATION	74
II. EXPOSITION AU CO.....	76
III. ENTRAINEMENT EN ENDURANCE	79
IV. ISCHEMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE	81
1. <i>Fonction cardiaque et mort cellulaire au cours de l'IR.....</i>	<i>82</i>
2. <i>Evaluation des arythmies de reperfusion.....</i>	<i>85</i>
V. HOMEOSTASIE CALCIQUE SUR CARDIOMYOCYTES ISOLES.....	87
1. <i>Isolement cellulaire</i>	<i>87</i>
2. <i>Imagerie calcique et raccourcissement cellulaire</i>	<i>87</i>
3. <i>Paramètres mesurés.....</i>	<i>89</i>
4. <i>Protocole d'anoxie-reoxygenation cellulaire.....</i>	<i>90</i>
VI. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES.....	91
1. <i>Le N-Acetylcystéine (NAC)</i>	<i>91</i>
2. <i>Le S-methyl isothiouréa (SMT)</i>	<i>91</i>
VII. BIOCHIMIE.....	92
1. <i>Activité enzymatique</i>	<i>92</i>
1.1. <i>Statut enzymatique antioxydante.....</i>	<i>92</i>
1.1.1. <i>Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD.....</i>	<i>92</i>
1.1.2. <i>Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT.....</i>	<i>93</i>

1.1.3.	Evaluation de l'activité enzymatique de la GPx.....	93
1.1.4.	Evaluation de l'activité de la thioredoxine réductase	93
1.2.	Activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les effluents coronaires au cours du protocole d'IR.....	94
2.	<i>Production de NO au cours du protocole d'IR</i>	<i>94</i>
3.	<i>Peroxydation lipidique myocardique.....</i>	<i>95</i>
4.	<i>Western blots</i>	<i>95</i>
4.1.	Préparation des échantillons.....	95
4.2.	Dosage des protéines	96
4.3.	Western immunoblotting.....	96
4.4.	Evaluation immuno-histologique de l'expression de iNOS cardiaque	97
VIII.	TRAITEMENT STATISTIQUE	98
PUBLICATIONS	99
I.	ETUDE N°1	101
1.	<i>Résumé article 1</i>	<i>101</i>
1.1.	Contexte scientifique	101
1.2.	Méthodologie	102
1.3.	Résultats majeurs	102
2.	<i>Article n°1 :</i>	<i>103</i>
3.	<i>Résultats additionnels</i>	<i>113</i>
II.	ETUDE N°2	117
1.	<i>Résumé article 2</i>	<i>117</i>
1.1.	Contexte scientifique	117
1.2.	Méthodologie :	118
1.3.	Résultats majeurs :	118

2. Article n°2 :	119
III. ETUDE N°3	145
1. Résumé article 3	145
1.1. Contexte scientifique :	145
1.2. Méthodologie :	146
1.3. Résultats majeurs :	146
2. Article n°3 :	147
DISCUSSION	172
I. EXPOSITION PROLONGEE A DE FAIBLES CONCENTRATIONS DE CO ET SENSIBILITE DU MYOCARDE A L'IR	173
II. ENTRAINEMENT EN ENDURANCE ET CARDIOPROTECTION	178
III. CONCLUSION	180
PERSPECTIVES	183
BIBLIOGRAPHIE	186
LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET IMAGES	233
I. FIGURES	234
II. TABLEAUX	238
III. IMAGES	238

LISTE DES ABREVIATIONS :

ACG: Artère coronaire antérieure gauche	K⁺: Potassium
ADP: Adénosine diphosphate	LDH: Lactate déshydrogénase
AFS: Air filtré standard d'animalerie	mPTP: Pore de transition de perméabilité mitochondriale
AIF: Apoptosis Inducing Factor	Na⁺: Sodium
A/R: Anoxie-réoxygénation	NAC: N-acetylcystéine
ATP: Adénosine triphosphate	NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
BCA: Acide bicinchonique	NCX: Echangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
BH₄: Tetrahydrobioptérine	nNOS: Monoxyde d'azote synthétase neuronale
BSA: Albumine sérique bovine	NO: Monoxyde d'Azote
Ca²⁺: Calcium	NOS: Monoxyde d'azote synthétase
CAT: Catalase	O₂: Oxygène
CMLV: Cellule musculaire lisse vasculaire	O₂⁻: Anion superoxyde
CO: Monoxyde de carbone	OH[·]: Radical hydroxyle
CORM: Carbon monoxide releasing molecule	OMS: Organisation mondiale de la santé
CP: Phosphocréatine	ONOO⁻: Peroxynitrite
DHP: dihydropyridine	Pdev: Pression développée
+ dP/dt_{max}: dérivée maximale de pression	PKA: Protéine kinase A
- dP/dt_{max}: dérivée minimale de pression	PKG: Protéine kinase G
ECG: électrocardiographique	Ppm: Particule par million
eNOS: Monoxyde d'azote synthétase endothéliale	PVDF: Polyvinylidène difluoride
EROA: Espèces réactives oxygénées azotées	RLO: Radicaux libres de l'oxygène
ES: Extrasystole	RO[·]: Radical alkoxyde
FAD: Flavine adénine dinucléotide	RO₂⁻: Radical peroxyde
FFT: Transformée de Fourier rapide	RS: Réticulum sarcoplasmique
FMN: Flavine mononucléotide	RyR: Récepteurs de la ryanodine
FV: Fibrillation ventriculaire	SERCA: Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.	SMT: S-methyl isothiouréea
GCs: Guanylate cyclase soluble	SOD: Superoxyde dismutase
GMPc: Guanosine monophosphate cyclique	TBARS: Substances réagissantes avec l'acide thiobarbiturique
GPx: Glutathion Peroxydase	TCA: Acide trichloroacetic
GSH: Glutathion réduit	TNF-α: Facteur de nécrose tumorale α
GSSH: Glutathion oxydé	TrxR: Thiorédoxine réductase
GTP: Guanosine triphosphate	TTC: Triphenyl-tetrazolium chloride
HbCO: Carboxyhémoglobine	TV: Tachycardie ventriculaire
HO₂[·]: Radical perhydroxyle	VG: Ventricule gauche
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène	VMA: Vitesse maximale aérobie
HSP: Heat shock protein	XO: Xanthine oxydase
iNOS: Monoxyde d'azote synthétase inductible	
IR: Ischémie-reperfusion	

Introduction générale

Au cours de cette dernière décennie, de réelles avancées dans le traitement des maladies coronariennes ont été réalisées. Malgré cela, ces pathologies demeurent la deuxième cause de mortalité au monde avec, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 7,2 millions de décès par an. En France, leur pronostic reste grave puisque l'infarctus du myocarde est à ce jour encore responsable de 10 à 12 % de la mortalité totale annuelle chez l'adulte. L'infarctus du myocarde se caractérise par une destruction du tissu cardiaque résultant d'un apport de sang insuffisant via le réseau artériel coronaire. Le seul moyen de limiter la mort cellulaire au cours de ce processus est de reperfusionner le plus rapidement possible le territoire ischémié, à l'aide d'agents pharmacologiques et de techniques endovasculaires ou chirurgicales. Cette restauration de la circulation coronaire, après un épisode ischémique, n'est cependant pas sans risque et peut entraîner des lésions réversibles ou non, que l'on qualifie de lésions d'ischémie-reperfusion (IR). Les lésions les plus fréquemment observées suite à une séquence d'IR sont la mort cellulaire, les arythmies ventriculaires, les troubles fonctionnels contractiles associés à une altération des paramètres hémodynamiques, et une altération de la perfusion tissulaire.

La sévérité des lésions myocardiques associées à ce syndrome d'IR résulte d'une interaction complexe entre facteurs génétiques et environnementaux. Parmi ces facteurs environnementaux, la pollution atmosphérique semble jouer un rôle primordial et constitue de ce fait un problème de santé publique majeur. Des enquêtes épidémiologiques récentes montrent qu'une augmentation significative des principaux indicateurs de pollution de l'air provoque une augmentation des taux de fréquentation des services d'urgence hospitaliers, mais aussi des décès prématurés chez les personnes âgées et les personnes fragilisées par une pathologie chronique, en particulier cardiovasculaire (Momas et al., 1993 ; Moolgavkar, 2000 ; Schwela, 2000). Les principaux polluants atmosphériques mis en causes sont : le dioxyde de soufre

(SO₂), les oxydes d'azote (NO_x), l'ozone (O₃), les oxydes de carbone (CO_x) et les micro- et nano-particules. Récemment, de nombreux travaux ont été consacrés à ces dernières (Schwartz, 1994 ; Wichmann et al., 2000 ; Wellenius et al., 2003). D'autres polluants, dont le monoxyde de carbone (CO), ont cependant fait l'objet de beaucoup moins d'attention. Celui-ci constitue pourtant un polluant majeur, dont le taux d'exposition est très fortement corrélé avec l'accroissement du taux de mortalité cardiovasculaire, notamment chez les populations à risque (coronariens, insuffisants cardiaques) (Burnett et al., 1997). De plus, plusieurs travaux rapportent une augmentation des arythmies cardiaques lors d'expositions courtes au CO (Hinderliter et al., 1989 ; Sheps et al., 1990). Les mécanismes biologiques potentiellement associés à la perte de cohérence fonctionnelle du système cardiovasculaire lors d'une exposition de type environnementale urbaine au CO restent, à ce jour, largement inexpliqués. Les principales connaissances actuelles concernant les effets cardiovasculaires du CO ont été élaborées dans le cadre de travaux en toxicologie, pour lesquels les taux de CO utilisés sont très supérieurs à ceux rencontrés lors de pollutions citadines (500 à 5000 particules par million (ppm) vs. 15 à 100 ppm). Très récemment, certains travaux (Bye et al., 2008 ; Andre et al., 2010) ont rapporté qu'une exposition prolongée à de faibles concentrations de ce polluant pouvait également conduire à des effets délétères au plan cardiovasculaire. Ainsi, Bye et al., (2008) puis Andre et al., (2010) ont établi qu'une exposition prolongée au CO, à des concentrations similaires à celles mesurées en environnement urbain est à l'origine d'un remodelage de l'ultrastructure cardiaque. En particulier, ces auteurs ont mis en évidence des effets délétères majeurs du CO sur les cardiomyocytes de rats sains, à l'origine du développement d'un phénotype cellulaire pathologique. Dans ces deux études, il n'est cependant pas rapporté d'effets majeurs de ce type d'exposition sur la cohérence fonctionnelle de l'organe. Il convient toutefois de noter une exacerbation des arythmies ventriculaires en condition de stress β -Adrénérgiques dans le travail conduit par Andre et al., (2010). Bien que

le remodelage phénotypique pathologique des cardiomyocytes puisse jouer un rôle clé dans la plus grande vulnérabilité du cœur à un stress majeur, tel que l'IR, et ainsi contribuer à une meilleure compréhension de l'accroissement du taux de mortalité cardiovasculaire chez les populations régulièrement exposées à ce gaz ; à ce jour aucune étude, ne s'est intéressée aux effets d'une exposition prolongée à une pollution de type citadine au CO sur la sensibilité du myocarde à l'IR.

Le premier objectif de ce travail de thèse sera donc sera donc d'évaluer les effets du remodelage cardiomyocytaire, induit par la pollution de type environnementale urbaine au CO, sur la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR, et d'en comprendre les mécanismes sous-jacents (Etudes n°1 et n°2).

L'exercice physique constitue une situation de "stress physiologique" pour l'organisme et le myocarde en particulier. De nombreux travaux font pourtant état de la nécessité de pratiquer un exercice physique quotidien, notamment chez les populations à risque, tant le remodelage est favorable, les améliorations fonctionnelles associées sont grandes et par voie de conséquence le pronostic de vie amélioré (Paffenbarger et al., 1986 ; Jolliffe et al., 2001 ; Gulati et al., 2003). Ainsi, parmi les nombreuses méthodes permettant d'améliorer la protection du muscle cardiaque, dont un grand nombre font appel à des traitements pharmacologiques lourds, l'exercice physique en endurance est régulièrement rapporté comme étant un moyen efficace d'améliorer la tolérance myocardique aux troubles cardiovasculaires, et au syndrome d'IR en particulier (Demirel et al. 2001 ; Powers et al. 2001 ; Hamilton et al. 2003 ; French et al. 2008). Ainsi, une originalité de notre travail sera d'évaluer les effets potentiellement cardioprotecteurs d'un exercice physique régulier, réalisé

en environnement sain, sur le phénotype myocardique de la population expérimentale exposée de façon prolongée à une pollution de type environnementale urbaine au CO.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse (étude n°3) sera d'évaluer les effets potentiellement protecteurs d'une pratique modérée d'exercice en endurance sur le remodelage phénotypique pathologique de cardiomyocytes de rats exposés au CO et l'impact de cette stratégie sur la sévérité des lésions myocardiques induites lors d'un syndrome d'IR.

Revue de littérature

I. Ischémie-reperfusion myocardique

1. Généralités

Les pathologies myocardiques ischémiques sont la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. L'ischémie myocardique se définit comme une situation de déséquilibre entre les besoins et les apports en oxygène (O₂) et nutriments du myocarde. Ce déséquilibre peut survenir soit en cas d'augmentation de la demande en O₂, comme au cours d'une tachycardie ou d'un exercice musculaire, soit suite à une réduction des apports. Dans le cas d'un infarctus du myocarde, la réduction de la perfusion myocardique peut être due à un rétrécissement du calibre des artères coronaires, à l'obstruction par un thrombus ou à la présence d'une plaque d'athérome. Pour des sténoses supérieures à 80 % et malgré une vasodilatation maximum, la résistance vasculaire augmente très rapidement et peut alors se traduire par une ischémie.

Au cours de ces dernières décennies, le traitement de l'évènement ischémique aigu est entré dans une nouvelle aire avec le développement de différentes techniques permettant la reperfusion de la zone ischémisée. Cependant cette stratégie de reperfusion du myocarde ischémique, essentielle à la survie de l'organe, est rapportée comme étant à l'origine de lésions propres. La reperfusion étant le seul remède à l'ischémie, celle-ci est considérée alors comme une « épée à double tranchant » (Jennings et Reimer, 1983 ; Crompton, 1999).

1.1. L'ischémie

L'ischémie myocardique est un processus dont la sévérité des lésions dépend de la durée et de la taille de la zone ischémisée (Reimer and Jeinings, 1979 ; Opie, 1990 ; Ytrehus et al., 1994). De ce fait on peut différencier les ischémies de courtes durées, dont les effets sont réversibles et les ischémies prolongées dont certaines conséquences sont irréversibles (Herdson et al., 1965 ; Reimer and Jeinings, 1979). Dans des conditions physiologiques, l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de l'organe provient principalement de l'oxydation des acides gras, apportés au myocarde par la circulation coronaire. La diminution de l'apport en O₂ provoquée par l'ischémie conduit dans un premier temps à un ralentissement ou à l'arrêt total du métabolisme oxydatif et à une stimulation de la glycolyse anaérobie. Celle-ci permet de compenser en partie le déficit énergétique mais la production d'adénosine triphosphate (ATP) reste insuffisante pour couvrir les besoins, entraînant ainsi une diminution de l'activité contractile (Opie, 1990). L'activation de la glycolyse anaérobie conduit à l'accumulation de lactate et de protons H⁺ responsables d'une acidose cellulaire, provoquant une inhibition des enzymes de la glycolyse et ayant des effets délétères sur l'intégrité cellulaire (Rovetto et al., 1975) (Figure 1). L'ischémie myocardique peut alors aboutir à des modifications hémodynamiques et/ou des troubles du rythme, puis à un stade ultime conduire à la nécrose de la zone concernée (De Leiris et Opie, 1978 ; Hearse, 1979 ; Mickelson et al., 1990).

1.1.1. Lésions réversibles suite à une ischémie de courte durée

Durant les premières minutes d'ischémie, les dommages cellulaires sont réversibles : si la perfusion coronaire est rétablie, il n'y a pas de mort cellulaire myocytaire (Mickelson et al., 1990). Les dommages ischémiques sont considérés comme totalement réversibles jusqu'à une quinzaine de minutes d'ischémie. Dans ce cas, il n'apparaît pas d'infarctus et les cellules ischémisées puis reperfusées retrouvent un métabolisme et une fonction normale dans les heures

ou jours qui suivent la reperfusion. Si l'ischémie est plus longue, certains dommages irréversibles apparaissent (Opie, 1990 ; Ytrehus et al., 1994) (Figure 1).

1.1.2. Lésions irréversibles suite à une ischémie prolongée

Si l'ischémie myocardique est prolongée au-delà de 15 à 20 min, les myocytes cardiaques sont irréversiblement endommagés. Ces lésions se caractérisent par la présence d'inclusions intermitochondriales denses, des ruptures de membrane qui peuvent conduire à la fuite des composants cellulaires et à une anarchie architecturale (Mickelson et al., 1990). Par ailleurs, au niveau cellulaire on observe une aggravation des déséquilibres ioniques, caractérisée notamment par une surcharge calcique (Hearse, 1988 ; Steenbergen et al., 1990 ; King et Opie, 1998 ; King et Opie, 1998). Le tissu myocardique ainsi endommagé ne pourra recouvrer un métabolisme adapté ni une fonction normale (Figure 1)

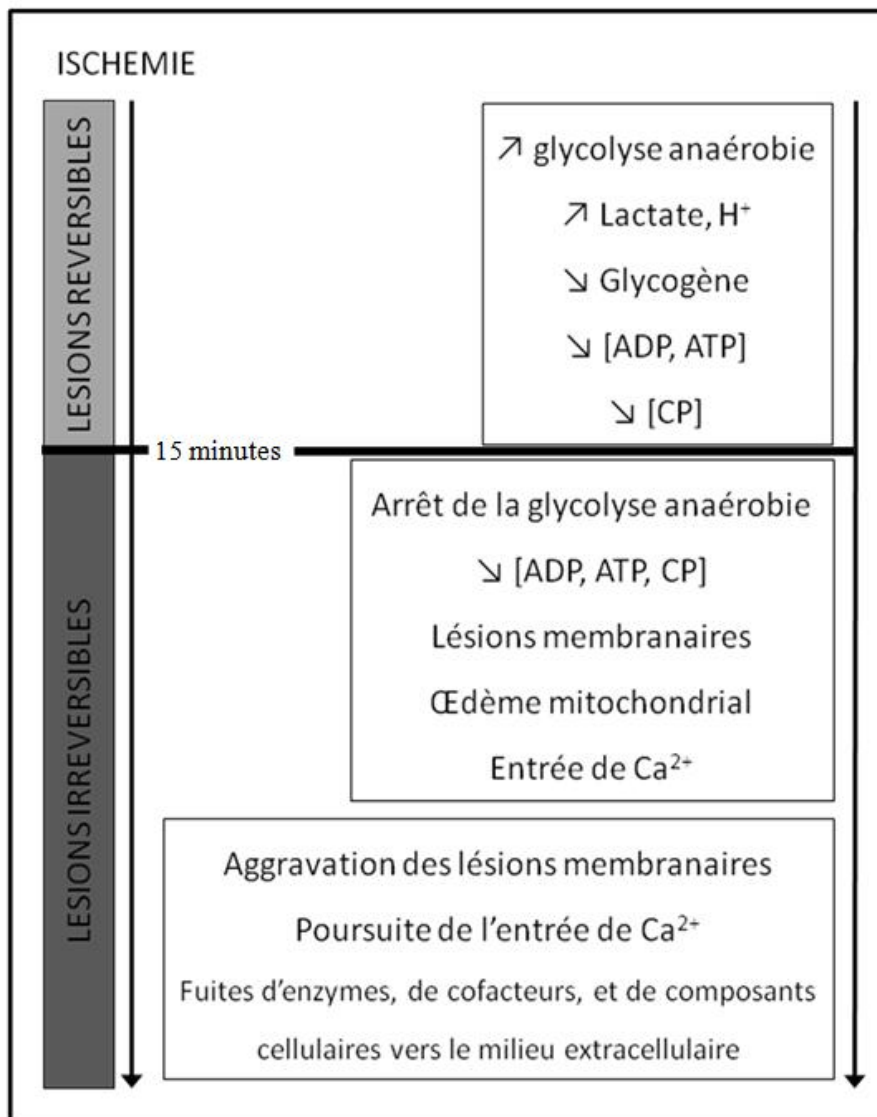


Figure 1 : Séquence des altérations cellulaires induites par l'ischémie myocardique, adapté de Mickelson et al., (1990). ATP : Adénosine triphosphate ; ADP : Adénosine diphosphate ; CP : Phosphocréatine.

1.2. La reperfusion

Il est clairement établi que les cardiomyocytes ne peuvent survivre dans des conditions d'ischémie sévère prolongée. A l'heure actuelle, la reperfusion coronaire est reconnue comme

étant la seule méthode permettant de réduire la taille de l'infarctus, ceci étant valable aussi bien en clinique que dans les modèles expérimentaux (Cour et Argaud, 2010). Cliniquement, la reperfusion précoce est possible grâce au développement de la thrombolyse et de l'angioplastie. Cette reperfusion permet la récupération du myocarde tant qu'il n'y a pas eu de lésions irréversibles. Cependant la reperfusion est une « épée à double tranchant » : la restauration d'un flux sanguin provoque des lésions propres au cours desquelles l'aggravation de la surcharge calcique et la formation de radicaux libres de l'oxygène (RLO) jouent probablement un rôle majeur (Yellon et Hausenloy, 2007). Ces lésions sont regroupées sous le nom de « syndrome de reperfusion » (Becker et Ambrosio, 1987). On peut distinguer 4 grands types de lésions :

- la mort cellulaire (nécrose, apoptose et autophagie)
- les troubles du rythme (les arythmies de reperfusion)
- les troubles fonctionnels (sidération myocardique ou « myocardial stunning »)
- les altérations de la perfusion (phénomène de « no reflow »).

Lors de la reperfusion, l'apport brutal et massif d'O₂ conduit à la formation de RLO très réactifs (Zweier et al., 1987 ; Misra et al., 2009). Le terme radical désigne toute espèce chimique instable possédant un électron non apparié ou célibataire. Les RLO, libérés au cours de la reperfusion provoquent une inactivation des enzymes et une peroxydation des lipides membranaires touchant le sarcolemme, le réticulum sarcoplasmique (RS) et les mitochondries. L'augmentation de la production de RLO est associée au niveau du sarcolemme à une augmentation du calcium (Ca²⁺) intracellulaire favorisant les lésions membranaires et conduisant à un dysfonctionnement contractile (Marban, 1991 ; Maxwell et lip, 1997 ; Bolli et Marban, 1999). L'augmentation de la production de RLO et de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire semblent être les facteurs majeurs à l'origine des lésions

observées au cours de la reperfusion post-ischémique (Myers et al., 1985 ; Murphy et Steenbergen, 2008).

1.3. La mort cellulaire au cours de l'IR

La gravité des lésions d'IR, telles que la mort cellulaire, dépend de la durée et de la sévérité de l'ischémie ainsi que de la taille de la zone ischémique. L'ischémie conduit à la mort cellulaire en 20 à 60 min et la reperfusion accélère ce phénomène (Yellon et Hausenloy, 2007 ; Cour et Argaud, 2010) (Figure 2). La zone à risque, qui correspond à la région du myocarde vascularisée par l'artère coronaire occluse, est un déterminant essentiel du volume final de la zone infarctée. Cette mort cellulaire au cours de l'IR évolue de l'endocarde vers l'épicarde et du centre de la nécrose vers la périphérie (Cour et Argaud, 2010). La mort cellulaire observée au cours de la reperfusion est caractérisée selon 3 types : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie.

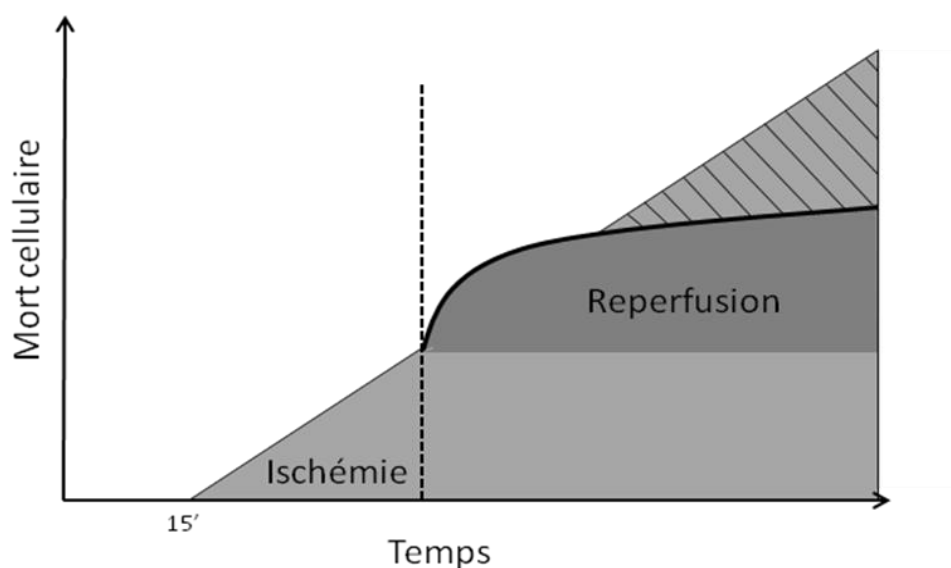


Figure 2: Cinétique d'extension temporelle de la mort cellulaire au cours d'un syndrome d'IR, adapté de Cour et Argaud, (2010).

- La nécrose : lors de la reperfusion, un certain nombre de cardiomyocytes peuvent entrer en processus de nécrose. Trois hypothèses ont été soulevées pour expliquer l'origine de la nécrose : le gonflement osmotique des myocytes, la surcharge calcique et les dommages radicalaires (Piper et al., 1998).
- L'apoptose : ou mort cellulaire programmée, est un processus de mort cellulaire soumis à régulation. Au cours de l'ischémie myocardique, l'activation du programme apoptotique dans les cardiomyocytes peut être considérée comme un processus adaptatif des zones hypoperfusées. Ce phénomène serait fortement accentué au moment de la reperfusion, notamment suite aux lésions mitochondriales (Yaoita et al., 1998 ; Mocanu et al., 2000).
- L'autophagie : est un processus physiologique servant à extraire de la cellule les composants endommagés mais pouvant cependant conduire à la mort de la cellule. Bien que le rôle de l'autophagie au cours du syndrome d'IR soit encore discuté, il semblerait que l'autophagie puisse devenir délétère en présence d'une concentration élevée de Ca^{2+} (Hoyer-Hansen et al., 2007) ou de RLO (Liu et Lenardo, 2007 ; Takagi et al., 2007).

1.4. Les troubles du rythme au cours de la reperfusion post-ischémique

Les arythmies de reperfusion ont été mises en évidence par Tennant et Wiggers en 1935 et ont depuis fait l'objet de nombreuses études. Ces arythmies associées à la reperfusion du myocarde ischémique, peuvent être plus ou moins sévères et complexes, allant de simples salves d'extrasystoles à une fibrillation ventriculaire irréversible (Walker et al., 1988). Quelle que soit l'espèce animale étudiée, ces arythmies apparaissent de façon précoce, débutant le plus souvent dans les 30 premières secondes de la reperfusion. Plus l'ischémie est de courte

durée, plus des arythmies de reperfusion sont observées (Hearse et Tosaki, 1987 ; Hearse et Tosaki,1988). Bien que les mécanismes responsables de ces arythmies restent débattus, il semble que la formation de radicaux libres ainsi que la surcharge calcique intracellulaire en soient les principaux acteurs (Ter Keurs et Boyden 2007 ; Said et al., 2008).

1.5. Les troubles fonctionnels au cours de l'IR

Dans le cadre de l'IR, le terme de « sidération myocardique » s'applique à une dysfonction contractile temporaire observée au cours de la reperfusion. Décrite chez le chien en 1975 par Heyndrickx et al., (1975), cette dysfonction transitoire fut dénommée «stunning » par Braunwald et Kloner en 1982. Malgré l'absence de lésion irréversible et en présence d'une perfusion sanguine normale, la récupération fonctionnelle complète du myocarde ischémique peut nécessiter un délai de quelques heures à plusieurs semaines. Cette dysfonction persiste mais, en absence de nécrose cellulaire, est totalement réversible.

1.6. Le phénomène de no-reflow

Le phénomène de no-reflow se caractérise par une absence de reperfusion de certains territoires ischémiés, en dépit d'une recanalisation coronaire optimale. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Kloner et al., en 1974. Bien que discutés, les mécanismes à l'origine des lésions microvasculaires induites par l'IR feraient intervenir à des degrés variables :

- une atteinte fonctionnelle de l'endothélium des micro-vaisseaux consécutive au relargage de RLO au moment de la reperméabilisation coronaire (Kaeffer et al., 1997).

- une obstruction mécanique (microthrombose) de ces microvaisseaux générée par l'afflux brutal d'éléments figurés du sang, au premier rang desquels figurent les polynucléaires neutrophiles (Ito et al. 1999 ; Wakatsuki et al., 1999)
- une obstruction des artérioles et capillaires suite à un œdème tissulaire et une hypercontracture des cardiomyocytes (Ito et al. 1999).

2. Stress oxydant et Ca^{2+} intracellulaire au cours de l'IR myocardique.

2.1. Rôle du stress oxydant

2.1.1. Généralités

Le statut redox du milieu intracellulaire est contrôlé par une variété de facteurs actifs. Ce statut redox de la cellule est le point d'équilibre entre la présence de facteurs pro-oxydants et de facteurs antioxydants. Dans le cas d'un déséquilibre en faveur des substances pro-oxydantes, on parle de stress oxydant.

a- Facteurs pro-oxydants

Les facteurs pro-oxydants sont des dérivées de l'oxygène appelés RLO. Ce sont des molécules très réactives qui peuvent interagir avec les molécules de leur entourage. Ce qui confère aux RLO leur caractère fortement réactif est la présence sur l'orbitale externe d'un atome d' O_2 de la molécule concernée, d'un électron célibataire, pouvant être à l'origine de réactions en chaîne.

Ceux-ci sont généralement produits par le métabolisme cellulaire. Parmi ces facteurs pro-oxydants on retrouve des radicaux libres tels que le radical superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$), le radical perhydroxyle (HO_2), le radical hydroxyle (OH), le radical peroxyde ($\text{RO}_2\cdot^-$) et le radical alkoxyde ($\text{RO}\cdot^-$), ainsi que des formes non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Misra et al., 2009). Le radical $\text{O}_2\cdot^-$ a une durée de vie de l'ordre de quelques secondes, ce qui lui permet de diffuser au-delà de son lieu de production (Pacher et al., 2007). La toxicité du

radical $O_2^{\cdot-}$ est directe via une action délétère sur les constituants cellulaires, mais aussi indirecte, car il peut former d'autres RLO ou réagir avec le monoxyde d'azote (NO) pour former des espèces réactives oxygénées azotées (EROA) telles que le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Pacher et al., 2007). Le $ONOO^-$ est un puissant oxydant dont la demi-vie est plus longue que celle de l' $O_2^{\cdot-}$. Ce premier peut franchir les membranes cellulaires et provoquer notamment l'oxydation et/ou la nitration de nombreuses cibles protéiques ainsi que la peroxydation des lipides membranaires (Szabo et al., 2007 ; Pacher et al., 2007). Les RLO et EROA sont ainsi capables d'endommager tous les types de composants cellulaires :

- Les acides nucléiques : l'attaque radicalaire est responsable d'altérations structurales et de lésions directes (brèches) sur la molécule d'ADN (Cochrane, 1991 ; Pacher et al., 2007). Ces lésions peuvent être à l'origine d'une altération de la synthèse protéique voire conduire à la mort de la cellule.
- Les protéines : la toxicité des RLO vis-à-vis des acides aminés peut entraîner des modifications structurales ou catalytiques des protéines (Kako et al., 1987).
- Les hydrates de carbone : Freeman et Crapo (1982) ont suggéré que les RLO pouvaient induire une modification des récepteurs membranaires en agissant sur les oligosaccharides membranaires.
- Les lipides membranaires : la peroxydation lipidique d'origine radicalaire a été largement étudiée. Les altérations des lipides membranaires peuvent conduire à des modifications de la perméabilité et du potentiel de membrane, à un dysfonctionnement mitochondrial, à une surcharge calcique (liée à des variations des perméabilités ioniques) et à l'inactivation d'enzymes membranaires (Misra et al., 2009).

b- Facteurs antioxydants

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production de RLO. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme « antioxydants » et désignent toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge, 1990). On peut distinguer deux catégories d'antioxydants : les défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques. Parmi les défenses antioxydantes non enzymatiques on retrouve notamment la vitamine E et A, l'acide ascorbique, le coenzyme Q10 et la cystéine. Bien que certaines études aient mis en avant l'intérêt de ces antioxydants, les défenses de type enzymatiques sont reconnues comme étant les plus performantes notamment au cours du syndrome d'IR. Il existe 3 principales enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT) qui agissent en synergie afin de défendre l'organisme contre le stress oxydant (Figure 3).

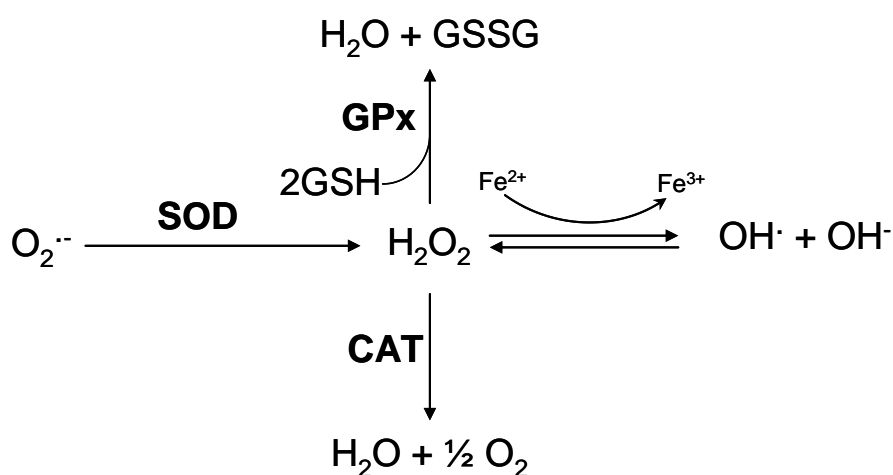


Figure 3 : Mécanismes d'action des principales enzymes antioxydantes en réponse à une production d'anion superoxyde.

- la SOD : est une métalloenzyme qui catalyse la dismutation du radical $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé n'est pas un radical libre, car tous ses électrons sont appariés, mais c'est malgré tout un intermédiaire réduit toxique qui possède une durée de vie relativement longue (quelques minutes). Comme le radical $O_2^{\cdot -}$, il possède la capacité de diffuser loin de son site de production et peut également traverser les membranes. La SOD est présente chez pratiquement tous les organismes vivants et procurent un système de défense essentiel à leur survie en milieu aérobie (Coassin et al., 1992 ; Irshad et Chaudhuri, 2002).
- La GPx : est une enzyme capable de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes. Le substrat de la GPx est le glutathion. La GPx réduit les hydroperoxydes en H_2O ou en alcool, tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSH) (Brigelius-Flohe, 1999).
- La CAT : est une enzyme héminique capable de transformer l' H_2O_2 en eau et en O_2 moléculaire. La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation de l' H_2O_2 (Kirkman et Gaetani, 2007).

2.1.2. Les radicaux libres au cours de l'IR

a- Les radicaux libres de l'oxygène

Bien que les RLO jouent un rôle physiologique dans des conditions basales, notamment via l'activation de différentes voies de signalisation (Okabe et al., 2000), au moment de la reperfusion leur augmentation massive est reconnue comme fortement délétère (Garlick et al., 1987 ; Bolli et al., 1988 ; Zweier, 1988 ; Vanden Hoek et al., 1996). Plusieurs

voies potentielles de production de RLO sont stimulées au cours de la reperfusion post-ischémique myocardique :

- La chaîne respiratoire mitochondriale : la mitochondrie est la source intracellulaire la plus importante de production d' $O_2\cdot^-$ et de l' H_2O_2 au moment de la reperfusion (Boveris, 1977). Au cours de l'ischémie, les cofacteurs réduits s'accumulent et au moment de la reperfusion, les électrons accumulés peuvent être en partie transférés à l' O_2 moléculaire pour produire de l' $O_2\cdot^-$. L'augmentation de l'activité mitochondriale est ainsi responsable d'un accroissement de la production d' $O_2\cdot^-$ à la reperfusion (Boveris, 1977).
- Le système de la xanthine oxydase (XO) : la XO catalyse la réaction d'oxydation univalente de l'hypoxanthine en xanthine qui s'accompagne de la formation d' $O_2\cdot^-$, de H_2O_2 et probablement d'oxygène singulet (Chambers et al., 1985). Celle-ci est produite sous forme de xanthine déshydrogénase, et convertit en XO par les protéases. Au cours de l'IR, l'activation des protéases provoquée par l'augmentation des concentrations intracellulaires en Ca^{2+} induit une augmentation de la synthèse de XO (Ferrari et al., 1998).
- Les NO synthétases (NOS) : les NOS sont des protéines enzymatiques qui synthétisent le NO. Dans des conditions physiologiques, celles-ci sont présentes sous forme d'homodimères et produisent le NO. Dans des conditions pathologiques, elles peuvent être découplées et forment alors de l' $O_2\cdot^-$ à la place du NO (Dumitrescu et al., 2007 ; Chen et al., 2010). Un découplage fonctionnel des NOS responsable de la formation de RLO, a été rapporté par Yamashiro et al., (2003) au cours de la reperfusion post-ischémique.
- Les leucocytes polynucléaires : la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase des neutrophiles catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en

$O_2^{\cdot-}$ et en H_2O_2 . L'activité de la NADPH oxydase est augmentée en réponse à la production d' $O_2^{\cdot-}$ au cours de la reperfusion post-ischémique (Borchi et al., 2009).

- L'oxydation de petites molécules réduites ou libérées au cours de l'ischémie peut entraîner la formation d' $O_2^{\cdot-}$, comme c'est le cas, par exemple, pour les catécholamines et les groupements thiols (Kevin et al., 2005).

b- Le monoxyde d'azote

Au cours des dernières décennies, le NO a pris une place considérable dans le champ de la biologie. Le NO est un composé chimique formé d'un atome d'oxygène et d'un atome d'azote. Ce gaz, dans les conditions normales de pression et de température, possède une très grande diffusibilité. Il a été mis en évidence au niveau du système cardiovasculaire par le groupe de Furchgott qui démontre en 1980 que l'endothélium vasculaire a la capacité de libérer un composé responsable d'une vasorelaxation (Furchgott et Zawadzki, 1980). Celui-ci est identifié peu après comme étant le NO (Ignarro et al., 1987 ; Palmer et al., 1987). Les effets régulateurs du NO s'exercent sur la plupart des grandes fonctions physiologiques de l'organisme. In vivo, la demi-vie du NO n'excède pas quelques secondes (Pacher et al., 2007). Celui-ci est capable de réagir avec la plupart des espèces oxygénées, avec les fonctions thiols et le fer héminique de biomolécules (Wink et Mitchell, 1998 ; Loscalzo, 2000). Le NO réagit avec l'oxygène pour former l'ion nitrite, cependant il peut également réagir avec l' $O_2^{\cdot-}$ pour former du $ONOO^-$. Cette réaction se fait avec une vitesse 5 fois supérieure à celle de la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ par la SOD (Pacher et al., 2007).

Le NO est produit par les différents isoformes de NOS. Les NOS sont des metalloenzymes possédant un groupement héminique. Plusieurs isoenzymes, qui diffèrent entre elles par leur localisation, leur caractère constitutif ou inductible, leur propriété

catalytique et leur mode de régulation. Le pourcentage d'homologie entre les 3 isoformes est de l'ordre de 50 % (Groves et Wang, 2000 ; Alderton et al., 2001). Les 3 isoformes actuellement identifiées sont :

- La NOS neuronale : nNOS (ou NOS1)
- La NOS inductible : iNOS (ou NOS2)
- La NOS endothéliale : eNOS (ou NOS3)

En condition physiologique, les NOS forment à partir de l'oxydation de la L-arginine du NO et de la L-citrulline (Darblade et al., 2000). Leur bon fonctionnement est influencé par la présence de différents cofacteurs tels que la tetrahydrobioptérine (BH₄), la flavine mononucleotide (FMN) et la flavine adenine dinucleotide (FAD) ainsi que de substrats (L-arginine et O₂). L'activité des 2 isoformes constitutifs de la NOS (eNOS et nNOS) est notamment régulée par la formation du complexe calcium-calmoduline alors que le fonctionnement de la NOS induite (iNOS) est indépendant des concentrations de Ca²⁺ intracellulaire (Xia, 2007).

La iNOS est exprimée dans des conditions pathologiques sous l'influence de produits bactériens tels que les lipolysaccharides ou les cytokines pro-inflammatoires mais également par la présence de RLO (Xie et al., 1994 ; Zhen et al., 2008). La iNOS peut être synthétisée dans de nombreux types de cellules. Le NO produit intervient dans les réactions inflammatoires, dans l'immunité non spécifique et au cours des processus de réparation cellulaire. Cependant, synthétisé en grande quantité par la iNOS, il peut réagir avec les RLO et former ainsi en grande quantité des composés capables d'endommager les cellules (Mungrue et al., 2002 ; Billiar, 1995).

Le NO joue un rôle fondamental dans le contrôle des fonctions vasculaires par son action vasodilatatrice. Le NO joue également un rôle important au niveau cardiaque puisque

les 3 isoformes de NOS peuvent être exprimés dans les cardiomyocytes. Bien que les résultats de nombreuses études soient contradictoires, il semble se dégager un consensus selon lequel de faibles concentrations de NO dans le tissu cardiaque auraient des effets inotropes positifs alors que de fortes concentrations de NO auraient des effets inotropes négatifs (Ungureanu-Longrois et al., 1995 ; Kojda et al., 1996 ; Kojda et Kottenberg, 1999). Par ailleurs il semblerait qu'une forte concentration de NO, liée à une majoration de l'expression induite de iNOS au niveau cardiaque, soit observée dans le développement de certaines cardiomyopathies (Joe et al., 1998 ; Shah et MacCarthy, 2000 ; Massion et Balligand, 2007).

Au cours de l'ischémie, la concentration de NO est diminuée puisque sa synthèse nécessite de l'O₂ (Moncada et Erusalimsky, 2002). Au cours des premières minutes de reperfusion, on observe par contre une augmentation massive de la production de NO (Wang et Zweier, 1996) suivie d'une baisse marquée liée à la diminution de la biodisponibilité en cofacteur BH₄ (Tiefenbacher et al., 1996).

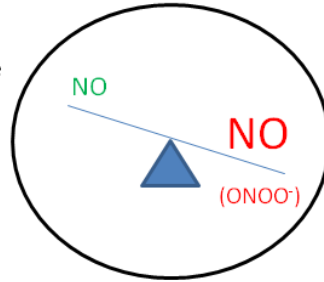
A ce jour, les effets du NO au cours de l'IR myocardique sont encore très largement débattus. En effet, bien que de nombreuses études rapportent des effets protecteurs au cours de l'IR et que certains auteurs présentent le NO comme un acteur essentiel du pré et post conditionnement myocardique (Ferdinandy et al., 2007), plusieurs autres travaux attribuent à celui-ci un rôle délétère au cours de l'IR (Berges et al., 2003). Ainsi, la synthèse de NO est rapportée dans certaines études comme permettant notamment de réduire la mort cellulaire et la sévérité des arythmies au cours du syndrome d'IR. (Linz et al., 1992 ; Schluter et al., 1994 ; Pabla et Curtis, 1995 ; Lefer et Lefer, 1996). Cette cardioprotection NO-dépendante, au cours du phénomène d'IR, semble être liée à une baisse de la surcharge calcique diastolique (Milbourne et Bygrave, 1995 ; Khan et Hare 2003) et/ou à une amélioration de la reperfusion tissulaire (Linz et al., 1992 ; Amrani et al., 1995). Néanmoins, il est aussi

rapporté que lors de la reperfusion, donc en condition pro-oxydante, la surproduction de NO est également responsable de la formation d'EROA, dont le ONOO⁻ (Beckman et Koppenol, 1996) à l'origine de nombreux dommages protéiques (Wang et Zweier, 1996). Plusieurs études ont notamment rapporté un rôle délétère majeur du ONOO⁻ sur les protéines régulatrices des mouvements calciques intra-cellulaire. Notamment, le ONOO⁻ est connu comme altérant le fonctionnement des pompes sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2a (SERCA-2a) (Lokuta et al., 2005) et comme étant à l'origine d'une nitrosilation des récepteurs de la ryanodine (RyR-2) (Stoyanovsky et al., 1997 ; Xu et al., 1998) contribuant ainsi à perturber l'homéostasie calcique au cours de l'IR. L'augmentation de la formation d'EROA serait par conséquent partiellement responsable de l'altération de la fonction contractile myocardique (Yasmin et al., 1997 ; Katori et al., 2006 ; Falk et al., 2007), des phénomènes de mort cellulaire (Patel et al., 1993 ; Liu et al., 1997) et des arythmies (Naseem et al., 1995) au cours de la reperfusion post-ischémique du myocarde.

En absence de consensus dans la littérature scientifique, il semble toutefois se dégager une position commune selon laquelle de faibles quantités de NO synthétisées au cours de l'IR pourraient jouer un rôle protecteur, alors qu'une surproduction de NO (au moment de la reperfusion ou suite à une expression induite de iNOS), aurait pour conséquence principale une production massive d'EROA à l'origine d'une aggravation des lésions myocardiques (Shah et MacCarthy, 2000 ; Massion et balligand, 2007) (Figure 4).

EFFETS BENEFIQUES

- Vasodilatateur
- Anti-neutrophile/ Antiplaquettaire
- Antibactérien/ Antiviral
- Amélioration de la fonction diastolique
- ↘ surcharge calcique
- ↗ efficacité énergétique
- Antioxydant
- Antiapoptotique



EFFETS DELETERES

- Altération de la vasomotricité
- ↗ de la perméabilité vasculaire
- Dommages tissulaires
- ↘ fonction contractile systolique
- ↗ de la surcharge calcique
- ↘ de la consommation d'O₂
- Pro-oxydant / ↘ réserve antioxydante
- Pro-apoptotique / dommages cellulaires

Figure 4 : Effets cardiovasculaires du NO, adapté de Shah et MacCarthy, (2000).

2.2. Rôle du Ca²⁺ intracellulaire

2.2.1. Régulation du Ca²⁺ intracellulaire et couplage excitation contraction

La concentration intracellulaire de Ca²⁺ varie entre 10 et 100 nM, alors que la concentration extracellulaire est de l'ordre de 1-2 mM. Ce gradient calcique est maintenu grâce au fonctionnement de pompes et de transporteurs localisés dans la membrane cellulaire et de certaines organelles intracellulaires (Carafoli et al., 2001 ; Berridge et al., 2003) (Figure 5). La contraction des cardiomyocytes est activée par une dépolarisation membranaire induite par un potentiel d'action. S'en suit une entrée de Ca²⁺ via les canaux Ca²⁺ de type L (L-type Ca²⁺) sensibles à la dihydropyridine (DHP). Cette faible quantité de Ca²⁺ entrant déclenche l'ouverture des RyR-2, induisant un relargage massif de Ca²⁺ par le RS à l'origine de la contraction cellulaire. Ce mécanisme est connu sous le nom de « calcium-induced calcium-released » (Fabiato, 1983). La relaxation des cardiomyocytes est quant à elle provoquée par une baisse de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire. Le Ca²⁺ est recapté par le RS suite à l'activation des canaux SERCA-2a. Il est également extrudé suite à l'activation de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ (NCX), et à l'activation des canaux Ca²⁺ ATPase du sarcolemme (Bers et Weber, 2002 ; Bers, 2002).

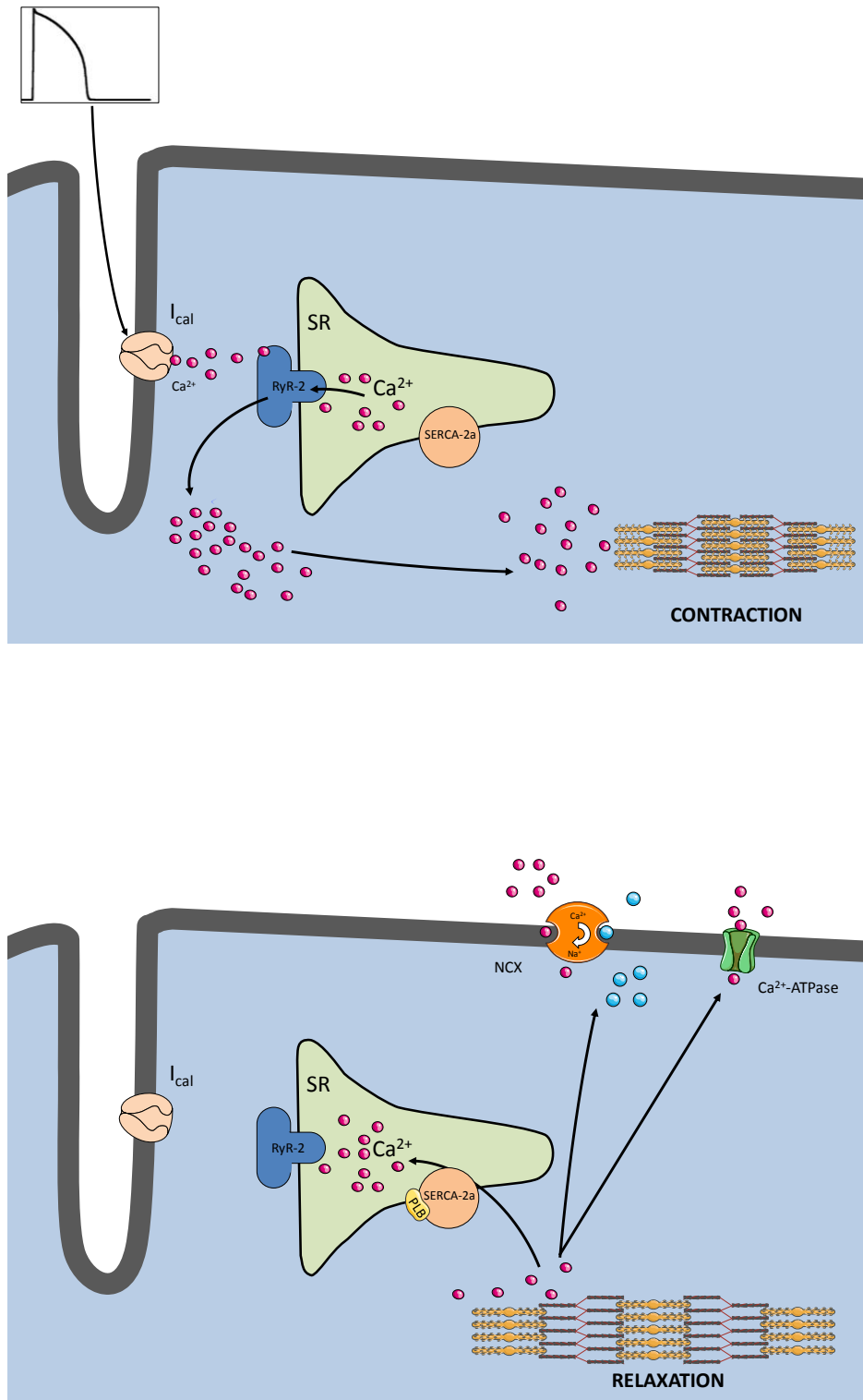


Figure 5 : Flux calciques au cours du couplage excitation-contraction et de la relaxation dans les cardiomyocytes ; I_{cal} : courant calcique entrant lent ; RyR-2 : Récepteurs à la ryanodine ; PLB : Phospholamban ; SERCA-2a : sarco/endoplasmique réticulum Ca^{2+} -ATPase ; SR : réticulum.

2.2.2. Trouble de l'homéostasie calcique au cours du syndrome d'IR

De nombreuses études récentes ont mis en évidence un lien entre la surcharge cytosolique diastolique en Ca^{2+} et les dommages irréversibles observés au cours de l'IR (Steenbergen et al., 1987 ; Korestune et Marban, 1989 ; Steenbergen et al., 1990 ; Steenbergen et al., 1993 ; Murphy et al., 1999 ; Imahashi et al., 2005). Les déséquilibres de l'homéostasie calcique observés au cours de l'ischémie et la reperfusion sont la résultante de différents processus.

a- Au cours de l'ischémie

Dès l'ischémie, la production d'énergie par phosphorylation oxydative de l'ATP et de la phosphocréatine, devient insuffisante pour assurer le métabolisme et la survie de la cellule (Opie, 1990). La glycolyse anaérobie devient alors la principale source de production d'ATP. Elle est peu rentable et entraîne une acidose liée à une surcharge intracellulaire en protons H^+ . L'acidose active des pompes ioniques comme l'échangeur Na^+/H^+ , afin de restaurer le pH intracellulaire (Murphy et al., 1991 ; Wakabayashi et al., 1997). L'entrée de Na^+ active à son tour l'échangeur NCX en mode inverse (entrée de Ca^{2+} et sortie de Na^+), aboutissant à une surcharge calcique intracellulaire (Imahashi et al., 2005) (figure 6). Cette activité inverse du NCX semble être la principale cause de la surcharge calcique intracellulaire au cours de l'ischémie (Imahashi et al., 2005). De plus, lorsque l'ischémie se prolonge, l'acidose intracellulaire inactive finalement la glycolyse anaérobie et entraîne l'arrêt des pompes dépendantes de l'ATP : Na^+/K^+ -ATPase (Dizon et al., 1998 ; Avkiran, 2001) renforçant l'activité inverse de NCX et bloquant la sortie de Ca^{2+} par les pompes Ca^{2+} ATP dépendantes (Figure 6).

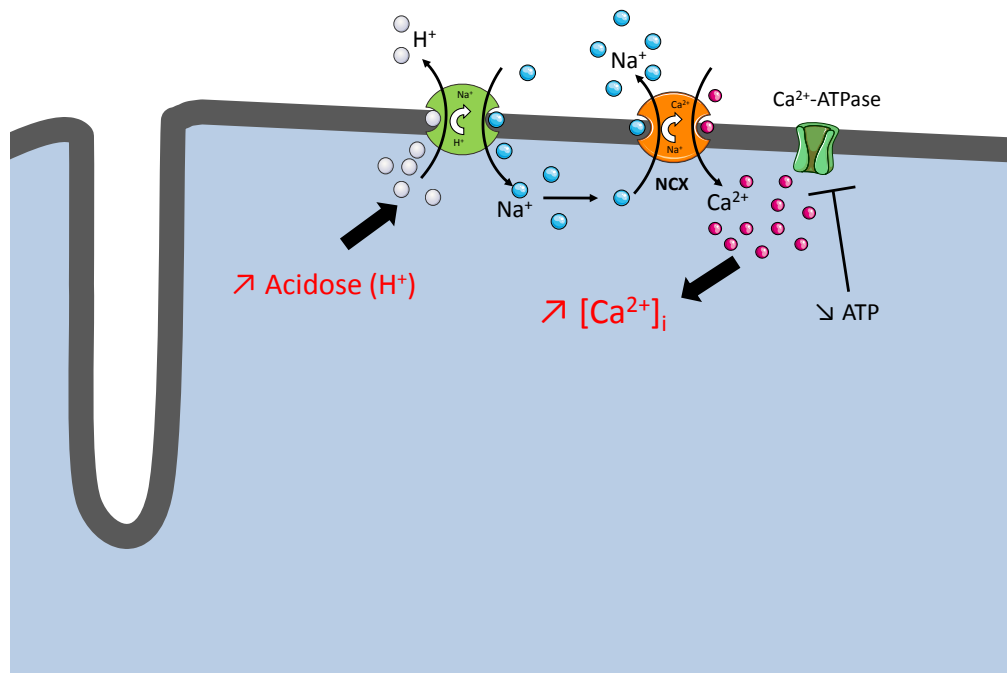


Figure 6 : Altérations de l'homéostasie calcique du cardiomyocyte au cours de l'ischémie.
NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

b- Au cours de la reperfusion

Le stress oxydant provoqué par la surproduction de RLO au cours de la reperfusion aggrave la surcharge calcique cytosolique en diastole. Ce phénomène est notamment la conséquence d'une hyperphosphorylation RLO-PKA-dépendante des canaux RyR-2 provoquant une fuite calcique au niveau du RS (Gyorke et Carnes, 2008 ; Sun et al., 2008) associée à une oxydation des pompes SERCA-2a à l'origine d'une réduction du recaptage du Ca^{2+} par le RS (Kobayashi et al., 2007 ; Kuster et al., 2010). Par ailleurs, l'augmentation du Ca^{2+} mitochondrial, liée à l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} cytosolique, est également responsable d'une diminution de la synthèse d'ATP, exacerbant ainsi la surcharge calcique via une inactivation des pompes calciques ATP dépendantes (Bolli, 1990) (Figure 7

et 8). Enfin l'augmentation de la perméabilité du sarcolemme aux ions Ca^{2+} , ainsi que les déséquilibres ioniques, notamment en Na^+ sont à l'origine, de manière directe ou indirecte, d'une aggravation de la surcharge calcique observée au cours de l'ischémie (Bolli, 1990 ; Dong et al., 2006). Par conséquent, les altérations des flux calciques rapportées au cours de la reperfusion sont à l'origine d'une diminution de la charge en Ca^{2+} du RS et d'une augmentation de la surcharge calcique cytosolique (Figure 7 et 8).

Cette accumulation de Ca^{2+} intracellulaire a été rapportée comme étant un facteur majeur dans l'explication de la mort cellulaire, des altérations contractiles mais également des arythmies observées au cours de la reperfusion, (Murphy et al., 1987 ; Bolli, 1990 ; Bolli et Marban, 1999 ; Ruiz-meana et Garci-Morado, 2009).

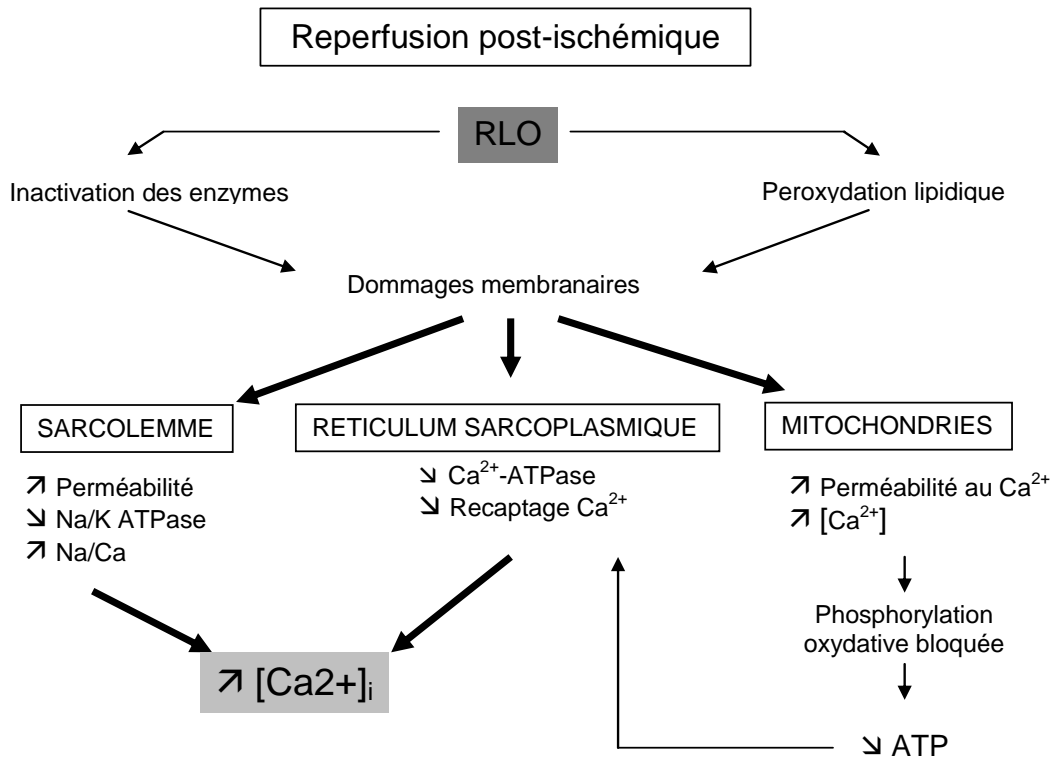


Figure 7 : Mécanismes délétères d'une production accrue de RLO sur l'homéostasie calcique, adapté de Bolli, (1990).

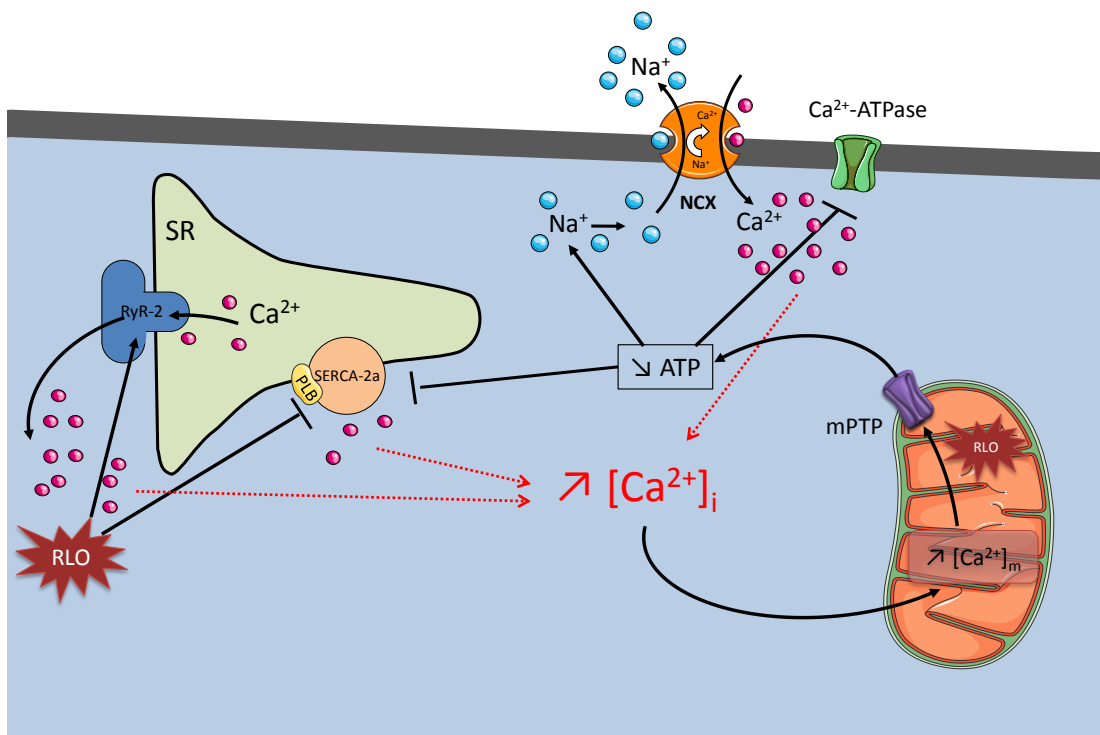


Figure 8 : Mécanismes responsables de l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} au cours de la reperfusion post-ischémique. RLO : radicaux libres oxygénés ; RyR-2 : Récepteurs à la ryanodine ; PLB : Phospholamban ; SERCA-2a : sarco/endoplasmique réticulum Ca^{2+} -ATPase ; SR : réticulum sarcoplasmique ; NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale.

2.3. Lésions d'IR : Rôle du stress oxydant et de la surcharge calcique

Bien que le stress oxydant puisse être directement à l'origine de lésions cellulaires majeures, il semblerait que les principaux effets délétères de la production accrue de RLO au cours de la reperfusion post-ischémique soient associés aux troubles de l'homéostasie calcique et à la surcharge calcique qui en résulte (Steenbergen et al., 1987 ; Korestune et Marban, 1989 ; Steenbergen et al., 1990 ; Steenbergen et al., 1993 ; Murphy et al., 1999 ; Temsah et al., 1999 ; Sharikabad et al., 2001 ; Imahashi et al., 2005). Dans ce chapitre, nous évoquerons les effets de la production accrue de RLO associée à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire sur les différents types de lésions observés au cours du syndrome d'IR.

2.3.1. Mort cellulaire au cours de l'IR

Le stress oxydant et la surcharge calcique sont des facteurs clés de la mort cellulaire au cours de la reperfusion post-ischémique. Ils sont à l'origine de l'apparition de nécrose cellulaire mais conduisent également à une activation de différents facteurs pro-apoptotiques.

La surcharge calcique associée à la production de RLO a notamment été rapportée dans la bibliographie scientifique comme étant à l'origine d'une perméabilité transitoire de la membrane mitochondriale au cours de la reperfusion. Ce phénomène se traduirait par un accroissement soudain de la perméabilité de la membrane mitochondriale pour l'eau et les molécules de taille inférieure à 1,5 kDa (Haworth et Hunter, 1979). Cette perméabilité serait la conséquence de l'activation d'un mégapore de nature protéique, non sélectif, inhibé par la cyclosporine A et activé par le Ca^{2+} (Crompton et Costi, 1988 ; Crompton, 1999) et désigné sous le sigle mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore) (Weiss et al., 2003). Ce

phénomène serait à l'origine de la dissipation du gradient électrochimique des protons $\Delta\Psi_m$ (Bernardi, 1992), d'une perte de l'homéostasie ionique (Basso et al., 2005) et d'un déséquilibre de la balance redox en faveur de l'oxydation (Bindoli et al., 1997) conduisant à la disruption de la mitochondrie. La mitochondrie ainsi altérée relargue différents facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c ou la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Lemasters et al., 1998 ; Borutaite et al., 2003 ; Eefting et al., 2004) (Figure 9), mais va également accentuer la déplétion en ATP aggravant ainsi l'altération de l'homéostasie ionique, à l'origine d'un gonflement cellulaire et d'altérations membranaires pouvant aboutir à la nécrose cellulaire (Lemasters et al., 1998 ; Crompton, 1999 ; Bernardi, 1999 ; Murphy et Steenbergen, 2008) (Figure 10).

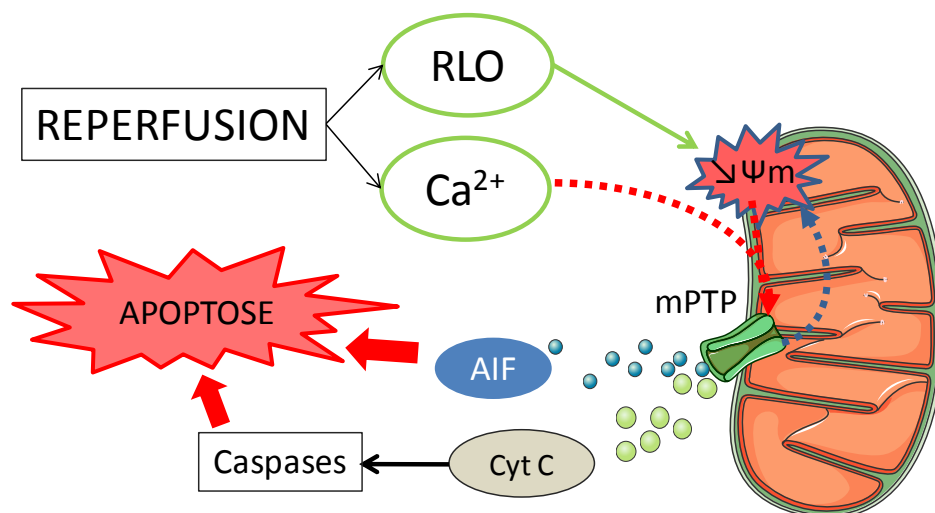


Figure 9 : Mécanismes de mort cellulaire apoptotique au cours de la reperfusion post-ischémique.
 RLO : radicaux libres oxygénés ; mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale ;
 AIF : Apoptosis Inducing Factor ; Cyt : cytochrome C.

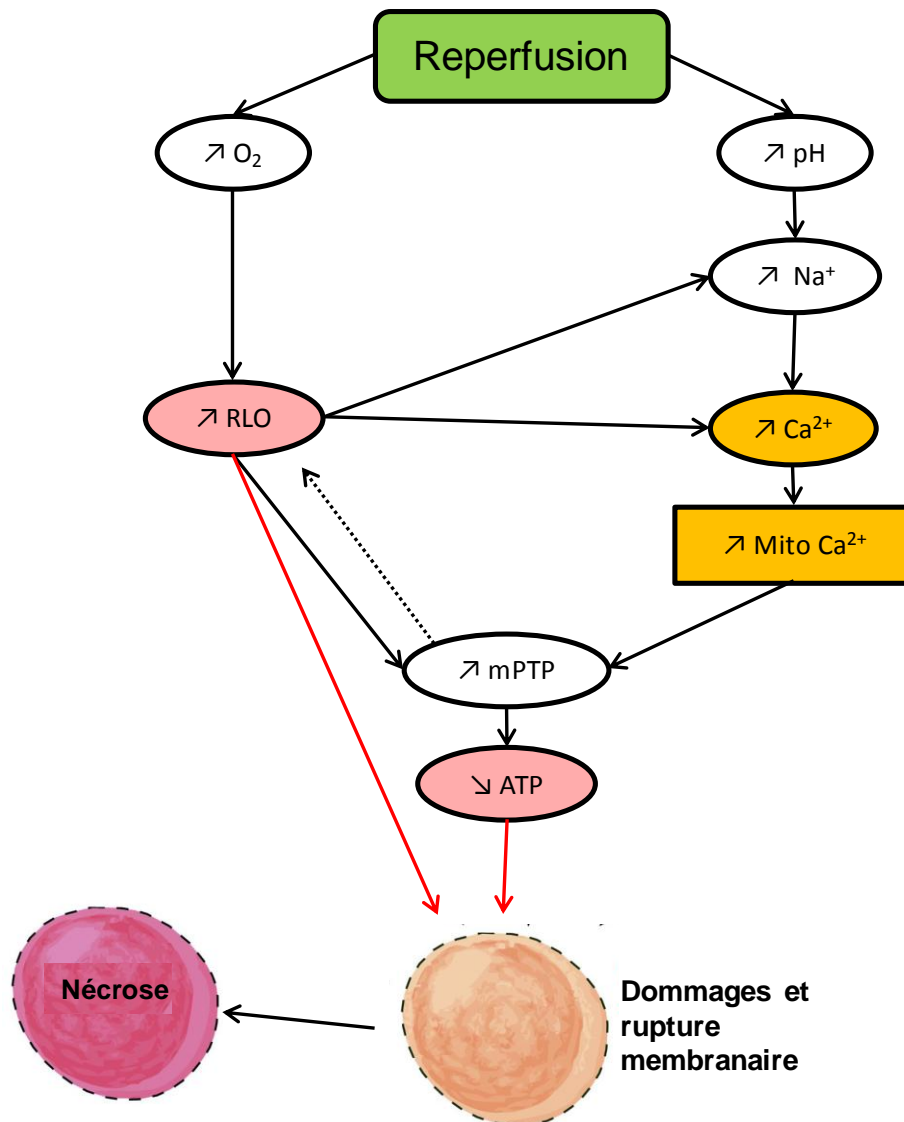


Figure 10 : Mécanismes de mort cellulaire nécrotique au cours de la reperfusion post-ischémique, adapté de Murphy et Steenbergen, (2008). RLO : radicaux libres oxygénés ; mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale.

Par ailleurs d'autres voies vont être impliquées dans la mort cellulaire observée au cours de la reperfusion :

- L'hypercontracture, résultant de la surcharge Ca^{2+} et de la déplétion en ATP, associée à la fragilisation de la membrane cellulaire au cours de l'IR est rapportée comme étant à

l'origine d'une disruption de la membrane et ainsi de nécrose cellulaire (Ganote, 1983 ; Piper et al., 2003).

- L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire peut par ailleurs être à l'origine d'une activation de différentes protéases Ca^{2+} -dépendante dont les calpaines. Les calpaines sont notamment impliquées dans la rupture membranaire (Vanderklish et Bahr, 2000 ; Liu et al., 2004), l'activation du facteur pro-apoptotique bid (Chen et al., 2001) et l'altération du facteur de régulation de l'autophagie Atg5 (Murphy et Steenbergen, 2008).

2.3.2. Sidération myocardique

La surcharge calcique intracellulaire en diastole est rapportée comme un facteur clé des altérations fonctionnelles contractiles observées au cours de la reperfusion. (Opie, 1998). En effet, la diminution de la charge en Ca^{2+} du RS préalablement décrite est à l'origine d'une diminution de l'amplitude du transitoire calcique, facteur clé régulant la contraction des myocytes cardiaques (Valverde et al., 2010).

Par ailleurs parmi les différentes cibles cellulaires des RLO, il a notamment été mis en évidence que la production d' O_2^- au cours de l'IR était à l'origine d'une dégradation des protéines contractiles (myofilaments) et donc d'une altération de la contractilité cardiomyocytaires et d'une réduction de la sensibilité de la machinerie contractile au Ca^{2+} (Bolli et Marban, 1999 ; Suzuki et al., 1991 ; Macfarlane et Miller, 1992). Ce phénomène peut être renforcé par l'activation de protéines kinases ou de protéases en réponse à l'élévation de la concentration calcique intracellulaire (Kusuoka et al., 1987 ; Kusuoka et al., 1990 ; Gao et al., 1996).

2.3.3. Arythmies de reperfusion post-ischémique

Au cours de la reperfusion post-ischémique, la peroxydation des lipides membranaires est à l'origine de modifications électrophysiologiques pouvant en partie expliquer les arythmies de reperfusion (Bernier et al., 1986 ; Bagchi et al., 1989 ; Ter keurs et Boyden, 2007 ; Antoons et Sipido 2008). Parmi ces modifications électrophysiologiques, on peut notamment noter la surcharge intracellulaire en ions Ca^{2+} et Na^+ rapportée précédemment. Dès lors, au cours du syndrome d'IR, l'instabilité membranaire associée aux déséquilibres ioniques peut avoir pour conséquence une modification du seuil d'excitabilité membranaire et donc l'apparition d'épisodes arythmiques.

Par ailleurs, l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire est à l'origine d'un courant transitoire entrant Ca^{2+} -dépendant, lui-même à l'origine de post-dépolarisations retardées qui peuvent expliquer les extrasystoles ou tachycardies ventriculaires (Opie, 1989 ; Marban et al., 1994 ; Antoons et Sipido, 2008).

2.3.4. Phénomène de no-reflow.

Les cellules endothéliales sont les premières à bénéficier de la réoxygénation. Le stress oxydant résultant de cette reperfusion a cependant pour conséquence non négligeable, une atteinte marquée de la fonction endothéliale coronaire se caractérisant notamment par une vasoconstriction du lit distal coronaire (Kaeffer et al., 1997 ; Vrints, 2009) (Figure 11).

La production importante d' O_2^- au cours de ce syndrome, a notamment pour conséquence la production de ONOO^- suite à la réaction entre l' O_2^- et le NO endothélial. Les répercussions majeures de cette réaction sont i) une diminution de la biodisponibilité du NO vasculaire (Laude et al., 2001) et ii) l'exacerbation du stress oxydant/nitrosylant cellulaire

(Pacher et al., 2007). Le NO est responsable de la régulation de la vasodilatation artérielle mais est également un inhibiteur de la réaction inflammatoire associée au syndrome d'IR. La baisse de NO biodisponible joue un rôle non négligeable dans les lésions vasculaires associées au syndrome d'IR (Figure 11). Ainsi, au cours de ce syndrome, il est rapporté une modification de l'ultrastructure artérielle conduisant à une diminution de la lumière artérielle et des modifications fonctionnelles entraînant une perte de l'activité vasomotrice (Kaeffer et al., 1997).

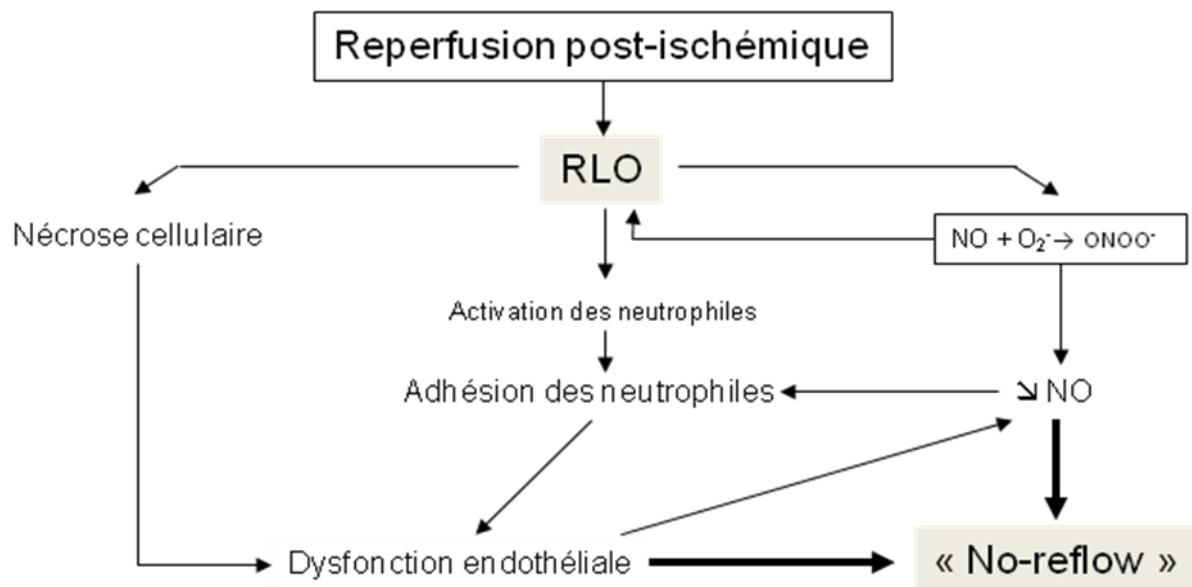


Figure 11 : Mécanismes responsables du phénomène de "no-reflow" au cours de la reperfusion post-ischémique

II. Le monoxyde de carbone

Le CO est un des oxydes du carbone (Figure 12). La formule chimique s'écrit CO, la molécule est composée d'un atome de carbone et d'un atome d'oxygène et son poids moléculaire est de 28 g.mol^{-1} . Ce corps composé est présent à l'état gazeux dans les conditions normales de pression et de température (Ryter et Otterbein, 2004) (Figure 12).



Figure 12 : Formule de Lewis du CO.

Tableau 1 : Propriétés physiques du CO

Monoxyde de carbone

Poids moléculaire	28.01 g.mol^{-1}
Température d'ébullition	-191.5°C
Température de fusion	-205°C
Température d'ignition	606°C
Solubilité (H ₂ O)	$3.3 \text{ ml } 100\text{ml}^{-1}$ à 0°C $2.3 \text{ ml } 100 \text{ ml}^{-1}$ à 20°C
Densité (vapeur)	$0.968 \text{ air} = 1.0$
Facteur de conversion	$1 \text{ ppm} = 1.25 \text{ mg.m}^{-3}$ à 25°C

1. Le CO exogène

Le CO exogène est issu principalement de la combustion incomplète des combustibles fossiles, notamment du gaz naturel, des dérivés pétroliers ou du bois. De façon générale, il est produit par la combustion incomplète de tout composé carboné. Le CO est incolore et inodore et son mélange avec l'air est facile puisque leur densité est proche. Plusieurs unités de quantification sont habituellement utilisées dans la littérature : la particule par million (ppm) ou le milligramme par mètre cube (mg/m^3), 1 ppm correspondant à $1,15 \text{ mg}/\text{m}^3$ (à 760 mmHg et 25°C). L'unité la plus couramment utilisée reste le ppm. Les principales connaissances actuelles concernant les effets cardiovasculaires du CO, ont été élaborées dans le cadre de travaux en toxicologie pour lesquels les taux de CO utilisés sont très supérieurs (500-5000 ppm) à ceux habituellement rencontrés en environnement urbain (15-100 ppm).

1.1. Effets cardiovasculaires d'une exposition à de fortes concentrations de CO

1.1.1. Données épidémiologiques

Les épisodes d'exposition aigue à de fortes concentrations de CO sont la principale cause de décès par empoisonnement dans de nombreux pays industrialisés et sont responsables de plus de 50 % de la mortalité par empoisonnement dans ces mêmes pays (Meredith et Vale, 1988 ; Cobb et Etzel, 1991 ; Yang et al., 1998 ; Varon et al., 1999). La cardiotoxicité du CO, dépendante de la concentration en CO et de la durée d'exposition (figure 13) (Piantadosi, 2008), est rapportée chez les patients fragilisés par une pathologie cardiovasculaire (Balzan et al., 1994 ; Diltor et al., 1995) mais aussi chez les sujets sains

(Gandini et al., 2001). Les symptômes cardiovasculaires les plus fréquents sont la tachycardie, les arythmies, l'hypotension, le choc cardiogénique, l'arrêt cardiocirculatoire ou encore l'œdème pulmonaire. Les arythmies cardiaques représentent cependant la cause principale de la mortalité liée aux intoxications au CO (Gandini et al., 2001).

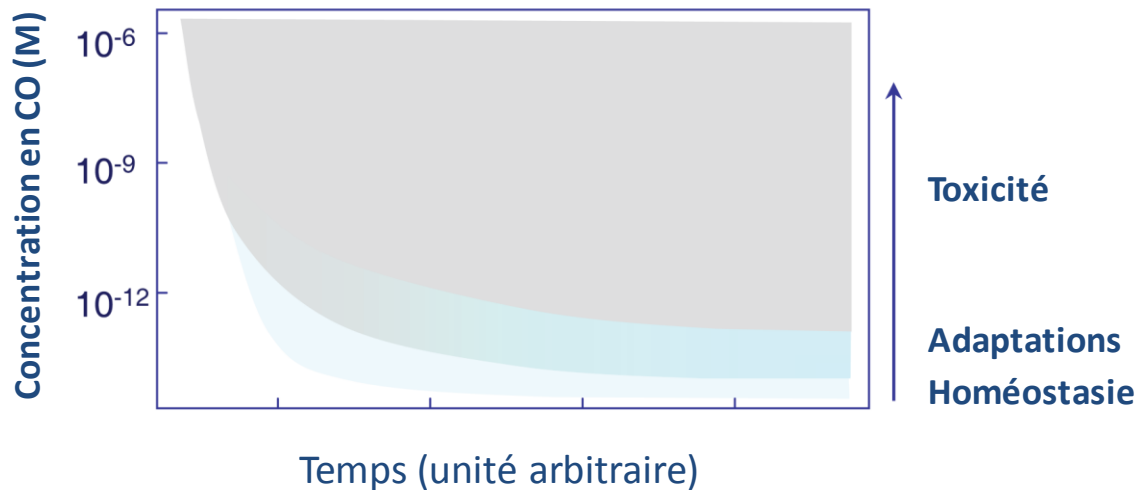


Figure 13 : Relation temps-concentration des effets physiologiques, adaptatifs et toxiques du CO dans les cellules et tissus, adapté de Piantadosi, (2008).

1.1.2. Données expérimentales

Pour des expositions à de fortes concentrations non létales, de l'ordre de 200 à 1000 ppm, les effets principaux du CO sont dus à l'hypoxémie sanguine et tissulaire (notamment cardiaque et vasculaire) qu'il génère (Piantadosi, 2004 ; Zuckerbraun et al., 2007). Les effets du CO sont principalement expliqués par sa fixation à l'hémoglobine, avec une affinité 200 à 230 fois supérieure à celle de l'oxygène. La carboxyhémoglobine (HbCO) alors formée est incapable de s'oxyder à l'air comme le fait l'hémoglobine. Cette combinaison avec le CO inactive ainsi une certaine proportion de l'hémoglobine du sang, qui de ce fait n'est plus apte à jouer son rôle de vecteur d'O₂ au travers de l'organisme (Kimmel et al., 1999) (figure 14). La libération de l'O₂ au niveau cellulaire est par conséquent altérée, provoquant une situation

transitoire d'hypoxémie tissulaire. La formation d'HbCO dans le sang s'accompagne également d'une formation de CO dissout dans le plasma dont les répercussions physiologiques sont conséquentes. Ce dernier se fixe en effet à la myoglobine cardiaque (mais avec une affinité moindre), renforçant la situation d'hypoxémie tissulaire, et pouvant ainsi conduire, dans certains cas, à des situations d'anoxie-reoxygénation (Piantadosi, 2004). Cette hypoxémie tissulaire pourrait être l'origine de la bradycardie et des troubles du rythme observés lors d'expositions prolongées à ce gaz. Le CO peut également se fixer au niveau des cytochromes mitochondriaux, altérant la chaîne de transport des électrons et inhibant la synthèse aérobie de l'ATP (Brown et Piantadosi, 1990), contribuant ainsi à l'altération du métabolisme des cardiomyocytes.

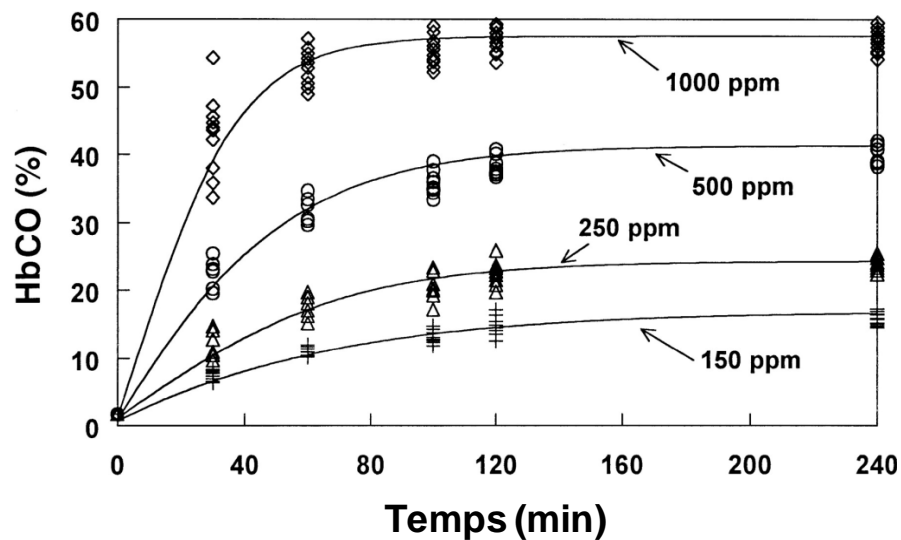


Figure 14 : Cinétique de la formation de HbCO chez le rat, adapté de Kimmel et al., (1999). HbCO : Carboxyhémoglobine.

1.2. Effets cardiovasculaires d'une exposition à de faibles concentrations de CO

1.2.1. Données épidémiologiques

Les pathologies cardiovasculaires constituent la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés et leur évolution résulte d'une interaction complexe entre facteurs génétiques et environnementaux. La pollution atmosphérique joue un rôle majeur dans le développement de ces pathologies (Burnett et al., 1997 ; Von Klot et al., 2005 ; Berger et al., 2006 ; Peel et al., 2007). Divers agents polluants (gaz et particules) semblent être impliqués, certains (ozone, particules fines) ont fait l'objet d'importantes recherches au cours de ces dernières années, alors que d'autres polluants tels que le CO ont été moins étudiés. Le CO est présent en très faible concentration dans l'environnement cependant, il peut être retrouvé à des concentrations plus importantes dans certaines zones particulièrement polluées. En effet divers travaux ont pu mettre en évidence des taux moyens de CO urbains de l'ordre de 20 à 40 ppm dans des environnements urbains particulièrement pollués avec des pics pouvant aller jusqu'à 170 ppm (Wright et al., 1975 ; Stern et al., 1988 ; Bevan et al., 1991). Par ailleurs, le CO constitue un polluant majeur rapporté dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques comme étant très fortement corrélé avec l'accroissement du taux de mortalité cardiovasculaire (Brook et al., 2004 ; Henry et al., 2006 ; Stieb et al., 2009 ; Bell et al., 2009). Ainsi, récemment, une étude réalisée dans le cadre du projet APHEA (Air pollution and Health : A European approach), centrée sur 19 grandes villes européennes, rapporte une relation linéaire significative entre pollution citadine au CO et mortalité cardiovasculaire (Samoli et al., 2007).

1.2.2. Données expérimentales

a- Remodelage morphologique et fonctionnel cardiaque

Une hypertrophie cardiaque consécutive à une exposition prolongée au CO a été rapportée par divers auteurs (Loennechen et al., 1999 ; Sorhaug et al., 2006). Plus récemment, André et al., (2010) ont caractérisé le remodelage cardiaque chez des rats exposés 4 semaines à 30/100 ppm de CO et ont pu décrire une augmentation de la masse du ventricule gauche (+7 %) associée à une augmentation du taux de fibrose (+89 %). Ce remodelage myocardique, a également été mis en évidence au niveau cellulaire par Bye et al., (2008) sur des myocytes de rats exposés à 200 ppm de CO 5 jours/semaines pendant 18 mois. Ces auteurs ont en effet rapporté une augmentation de 18 % de la longueur et de 88 % de la largeur des myocytes du ventricule gauche (VG)

Le remodelage morphologique induit par une exposition chronique à de faibles concentrations de CO, est également associé à de légers troubles fonctionnels en condition standard. Ainsi, Andre et al., (2010), ont rapporté une altération de la contractilité myocardique caractérisée par une diminution de la fraction de raccourcissement (-14 %) et une diminution de la déformation diastolo-systolique de la paroi postérieure du VG (-21 %) chez des rats exposés au CO. Ce résultat observé in-vivo par échocardiographie, est expliqué à l'étage cellulaire par une altération marquée du couplage excitation-contraction. Ces mêmes auteurs ont en effet observé une diminution de la fraction de raccourcissement des sarcomères associée à une altération du transitoire calcique consécutive à l'exposition au CO. Ils ont également rapporté en condition standard une augmentation de l'occurrence des événements arythmiques chez les rats exposés chroniquement au CO, ce phénomène étant par ailleurs exacerbé au cours d'un stress β -Adrénérique. Ce résultat est en accord avec les études épidémiologiques qui ont rapporté une augmentation des arythmies ventriculaires chez des populations exposées de façon récurrente aux polluants urbains (Miller et al., 2007).

D'après Thom et al., (1997 ; 2000), lors d'exposition à de faibles concentrations de CO, telles que retrouvées en environnement citadin, l'hypoxémie sanguine et tissulaire engendrées notamment par la formation d'HbCO (6-8 %) ne semble pas suffisante pour expliquer l'ampleur des modifications structurelles et fonctionnelles associées à ce type d'exposition. Ainsi, le remodelage cardiaque et les altérations fonctionnelles qui l'accompagnent semblent pouvoir être expliqués principalement par les effets du CO sur i) le statut redox cellulaire ; ii) l'homéostasie calcique cellulaire et iii) la perfusion myocardique.

b- Statut redox cellulaire

Comme déjà présenté, le statut redox de la cellule se définit comme le point d'équilibre entre la présence de facteurs pro-oxydants et de facteurs antioxydants. Dans le cas d'une exposition à de faibles concentrations de CO, il semblerait que l'on assiste à la fois à une augmentation de la synthèse de substances pro-oxydantes (Zuckerbraun et al., 2007) et à une diminution des défenses antioxydantes (André et al., 2010). Cette modification du statut redox cellulaire est rapportée par ces auteurs comme étant le principal facteur responsable du remodelage phénotypique cardiaque observé chez des rats exposés au CO (André et al., 2010).

- Facteurs pro-oxydants : le CO agit directement sur la production de substances réactives dérivées de l'oxygène. En effet, selon Zuckerbraun et al., (2007), il inhiberait la cytochrome c oxydase entraînant une production accrue de RLO par les complexes I et III de la chaîne mitochondriale de transfert des électrons. Le CO agirait comme un inhibiteur compétitif de l'O₂ au niveau de l'hème ferrique a₃ des cytochromes c mitochondriaux bloquant ainsi la chaîne de réaction (D'amico et al., 2006 ; Zuckerbraun et al., 2007 ; Piantadosi, 2008). De plus, de faibles concentrations de CO ont été rapportées comme

pouvant induire une augmentation de la biodisponibilité du NO. En effet, le CO possède une forte affinité pour les sites de fixation du NO (hémoprotéines) et en occupant ces sites de fixation il contribue à augmenter les concentrations de NO biodisponibles (Piantadosi, 2008). En condition pro-oxydante (liée notamment à l'exposition au CO), cette augmentation de la biodisponibilité du NO dans la cellule entraîne la formation de ONOO⁻. Ainsi, Thom et al. (1997 ; 1999 ; 2000) ont mis en évidence une augmentation du stress oxydant/nitrosylant liée à la production excessive de NO sur des cellules isolées endothéliales exposées 1 heure à des concentrations de CO allant de 10 à 100 ppm.

- Facteurs antioxydants : très peu d'études se sont intéressées aux effets d'une exposition au CO sur le système de défenses antioxydantes, et les résultats hétérogènes de ces études, sont probablement liés aux différences expérimentales. En effet, Thom et al., (2000) ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la SOD sur des cellules endothéliales exposées 45 min à des concentrations de CO allant de 10 à 100 ppm, sans aucun effet sur les autres enzymes antioxydantes. Au contraire, André et al., (2010) ont rapporté une diminution significative de l'activité de l'ensemble des enzymes antioxydantes myocardiques (SOD, GPx, CAT) chez des rats exposés 4 semaines à de faibles doses de CO (30/100 ppm).

c- Homéostasie calcique cellulaire

Suite à une exposition prolongée au CO, Bye et al., (2008) ainsi que André et al., (2010) ont mis en évidence une augmentation de la concentration cytosolique diastolique en Ca²⁺ et une diminution de l'amplitude du transitoire calcique au cours de la contraction cellulaire. Cette altération du transitoire calcique était associée dans ces deux études à une diminution de la

charge calcique du RS, principalement expliquée par une altération du repompage du Ca^{2+} par les pompes SERCA-2a. Ce phénomène est expliquée par Bye et al., (2008) par une diminution de l'expression de différents isoformes de phospholamban, ayant pour conséquence une diminution de l'activité des canaux SERCA-2a. André et al., (2010) ont quant à eux mis en évidence une diminution de l'expression des SERCA-2a dans les cardiomyocytes de rats exposés au CO. L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire en diastole serait également liée à une fuite calcique au niveau des canaux RyR-2 du RS (André et al., 2010). Celle-ci serait la conséquence d'une hyperphosphorylation du site PKA dépendant Ser²⁸⁰⁹ de ces canaux. Outre les altérations des protéines de l'homéostasie calcique, André et al. (2010) ont également décrit une moindre sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} chez les rats exposés au CO probablement liée à une augmentation de l'hyperphosphorylation PKA-dépendante de la troponine C.

d- Perfusion myocardique

Plusieurs études se sont intéressées aux effets potentiellement délétères d'une exposition prolongée au CO sur la perfusion myocardique. Le CO est reconnu comme un agoniste du NO pouvant se fixer au niveau de la guanylate cyclase soluble (GCs) et ainsi induire une relaxation de la cellule musculaire lisse et à fortiori une vasodilatation (Furchgott et Jothianandan, 1991 ; piantadosi, 2008). Cependant la fixation du CO sur la GCs entraîne une formation de GMPc 100 fois inférieure à celle induite par la fixation du NO. Ce premier agirait donc comme un inhibiteur compétitif du NO et pourrait être à l'origine d'altérations de la fonction vasculaire (Kharitonov et al., 1995) (Figure 15).

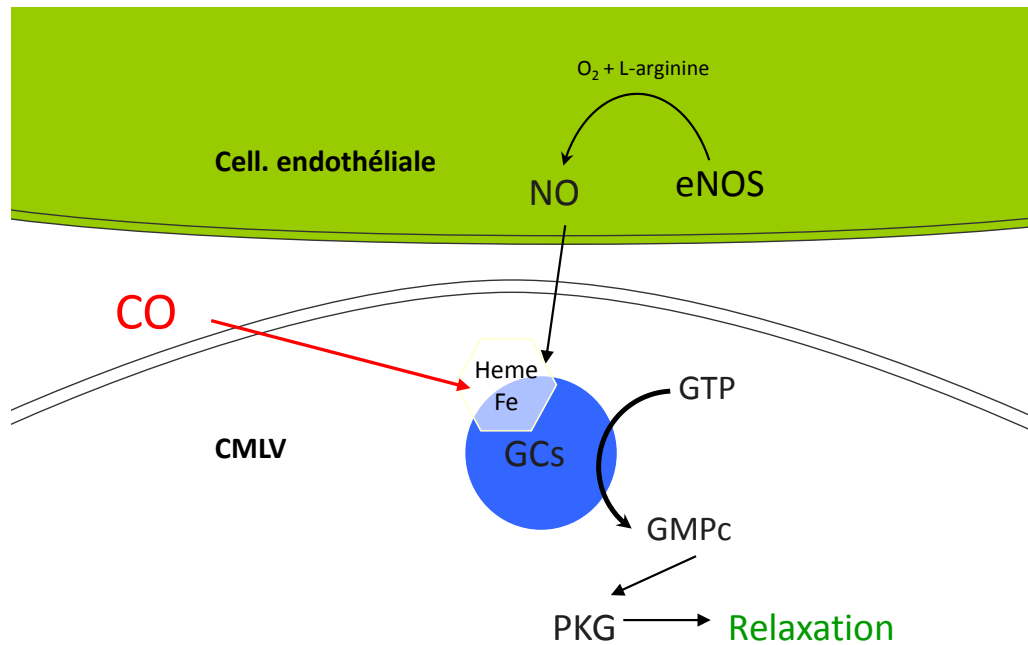


Figure 15 : Effets du CO sur la relaxation NO-dépendante des cellules musculaires lisses. eNOS : monoxyde d'azote synthétase endothéliale ; CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire ; GCs : guanylate cyclase soluble ; GTP : guanosine triphosphate ; GMPC : guanylate monophosphate cyclique ; PKG : protéine kinase G.

Ainsi, suite à une exposition prolongée au CO exogène, plusieurs études ont rapporté des altérations de la perfusion du muscle cardiaque (Favory et al., 2006 ; Gautier et al., 2007). Les effets délétères de faibles concentrations de CO sur la perfusion myocardique semblent fortement liés au stress oxydant (Thom et al., 1997). En effet, ce dernier, caractérisé par la formation de RLO et d'EROA au niveau vasculaire (Thom et al., 2000), serait à l'origine de lésions des cellules endothéliales, et pourrait également jouer un rôle sur le découplage fonctionnel de la eNOS et ainsi altérer la vasodilatation endothélium-dépendante (Kuzkaya et al., 2003). Indépendamment, l'exposition chronique au CO a également été rapportée comme étant à l'origine de la synthèse de facteurs vasoconstrictifs tels que l'endothéline (Loennechen et al., 1999), exacerbant ainsi l'altération de la perfusion myocardique.

1.3. Le CO endogène

Le CO n'est pas uniquement un composé toxique exogène, puisqu'il est produit naturellement par l'organisme chez tous les mammifères et possède certaines propriétés physiologiques essentielles. Il existe au moins deux sources endogènes de production de CO. La source biologique prédominante est la dégradation héminique (70 %) (Tenhunen et al., 1969) (Figure 16), alors que l'autre source de production correspond à l'oxydation des molécules organiques. Le CO endogène a longtemps été considéré exclusivement comme un déchet de la dégradation héminique, toutefois il est désormais considéré comme un précurseur de fonctions physiologiques essentielles (Marks et al., 1991). Le rôle du CO endogène est agoniste à celui du NO. Toutefois à des concentrations élevées, il peut entrer en concurrence avec le NO et ainsi limiter les propriétés physiologiques bénéfiques de ce dernier.

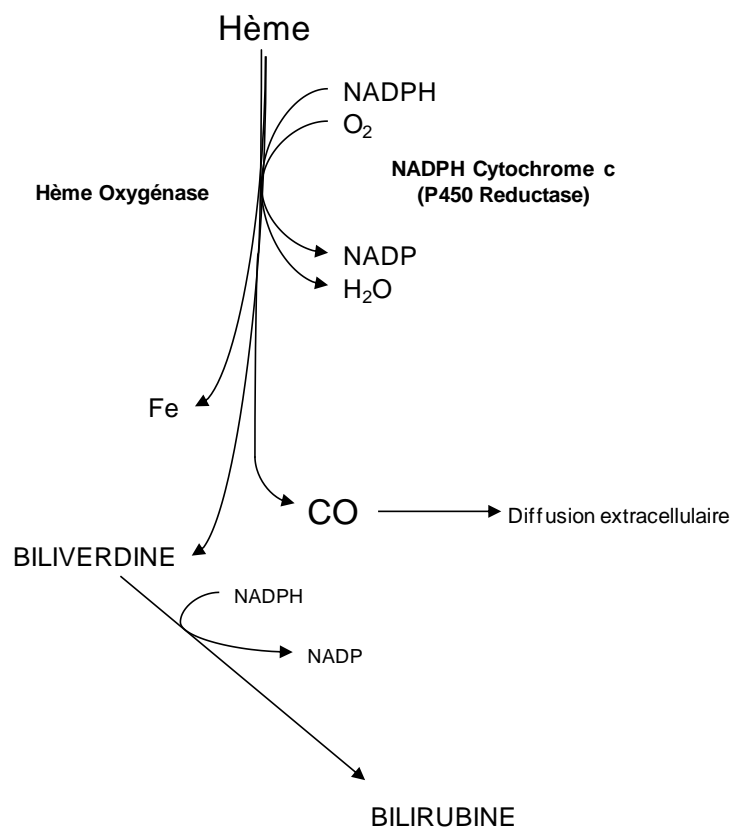


Figure 16 : Biosynthèse du CO par dégradation héminique

2. CO et IR myocardique

2.1. Exposition au CO exogène

La gravité des incidents ischémiques myocardiques est dépendante de nombreux facteurs aggravants tels que l'exposition à divers agents polluants. Diverses études épidémiologiques ont en effet mis en évidence une corrélation entre l'exposition au CO à des concentrations telles que rencontrées en environnement urbain pollué et le taux de mortalité et de morbidité lié aux pathologies cardiovasculaires (Burnett et al., 1997 ; Bell et al., 2009). En dépit de ces données épidémiologiques, à ce jour peu de travaux expérimentaux se sont intéressés à la compréhension des mécanismes sous-jacents à cette mortalité cardiovasculaire lors d'exposition de type citadine au CO. Lors d'expositions aiguës, Bak et al., (2005) ont rapporté qu'un protocole d'IR sur cœur isolé perfusé réalisé en présence de 10 ou 100 ppm de CO permet de protéger le myocarde et ainsi de diminuer la sévérité des lésions de reperfusion (mort cellulaire et arythmies). Nakao et al., (2003) ont rapporté le même type de résultats lors d'une IR cardiaque réalisée suite à une exposition de 1 heure à 20 ppm de CO. Ces auteurs mettent en avant une possible activation de la voie GCs/GMPc comme étant à l'origine de cette cardioprotection par le CO.

En ce qui concerne les expositions chroniques prolongées au CO, à notre connaissance, seules deux études sont disponibles et les concentrations utilisées dans ces études sont beaucoup plus fortes (600 ppm durant 2/3 semaines) que celles observées dans le cadre de la pollution de type urbaine (Barbé et al., en 2001 ; Rochetaing et al., 2001). Ces études font l'état de résultats contradictoires, l'exposition au CO ayant des effets protecteurs ou au contraire délétères selon la population expérimentale étudiée (population hypoxique pour Barbé et al., (2001) ou population saine pour Rochetaing et al., (2001)). Ainsi aucune étude ne s'est pour l'instant intéressée à

évaluer l'impact d'une exposition prolongée à des concentrations de CO semblables à celles retrouvées dans le cadre de la pollution urbaine sur la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR.

2.2. CO endogène

Plusieurs études se sont intéressées aux effets du CO endogène sur le syndrome d'IR et ont mis en évidence un effet cardioprotecteur de ce dernier (Bak et al., 2002 ; Bak et al., 2003). Ces mêmes études rapportent par ailleurs qu'une inhibition de la formation de CO endogène induit une aggravation des lésions de reperfusion alors qu'une augmentation de sa production a des effets cardioprotecteurs. Les effets bénéfiques du CO endogène seraient liés à la diminution du stress oxydatif (Nakao et al., 2005), la normalisation de l'homéostasie calcique (Szabo et al., 2004) ainsi qu'aux propriétés anti-inflammatoire et anti-apoptotique du CO (Li Volti et al., 2006). D'autres études se sont intéressées aux effets du CO endogène sur le syndrome d'IR via l'utilisation de molécules relargant du CO (CO releasing molecules, CORM). Ces dernières ont également mis en évidence qu'un traitement par CORM permet de réduire sensiblement les lésions de reperfusion (Stein et al., 2005), notamment via une normalisation de l'homéostasie ionique cellulaire (Varadi et al., 2007).

III. Exercice d'endurance et cardioprotection

1. Données épidémiologiques

Il est aujourd'hui largement reconnu que l'activité physique régulière est un facteur essentiel dans l'amélioration de la qualité de vie. En effet, dès la fin des années 1980, un nombre conséquent de travaux semble conforter la relation entre activité physique régulière et réduction de la mortalité prématurée (toutes causes confondues) (Paffenbarger et al., 1978 ; Paffenbarger et al., 1986 ; Paffenbarger et al., 1986). Le système cardiovasculaire apparaît comme une cible privilégiée de l'activité physique régulière. Ainsi, un grand nombre d'études rapportent une relation inverse entre la pratique régulière d'une activité physique et le taux de mortalité prématurée pour raisons cardiovasculaires (Ignarro et al., 2007).

2. Données expérimentales

Parmi les nombreuses méthodes permettant d'améliorer la protection du muscle cardiaque, dont un grand nombre font appel à des traitements pharmacologiques lourds, l'exercice physique est régulièrement rapporté comme étant un moyen efficace de limiter les atteintes cardiovasculaires et en particulier celles liées au syndrome d'IR (Powers et al., 1998 ; Demirel et al., 2001 ; Hamilton et al., 2003 ; French et al., 2008 ; Powers et al., 2008). Bien que les mécanismes responsables de la cardioprotection induite par l'exercice restent partiellement inexplicables, un remodelage phénotypique myocardique caractérisé par une amélioration du statut antioxydant et une modification de l'expression/activité des protéines régulant les mouvements calciques intracellulaires sont rapportés. Cependant d'autres voies

de cardioprotection telles que l'amélioration de la perfusion myocardique, l'induction de protéines de choc thermique (Heat shock proteins, HSPs) et l'augmentation de l'activité des canaux potassiques sont aujourd'hui évoquées, pour expliquer les effets bénéfiques de l'exercice (Figure 17) (Powers et al., 2008).

Bien que l'exercice physique puisse entraîner de nombreuses modifications structurales et fonctionnelles au niveau des cardiomyocytes, nous aborderons dans cette partie uniquement les facteurs potentiellement impliqués dans les mécanismes de cardioprotection.

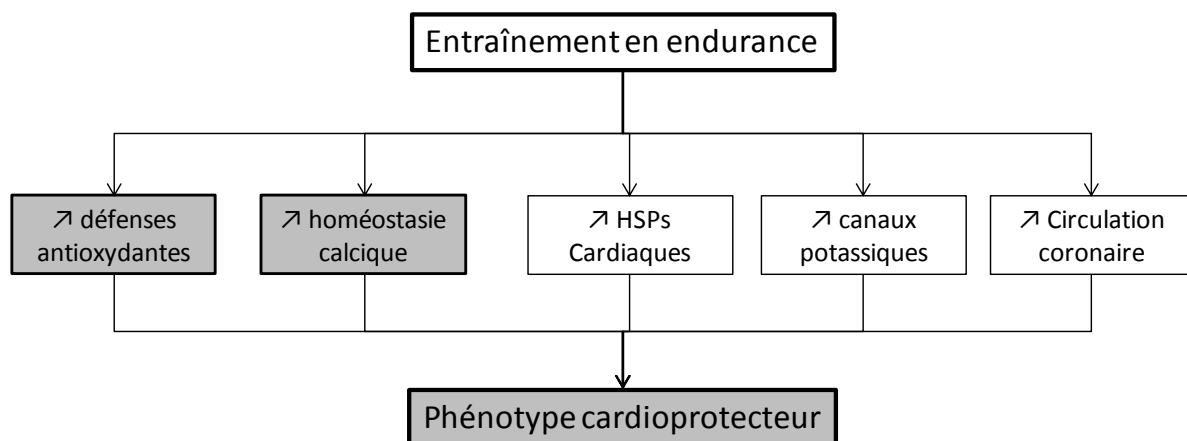


Figure 17 : Effets potentiellement cardioprotecteurs de l'activité physique, adapté de Powers et al., (2008). HSPs : protéines de choc thermique.

2.1. Statut antioxydant

Dans le cadre d'un entraînement en endurance, de nombreuses études ont rapporté des effets bénéfiques de l'exercice régulier sur le statut enzymatique antioxydant. En effet, l'augmentation de la consommation d'O₂ au cours de l'exercice est associée à une augmentation de la production de RLO (Jenkins, 1988 ; Ji, 1996). La récurrence de ce stress oxydant est à l'origine d'une adaptation du myocarde, caractérisée notamment par une augmentation de ses défenses enzymatiques antioxydantes (Ji, 1995 ; Atalay et Sen, 1999 ; Ji, 1999). La littérature

scientifique sur le sujet fait principalement apparaître une augmentation de l'activité/expression de la SOD dans le tissu cardiaque, suite à une période d'entraînement (Yamashita et al., 1999 ; Hamilton et al., 2003). Cependant des travaux de Lew et Quintanilha, (1991) et de Ascensao et al., (2006) ont aussi rapporté un effet bénéfique non négligeable de l'exercice sur l'expression et l'activité de la GPx et de la CAT. Cette amélioration du statut enzymatique antioxydant suite à un entraînement permet de développer un phénotype cardioprotecteur, notamment vis-à-vis de l'infarctus du myocarde (Powers et al., 2002 ; French et al., 2006 ; French et al., 2008 ; Kavazis et al., 2008). En effet les travaux de French et al., (2006 ; 2008) associent l'augmentation de l'activité antioxydante à une moindre apoptose et nécrose myocardique au cours d'une IR. La diminution de la mort cellulaire serait la conséquence, d'une diminution du stress oxydant au cours de l'IR, permettant notamment de protéger les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique intracellulaire (French et al., 2008 ; Kemi et Wisloff, 2010). D'autres travaux ont également montré qu'une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes associée à un entraînement en endurance permettait de réduire sensiblement la sévérité des arythmies de reperfusion (Hamilton et al., 2004). Bien que la majorité des résultats de la littérature scientifique rapportent que ce type de stratégie cardioprotectrice est à l'origine d'une augmentation de l'activité enzymatique antioxydante, il convient toutefois de noter que certains travaux n'établissent pas d'amélioration du statut enzymatique antioxydant. Cette discordance entre les différents travaux est très probablement liée aux caractéristiques qualitatives (durée/intensité) du programme d'entraînement utilisé (Powers et al., 2008).

2.2. Homéostasie calcique

2.2.1. Généralités

Les effets bénéfiques d'un entraînement en endurance se traduisent au niveau cellulaire notamment par une amélioration du transitoire calcique (Wisloff et al., 2001 ; Kemi et al., 2005). Cette amélioration de la libération de Ca^{2+} du RS au cours du transitoire est rapportée comme étant notamment la conséquence d'une amélioration de la vitesse et de la probabilité d'ouverture des canaux RyR-2 au cours du couplage excitation-contraction (Palmer et al., 1998) (Figure 18) et d'une surexpression des pompes SERCA-2a permettant, dans ces conditions, de maintenir la charge en Ca^{2+} du RS (Wisloff et al., 2001). De plus, un entraînement en endurance permettrait aussi d'augmenter l'activité des canaux SERCA-2a suite à une élévation de l'expression et de l'état de phosphorylation du phospholamban (Wisloff et al., 2001 ; Kemi et al., 2008). Cette activité accrue des différents systèmes de recapture du Ca^{2+} a pour conséquence une amélioration de la vitesse de relaxation du myocarde. Par ailleurs, le maintien ou l'amélioration du repompage calcique par le RS joue aussi un rôle non négligeable dans l'amélioration de la fonction systolique myocardique. En effet, l'amélioration du repompage calcique a pour conséquence une élévation de la charge en Ca^{2+} du RS en fin de diastole et donc une augmentation de la quantité de Ca^{2+} relarguée au cours du transitoire (Wisloff et al., 2001 ; Wisloff et al., 2002 ; Lu et al., 2002) (Figure 18). Enfin, il a également été montré que l'entraînement en endurance augmentait la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} intracellulaire (Wisloff et al., 2001 ; Diffie et al., 2001) (Figure 19), améliorant ainsi la réponse des protéines contractiles à l'élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire.

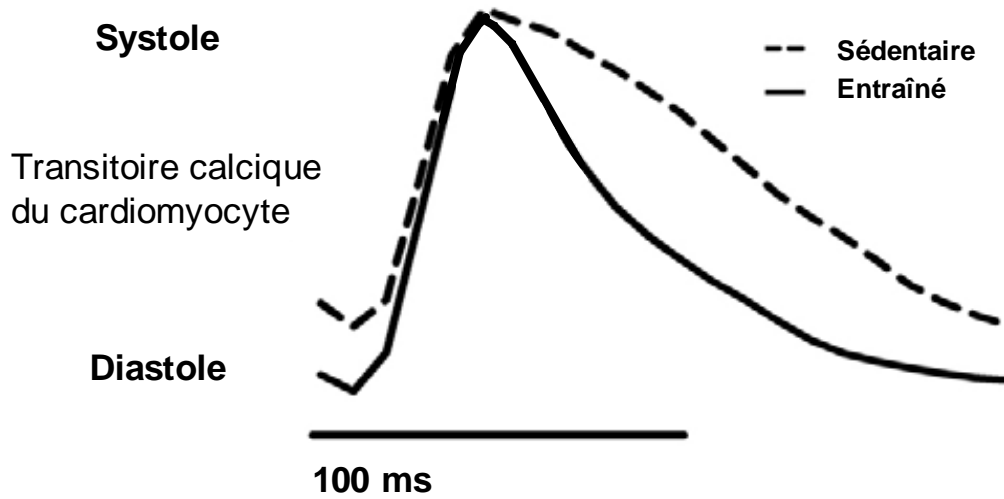


Figure 18 : Transitoire calcique de cardiomyocytes isolés chez des rats sédentaires et entraînés, adapté de Kemi et al., (2008).

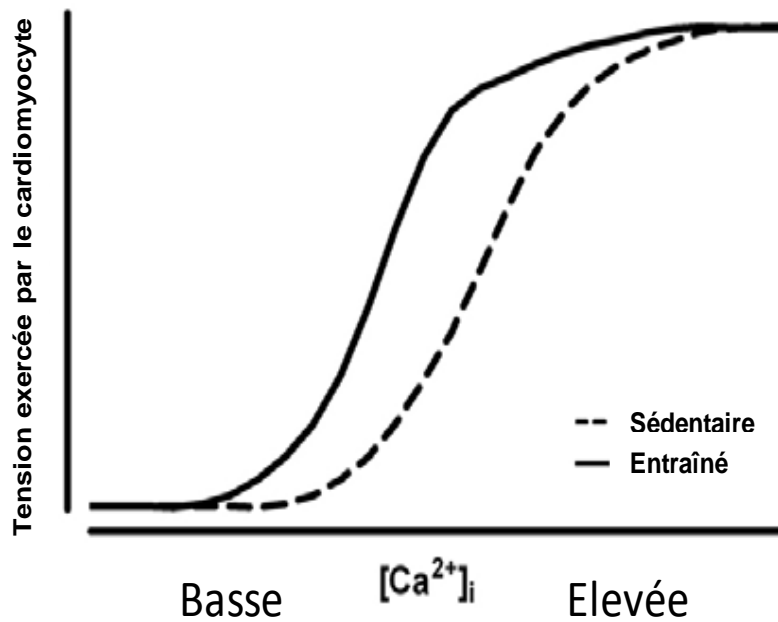


Figure 19: Sensibilité au calcium de cardiomyocytes isolés chez des rats sédentaires et entraînés, adapté de Kemi et al., (2008).

2.2.2. Dans le cadre de pathologies

En conditions pathologiques, et particulièrement au cours du développement de l'insuffisance cardiaque, il est classiquement rapporté que l'entraînement en endurance conduit à une normalisation des mouvements calciques intracellulaires, à l'origine d'une amélioration de la fonction contractile myocardique (Wisloff et al., 2002). Ces améliorations sont expliquées comme secondaires à une normalisation de l'expression des protéines de l'homéostasie calcique (Wisloff et al., 2002 ; De Waard et al., 2007) ainsi qu'à une normalisation de la sensibilité des protéines contractiles au Ca^{2+} (Wisloff et al., 2002). Par ailleurs, au cours du syndrome d'IR, French et al., (2008) ont rapporté des effets protecteurs d'un entraînement régulier, conduit préalablement à l'accident ischémique, sur la régulation des mouvements calciques intracellulaires. Sans pouvoir réellement négliger de potentiels effets bénéfiques de l'exercice sur les protéines impliquées dans la régulation du cycle calcique au cours de la révolution cardiaque, ces auteurs expliquent ce résultat comme étant lié aux effets bénéfiques de l'exercice sur l'activité enzymatique antioxydante myocardique. En effet, cette amélioration des capacités de défenses antioxydantes permettrait, au cours de l'IR, de prévenir l'oxydation et la dégradation de certaines protéines, essentielles dans le maintien de l'homéostasie calcique (SERCA-2a, Phospholamban, NCX, L-type Ca^{2+}) (French et al., 2008) et considérées comme rédox-sensibles (Kobayashi et al., 2007 ; Gyorke et Carnes, 2008 ; Sun et al., 2008 ; Kuster et al., 2010) (Figure 20).

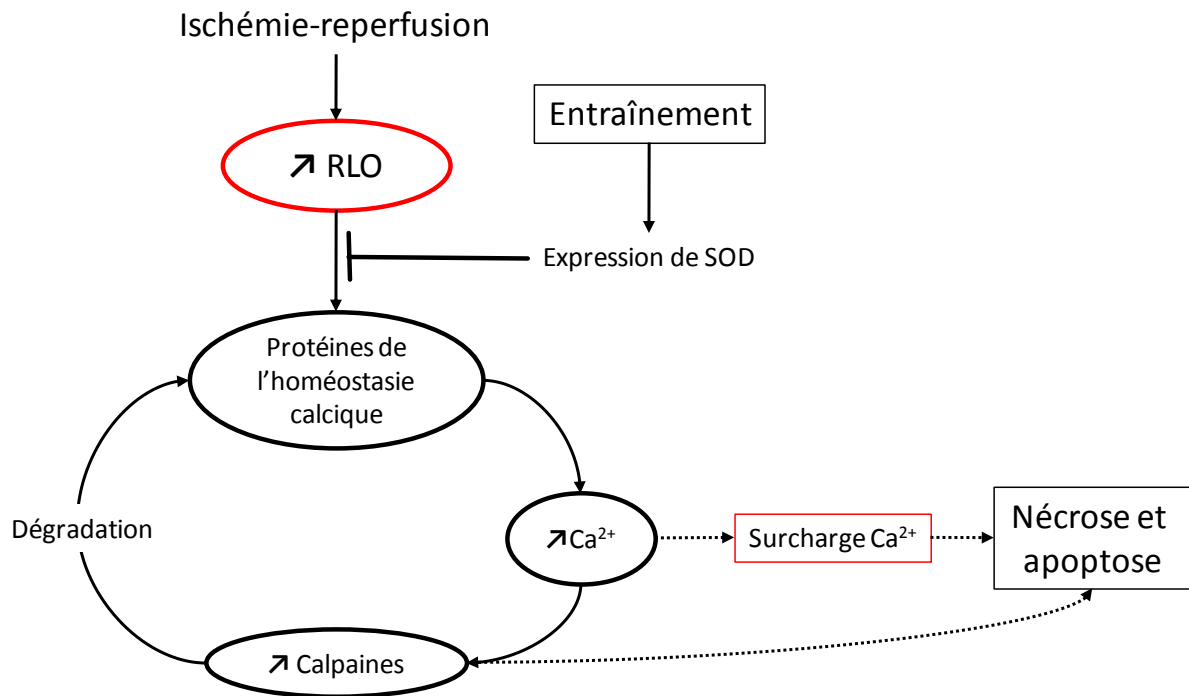


Figure 20 : Mécanismes de cardioprotection liés à l'expression de SOD suite à un entraînement en endurance. RLO : radicaux libres de l'oxygène ; SOD : superoxyde dismutase.

2.3. Autres facteurs

Bien que l'amélioration de l'homéostasie calcique et du statut redox cellulaire semblent être les principales voies de cardioprotection induites par l'exercice, d'autres facteurs ont également été proposés afin d'expliquer les effets cardioprotecteurs d'un entraînement en endurance. Ces mécanismes sont :

- Des modifications structurales et fonctionnelles de la circulation coronaire (développement d'un réseau coronaire collatéral). Il a été montré qu'un entraînement en endurance pouvait améliorer l'angiogénèse ainsi que la vasomotricité des artères coronaires (Laughlin et al., 1998 ; Brown, 2003)
- Une induction des protéines de choc thermique (heat shock protein HSPs). Certaines HSPs (telles que la HSP72) pourraient être responsable d'une cardioprotection notamment au cours d'un syndrome d'IR (Knowlton, 1994 ; Benjamin et McMillian,

1998 ; Powers et al., 2001). Ainsi HSP72 a été rapporté comme pouvant protéger la mitochondrie contre le stress oxydant et pourrait également limiter l'apoptose cellulaire (Mosser et al., 1993 ; Polla et Cossarizza, 1996).

- Une amélioration de l'activité des canaux potassiques ATP-dépendants (SarcoK_{ATP}-mitoK_{ATP}) (Brown et al., 2005), qui semble être impliquée dans l'amélioration du statut redox et de l'homéostasie calcique, protégeant ainsi le myocarde notamment au cours de l'IR (Kong et al., 2001 ; O'Rourke, 2004).

Matériel et méthode

I. Population

Les expériences ont été réalisées sur un total de 190 rats mâles de souche Wistar âgés de 16 semaines. Le bon état de santé des animaux était garanti à chaque livraison par un certificat sanitaire. Les expérimentations se sont déroulées de septembre 2007 à Mai 2010 au sein des locaux de l'EA:4278 (Avignon, dirigé par le Pr Philippe Obert) ainsi qu'au sein des locaux de l'U637 pour la partie cellulaire au sein (Montpellier, dirigé par le Dr Sylvain Richard) et des locaux de l'UMR5525, TIMC-IMAG équipe PRETA/Cœur & Nutrition, pour certains dosages biochimiques (Grenoble, dirigé par le Pr Joël de Leiris). Les animaux ont été placés dans des conditions standards de température et d'humidité et éclairés selon un rythme 12 heures de jour/12 heures de nuit. L'accès à l'eau et à la nourriture était libre.

Ce travail est organisé et présenté selon 3 études distinctes. Pour les études 1 et 2, les rats ont été aléatoirement répartis en début de protocole dans les 2 groupes suivants :

- Rats Ctrl : rats placés en environnement standard d'animalerie (Air filtré standard)
- Rats CO : rats placés 12 heures par jour en environnement pollué au CO (30-100 ppm) et 12 heures en environnement standard d'animalerie, pendant 4 semaines.

Pour l'étude 3, afin d'évaluer les effets potentiellement protecteurs d'un entraînement conduit dans les semaines précédant l'exposition à un environnement pollué, les rats ont été répartis aléatoirement dans les 3 groupes suivants :

- Rats Ctrl-Sed : rats placés en environnement standard d'animalerie
- Rats CO-Sed : rats placés 12 heures par jour en environnement pollué au CO (30-100 ppm) et 12 heures en environnement standard d'animalerie, pendant 4 semaines.

- Rats CO-Ex : rats entraînés, en environnement standard d'animalerie, 5 jours par semaine pendant 4 semaines, puis 2 jours par semaine pendant les 4 semaines d'exposition en environnement pollué au CO (cf. exposition des rats CO, II.).

Toutes les expériences ont été menées en accord avec les directives du ministère français de l'agriculture et les conventions européennes sur l'utilisation et le conditionnement des animaux de laboratoire.

II. Exposition au CO

L'OMS a estimé des seuils d'exposition au CO au-delà desquels la santé de l'individu est mise en cause. Des expositions à 9 ppm pendant 8 heures constituent une limite recommandée à ne pas dépasser. Cependant il existe des périodes de la journée, où ces concentrations sont largement supérieures en milieu urbain. En effet, différentes enquêtes portant sur la qualité de l'air rapportent des concentrations allant de 2 à 40 ppm mais pouvant atteindre 170 ppm en cas de trafic important (Wright et al., 1975 ; Stern et al., 1988 ; Bevan et al., 1991 ; Finkelstein et al., 2005). Ainsi, de manière à simuler une exposition de type citadine au CO, les animaux ont été placés 12 heures par jour dans un caisson hermétique relié à une bouteille de CO. La concentration en CO au sein du caisson était contrôlée en continu à l'aide d'un analyseur de CO de type CHEMGARD Infrared Gas Monitor NEMA 4 Version, (MSA) et régulé grâce à un système d'électrovanne dont l'ouverture et la fermeture étaient contrôlées par informatique. Les rats ont été exposés à une concentration résiduelle de 30 ppm complétée par 5 pics de 1 heure à 100 ppm. Ils étaient ensuite placés 12 heures en environnement standard d'animalerie (air filtré standard d'animalerie, AFS) (Figure 21).

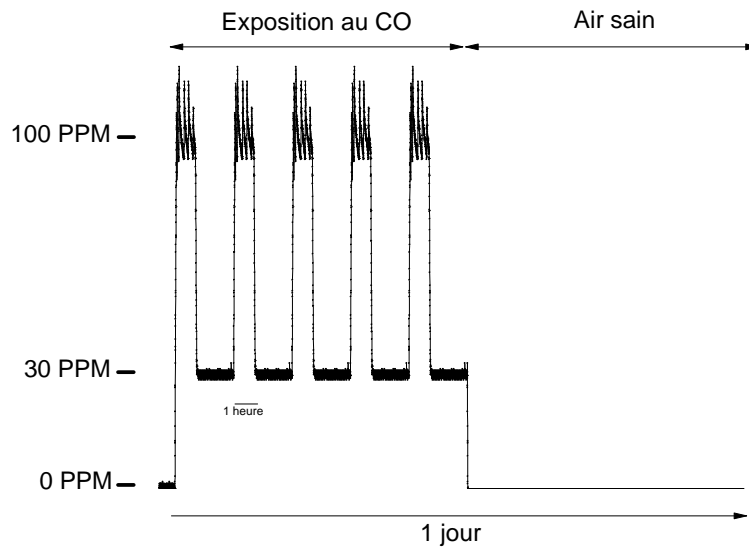


Figure 21 : Pattern type d'exposition au CO (24 heures).

Afin d'éviter tout effet aigu du CO au cours des expérimentations, les rats étaient placés, à la fin des 4 semaines d'exposition, 24 heures en environnement AFS avant d'être utilisés pour les expériences. En effet, des travaux préliminaires ont montré que les concentrations d'HbCO, supérieures chez les rats CO par rapport aux rats Ctrl 1 heure et 3 heures après la dernière exposition, ne diffèrent pas entre les 2 groupes 24 heures après la sortie du caisson d'exposition (Figure 22).

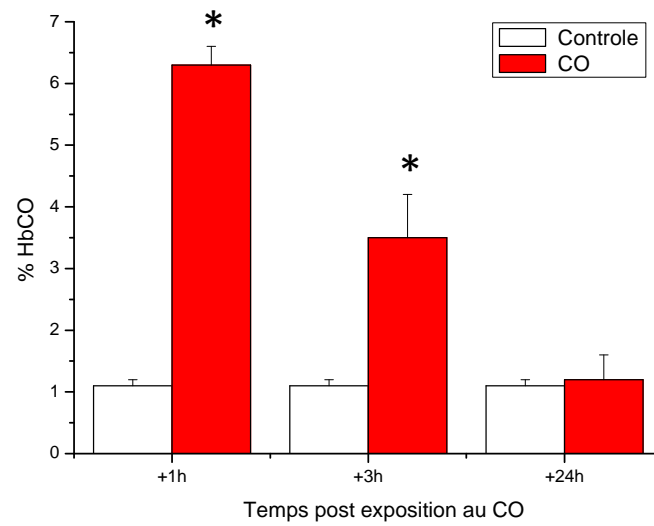


Figure 22 : Evolution des taux d'HbCO sanguine suite au protocole d'exposition au CO, * $p < 0,05$; rats CO vs. Ctrl.

III. Entraînement en endurance

Selon les recommandations de l’OMS, l’activité physique régulière, définit comme la pratique d’une activité d’une durée minimum de 30 min à intensité modérée au moins 5 jours par semaine (OMS et FIMS, 1995) est bénéfique pour la santé. Partant de ces recommandations, un protocole d’entraînement en endurance à intensité modérée a été mis en œuvre. Ce protocole a été conduit en environnement AFS durant les 4 semaines précédant la période d’exposition au CO à raison de 5 séances consécutives par semaine et les exercices ont été réalisés sur tapis roulant motorisé (Image 1). Durant la première semaine, les animaux étaient familiarisés au tapis roulant avec une première séance de 15 min à une vitesse de 17 m/min. Chaque jour, une augmentation du temps de course de 5 min était réalisée afin d’atteindre 40 min de course en fin de semaine. Les semaines suivantes, chaque séance durait 40 min de course à une vitesse de 17 m/min, puis 18 m/min la troisième semaine, et 20 m/min la dernière semaine. Durant toute la durée du protocole, chaque séance débutait par un échauffement de 5 min à 10 m/min, avec une augmentation progressive de la vitesse jusqu’à atteindre celle requise pour l’entraînement. L’intensité d’effort était estimée tout au long du protocole à environ 50 % de la vitesse maximale aérobie (VMA) des animaux. A l’issue du programme d’entraînement, les rats CO-Ex maintenaient, lors des 4 semaines d’exposition au CO, un entraînement en condition AFS identique à celui réalisé lors de la dernière semaine du protocole d’entraînement, mais à raison de 2 séances par semaine uniquement (Figure 23).



Image 1 : Entraînement de rats sur tapis roulant

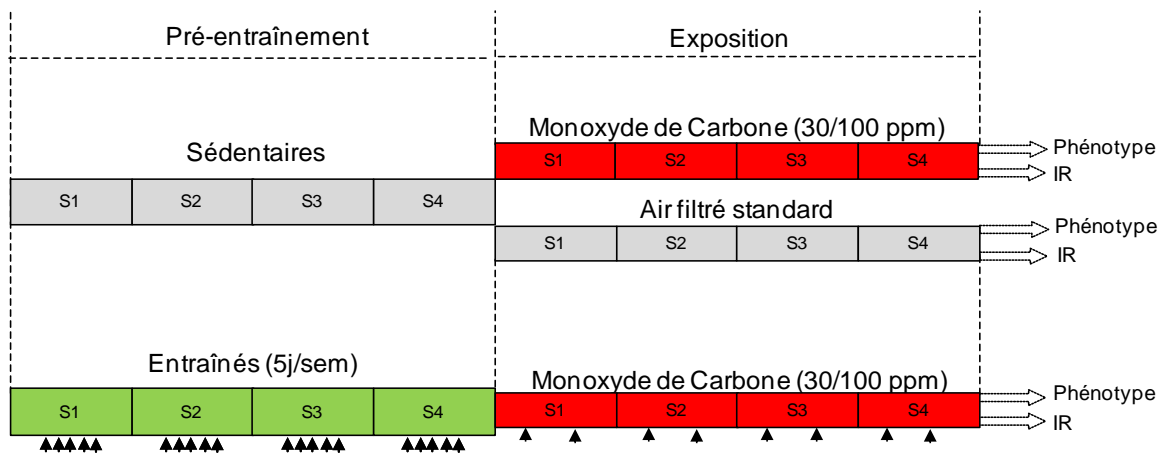


Figure 23 : Organisation du protocole d'entraînement et d'exposition au CO.

IV. Ischémie-reperfusion myocardique

Afin d'évaluer spécifiquement les effets d'une exposition chronique au CO sur le myocarde et ainsi de limiter l'influence des différents facteurs circulants possiblement modifiés par une exposition à ce polluant, le protocole d'IR a été réalisé sur un modèle de cœur isolé perfusé de Langendorff (Image 2).

Après une injection d'héparine (3000 UI/kg, i.p.), les rats étaient anesthésiés avec du pentobarbital sodique (50 mg/kg, i.p.). Une thoracotomie était réalisée, le cœur rapidement prélevé était immergé dans une solution de Krebs-Henseleit à 4°C afin de stopper toute activité contractile. L'aorte était canulée et le cœur perfusé de façon rétrograde, à pression constante (80 mmHg). Le dispositif de perfusion était constitué d'un réservoir de liquide relié à un piège à bulle et d'une enceinte thermostatée pour maintenir le liquide de perfusion à 37°C (Image 2). Le liquide de perfusion était une solution de Krebs-Henseleit composée de : NaCl 118.3, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, Glucose 11.1, CaCl 2.5 ; mM. Cette solution était tamponnée à pH 7.4 et équilibrée par un mélange gazeux composé de 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂. La mesure du débit coronaire, tout au long du protocole, permettait d'évaluer la qualité du montage du cœur sur le système, et ainsi de s'assurer de la viabilité de l'organe tout au long du protocole.

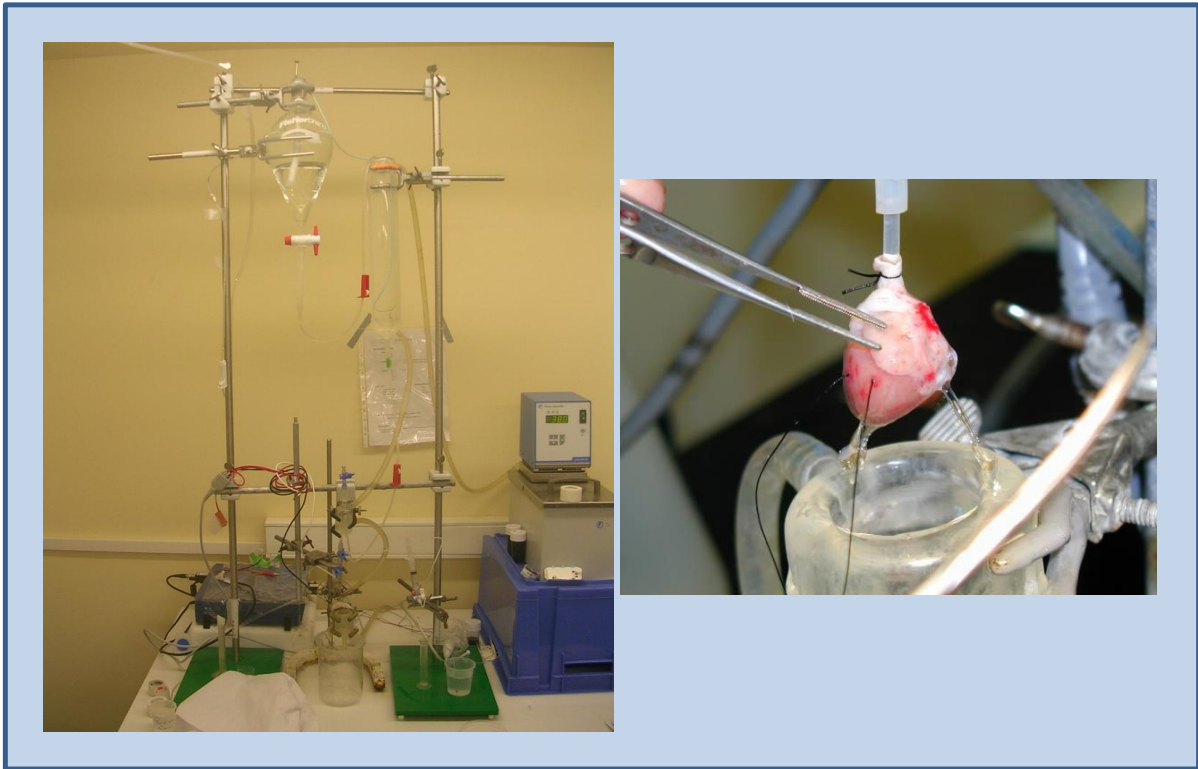


Image 2 : Système de cœur isolé perfusé de Langendorff.

1. Fonction cardiaque et mort cellulaire au cours de l'IR.

Les atrioms gauche et droit étaient excisés et le nœud sinusal délicatement écrasé de manière à stopper la contraction autonome du cœur. Un ballonnet en latex, relié à un capteur de pression, était introduit dans le VG via les valves mitrales afin de mesurer la pression développée par ce dernier. Une fois le ballonnet introduit, le cœur était stimulé électriquement à une fréquence de 300 battements par minute. Le volume du ballonnet était ensuite ajusté afin que celui-ci adhère aux parois de la cavité, puis réglé afin d'obtenir et de maintenir une pression diastolique de 5 mmHg tout au long de la période de stabilisation. Afin de réaliser l'ischémie, un fil de suture (fil de soie 6-0) était placé autour de l'artère coronaire antérieure gauche (ACG). Au bout de 30 min de stabilisation, l'occlusion était réalisée en nouant le fil

de suture sur un tube en plastique placé à la surface du cœur, formant ainsi un point de compression sur l'artère. L'ischémie myocardique régionale était maintenue 30 min, puis le tube en plastique était retiré, permettant ainsi la reperfusion de la zone ischémisée. La reperfusion était maintenue pendant 2 heures.

A partir des tracés de pression, la pression développée (P_{dev} ; mmHg ; définie comme la différence entre la pression systolique et diastolique), ainsi que les dérivées maximales ($+dP/dt_{max}$; mmHg/s) et minimales ($-dP/dt_{max}$; mmHg/s) de pression ont été calculées tout au long du protocole d'IR (Figure 24).

La mesure du débit coronaire (ml/min) était réalisée par recueil et quantification des effluents coronaires tout au long du protocole de cœur isolé. La perfusion tissulaire était calculée à l'aide du rapport entre le poids du cœur et le débit coronaire (perfusion myocardique en ml/min/mg).

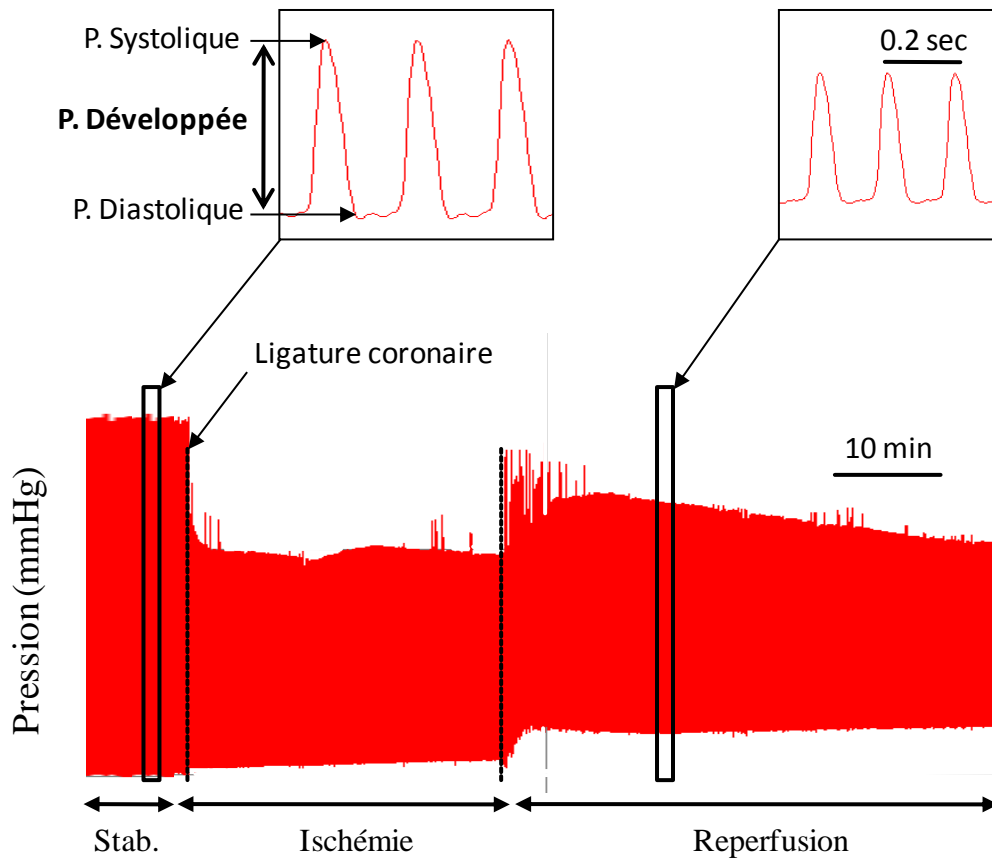


Figure 24 : Paramètres de pression au cours du protocole d'IR sur cœur isolé perfusé

Après 2 heures de reperfusion, le fil de suture était renoué de manière à obtenir une occlusion totale de la zone à risque (zone ischémiée). Une solution de Bleu d'Evans (5 ml, 2 %) était alors injectée progressivement afin de distinguer la zone perfusée (colorée en bleue) de la zone non perfusée ou zone à risque (non colorée) (Figure 25). Le cœur était ensuite congelé, puis ultérieurement découpé en 5 fines tranches (perpendiculairement à l'axe base-apex), incubées chacune pendant 25 min à 37°C dans une solution de triphenyl-tetrazolium chloride (TTC, 0.5 mg/ml). L'incubation dans le TTC permet de faire apparaître, en présence d'enzymes déshydrogénases, une coloration rouge brique du myocarde sain. Au contraire, dans les zones infarctées, caractérisées notamment par une absence d'activité enzymatique, aucune coloration n'est observée (blanc/brun) (Figure 25). Après coloration au TTC, les coupes de cœur étaient maintenues pendant 72 heures dans du Formol, puis analysées par

planimétrie (logiciel ImageJ, V1.28 image processing and analysis software from the National Health Institute, U.S.A.). La zone à risque était exprimée en pourcentage de la surface du cœur, et la zone infarctée était exprimée en pourcentage de la surface de la zone à risque.



Figure 25 : Evaluation planimétrique de la zone à risque et de la zone infarctée. En bleu : zone saine ; en rouge et blanc : zone à risque ; en blanc : zone infarctée.

2. Evaluation des arythmies de reperfusion.

Un protocole d'IR était réalisé sur cœur isolé battant afin d'évaluer les arythmies de reperfusion. Pour cela, une fois l'aorte canulée, le cœur était laissé intact et deux électrodes épicaudiques (fil d'argent) étaient placées afin d'obtenir un tracé électrocardiographique (ECG). Les arythmies étaient évaluées durant les 4 premières min de reperfusion. L'analyse de l'ECG a permis d'évaluer différents types d'arythmies à partir de la classification décrite dans la convention de Lambeth (Walker et al., 1988) (Figure 26). Afin de comparer la sévérité des arythmies de reperfusion, un système de scorage adapté de celui décrit par Walker et al., (1988) était utilisé (Table 2). Les cœurs étaient notés selon un système graduel, rapporté dans la table 1, allant de 0 pour les cœurs ne présentant pas d'arythmie à 4 pour les cœurs présentant une fibrillation ventriculaire irréversible, complication rythmique considérée comme la plus grave.

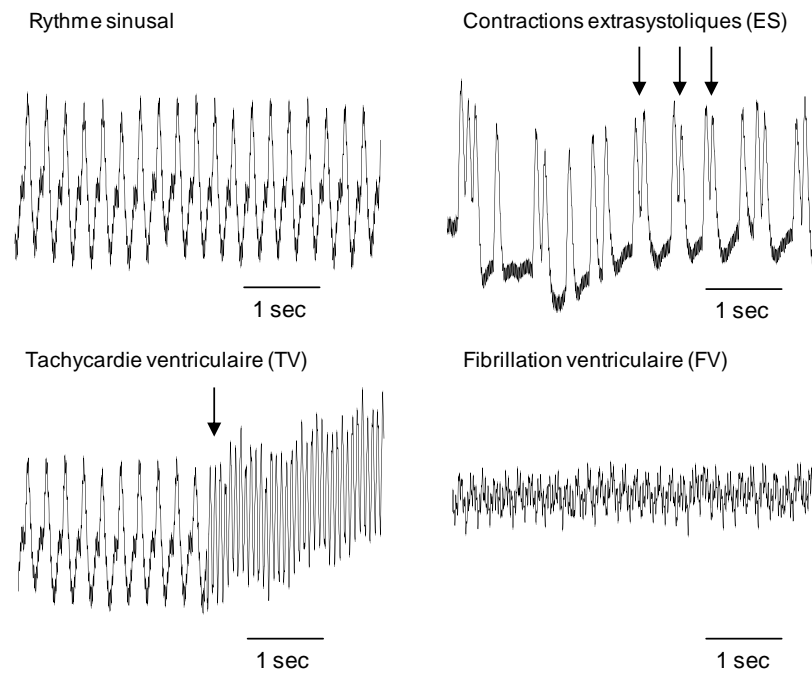


Figure 26 : Rythme sinusal et évènements arythmiques identifiés au cours de la reperfusion post-ischémique.

Tableau 2 : Système de scorage de la sévérité des arythmies de reperfusion post-ischémique, adapté de Walker et al., (1988).

Score d'arythmie

Score	Evènements arythmiques
0	Aucun évènement arythmique
1	ES uniquement
2	TV avec ou sans ES
3	FV réversible
4	FV irréversible

ES : extrasystole; TV : Tachycardie ventriculaire; FV : Fibrillation ventriculaire

V. Homéostasie calcique sur cardiomyocytes isolés

1. Isolement cellulaire

La procédure d'isolement cellulaire a été réalisée comme décrite par Andre et al., (2010). Brièvement, le cœur était prélevé et canulé sur un système de perfusion rétrograde de Langendorff, avec une solution Hanks-HEPES dépourvue de Ca^{2+} afin de fragiliser les connections intercellulaires (NaCl 117 ; KCL 5,7 ; NaHCO_3 4,4 ; KH_2PO_4 4,5 ; MgCl_2 1.7 ; HEPES 21 ; Glucose 11,7 ; Taurine 20, mM ; pH=7.5). Après 5 min de rinçage, le cœur était ensuite perfusé pendant 20 min avec une solution enzymatique contenant de la collagénase de type A (0,8 mg/mL), afin de digérer la matrice extracellulaire. Les cellules myocardiques étaient extraites mécaniquement à l'aide d'une pipette. La préparation était ensuite filtrée (Nylon 250 Mesh) pour éliminer les tissus non dissociés, et les cellules étaient incubées pendant 15 min à 37°C. Durant ces 15 min la concentration en Ca^{2+} était augmentée progressivement jusqu'à 1 mM. Les cellules reposaient alors 1 heure dans une solution physiologique à 1 mM Ca^{2+} .

2. Imagerie calcique et raccourcissement cellulaire

Le système Ionoptix (Boston, USA) permet d'étudier le couplage entre les mouvements calciques et le raccourcissement des sarcomères. La mesure de la longueur des sarcomères repose sur une propriété structurale intrinsèque des cardiomyocytes : l'alternance régulière des bandes claires (isotropes) et sombres (anisotropes) des protéines contractiles (actine et myosine). Cette alternance peut être assimilée à une fonction périodique de l'espace, analysée par une fonction

mathématique : la transformée de Fourier rapide (FFT). Cette fonction permet de transformer un signal périodique pur (de périodicité T) en une raie de fréquence dont la valeur fondamentale est $1/T$. L'analyse fréquentielle des sarcomères par la FFT donne un spectre de fréquences dont la valeur fondamentale est inversement proportionnelle à la distance moyenne entre deux sarcomères. L'acquisition et la mesure de la longueur des sarcomères étaient réalisées à l'aide du logiciel Ionoptix. L'analyse de la longueur des sarcomères s'effectuait à l'intérieur d'une fenêtre d'acquisition dont la position était choisie de telle sorte que l'on puisse avoir le maximum de sarcomères. L'analyse de l'image numérisée était effectuée toutes les 20 ms, durée inférieure à la durée moyenne de contraction des cellules cardiaques à température ambiante (22°C) qui est de plusieurs centaines de millisecondes. La résolution de la mesure de la longueur des sarcomères selon ce dispositif expérimental est de $\pm 7\text{ nm}$. Afin de mesurer les variations de Ca^{2+} intracellulaire, les cellules étaient incubées avec un indicateur calcique ratiométrique fluorescent, l'Indo-1AM, pendant 30 min ($50000\text{ cellules}/\mu\text{L}$ d'Indo). Après décantation, le surnageant était prélevé et remplacé par la solution physiologique d'une concentration calcique de $1,8\text{ mM}$. L'Indo-1AM est un fluorochrome utilisé en simple excitation (UV 360) et double émission (480 et 405 nm). La forme libre de l'Indo-1 émet à une fluorescence à 480 nm alors que la forme liée au Ca^{2+} émet à 405 nm. Ainsi quand la concentration intracellulaire augmente, l'amplitude du pic à 480 nm diminue, alors que celle du pic à 405 nm augmente. Le rapport F_{405}/F_{480} reflète la concentration de Ca^{2+} intracellulaire dans une gamme de concentration de 5 nM à $30\text{ }\mu\text{M}$, en minimisant les artéfacts de mouvement (Figure 27).

Les cellules placées dans la cuve de solution physiologique à $1,8\text{ mM Ca}^{2+}$ étaient stimulées électriquement à une fréquence de $0,5\text{ Hz}$ par des électrodes de platine. La longueur des sarcomères et la concentration en Ca^{2+} étaient mesurées en temps réel à l'aide du système Ionoptix (Boston, USA). La sonde était excitée par une lampe Xénon 75 W (XBO 75, 14 V) à 360 nm . Les signaux de fluorescence étaient collectés par deux photomultiplicateurs (PM1,

PM2, Hamamatsu R1104). L'acquisition et l'analyse des transitoires calciques ont été réalisées grâce au logiciel Ionoptix.

3. Paramètres mesurés

A partir de l'enregistrement du transitoire calcique et du raccourcissement cellulaire, étaient calculés : i) la fraction de raccourcissement cellulaire (pourcentage de variation de la longueur des sarcomères lors de la stimulation) ; ii) le Ca^{2+} basal, reflétant la concentration diastolique de Ca^{2+} cytosolique ; iii) l'amplitude du transitoire calcique, reflet de la quantité de Ca^{2+} libérée à chaque stimulation (différence entre le pic du transitoire et le niveau basal) ; iv) la vitesse de décroissance du Ca^{2+} cytosolique (Tau, temps de restauration de 50 % du Ca^{2+} basal), permettant d'apprécier la cinétique de repompage et d'élimination du Ca^{2+} cytosolique (Figure 7).

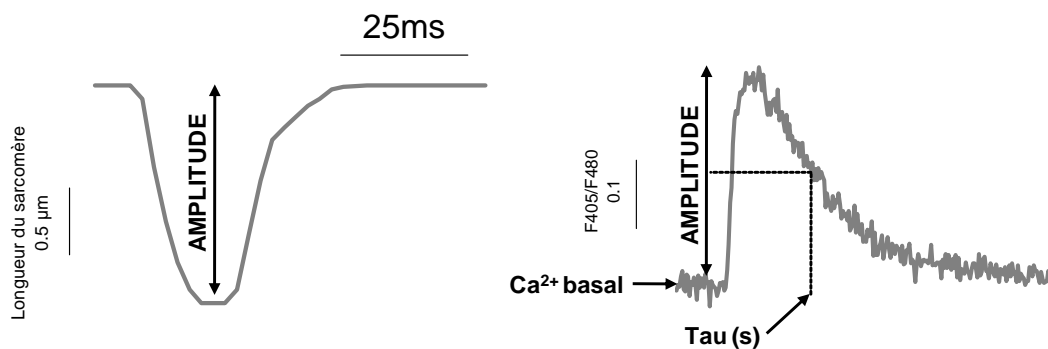


Figure 27 : Paramètres calculés : A. Raccourcissement cellulaire B. Transitoire calcique.

4. Protocole d'anoxie-reoxygénation cellulaire

Les cardiomyocytes une fois isolés étaient transférés dans une cuve et placés pendant 60 min dans une chambre d'anoxie où la concentration d'O₂ était d'environ 2 %; puis ces cuves étaient placées 60 min à air ambiant à une concentration d'O₂ d'environ 19,4 %. Afin d'évaluer les effets délétères de ce protocole d'anoxie-réoxygénation (A/R) sur l'intégrité fonctionnelle des cardiomyocytes, une étude préliminaire a été réalisée. Les résultats de cette étude ont démontré que ce protocole d'A/R est à l'origine de troubles fonctionnels caractérisés par une altération du raccourcissement cardiomyocytaire (Figure 28A), une élévation du Ca²⁺ basal (Figure 28B) et une réduction de l'amplitude du transitoire calcique (Figure 28C). La prévention des effets délétères de l'A/R par l'incubation dans le milieu de N-acetylcystéine (NAC, 20 μM), un antioxydant non spécifique, a permis de mettre en évidence le rôle majeur des RLO dans les atteintes cellulaires liées à d'A/R (Figure 28 DEF).

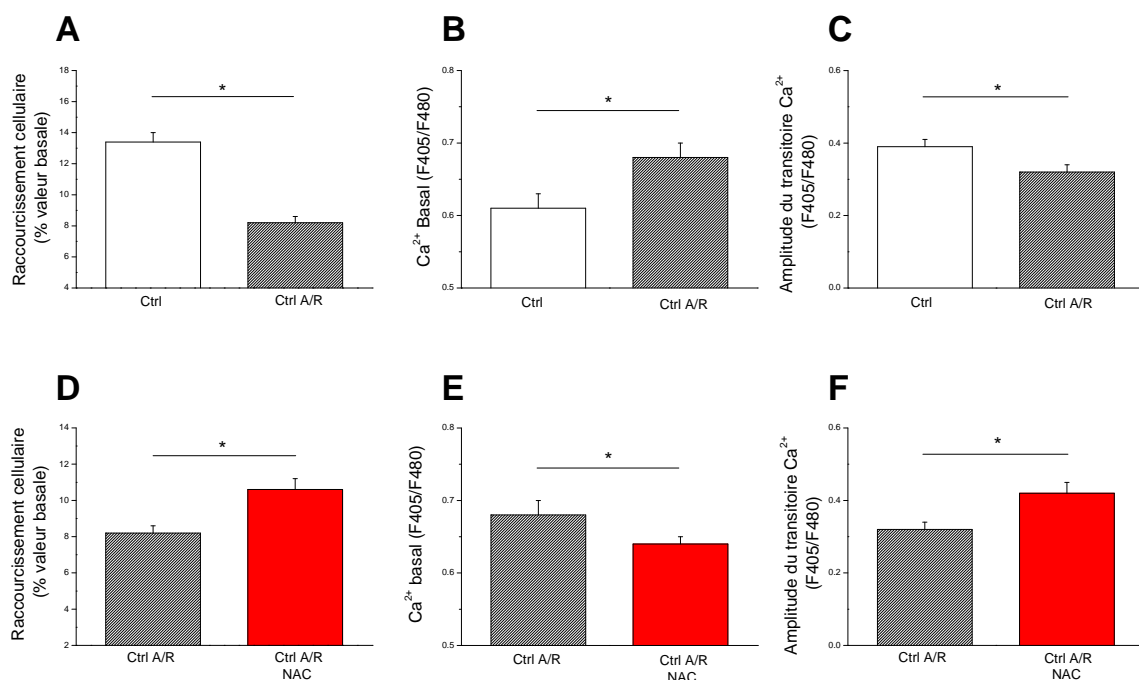


Figure 28 : Effets de l'anoxie-réoxygénation cellulaire sur A, le raccourcissement cellulaire ; B, le Ca²⁺ cytosolique diastolique ; C, L'amplitude du transitoire calcique ; et effets de l'incubation de N-Acetylcystéine (NAC, 20 μM) au cours de l'anoxie-réoxygénation cellulaire sur D, le raccourcissement cellulaire ; E, le Ca²⁺ cytosolique diastolique ; F, L'amplitude du transitoire calcique. Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne ± SEM. * p<0,05

VI. Traitements pharmacologiques

Au cours des divers protocoles d'IR et d'A/R, différents traitements pharmacologiques ont été utilisés.

1. Le N-Acetylcystéine (NAC)

Le NAC est un antioxydant non spécifique utilisé à une concentration de 20 μ M au cours des expérimentations sur cardiomyocytes isolés. Ainsi, afin d'évaluer l'implication de la formation de RLO, des lots de cardiomyocytes étaient incubés avec du NAC tout au long de la période d'anoxie et de réoxygénation.

2. Le S-methyl isothiouréa (SMT)

Le SMT est un inhibiteur spécifique de la iNOS quand il est utilisé à la concentration de 0,5 μ M (Viridis et al., 2009). Afin d'évaluer l'implication de cette enzyme dans les atteintes morphologiques et fonctionnelles, son inhibition spécifique par le SMT a été réalisée au cours du protocole d'A/R cellulaire et d'IR myocardique. Lors de la phase cellulaire, les cellules étaient incubées avec du SMT tout au long de la période d'anoxie et de réoxygénation. Lors du protocole d'IR myocardique, le SMT était dilué dans la solution de Krebs-Henseleit, et permettait donc d'inhiber la iNOS tout au long de l'IR.

VII. Biochimie

1. Activité enzymatique

1.1. Statut enzymatique antioxydante

Afin d'évaluer le statut enzymatique antioxydant myocardique des rats de chaque population à la fin des différents séjours expérimentaux, des cœurs ont été prélevés, clampés à froid dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C . Les tissus ventriculaires prélevés étaient homogénéisés dans un tampon Tris-HCl (Tris HCl 60mM), contenant 1 mM d'acide diéthylènetriaminepenta-acétique (pH 7.4, 10ml/g w.wt), à l'aide d'un homogénéisateur de téflon. Les tissus homogénéisés étaient ensuite centrifugés à 2000 g et 4°C pendant 10 min afin d'éliminer les débris cellulaires. L'homogénat ainsi obtenu était utilisé pour évaluer les activités enzymatiques de la SOD, de la CAT et de la GPx. Les activités enzymatiques sont exprimées en unité internationale par milligramme de protéine (UI/mg prot). Le dosage des protéines de l'homogénat était réalisé selon la méthode décrite par Lowry et al., (1951).

1.1.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD.

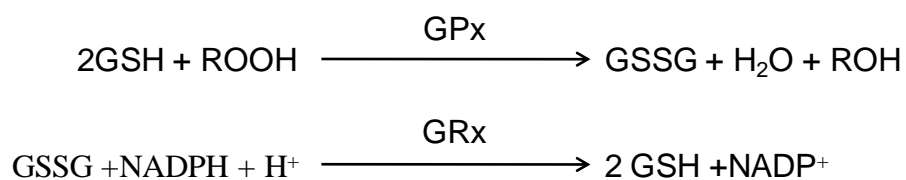
Le dosage de l'activité de la SOD cardiaque a été réalisé selon la méthode décrite par Marklund (1976), fondée sur l'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol avec l' O_2^- par la SOD. La réalisation d'une droite de référence de la variation de la densité optique par min ($\Delta\text{DO}/\text{min}$) à partir de solutions gammes de SOD commerciale (de 0 à 25 mg/L) permettait d'évaluer la concentration de SOD des échantillons tissulaires. La $\Delta\text{DO}/\text{min}$ était déterminée par spectrophotométrie à 410 nm.

1.1.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT.

Le dosage de l'activité de la CAT cardiaque a été réalisé selon la méthode décrite par Beers et Sizer (1952), fondée sur la décomposition de l' H_2O_2 par la CAT. L'activité de la CAT était déterminée par spectrophotométrie suivant la disparition de l' H_2O_2 à 240 nm.

1.1.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la GPx.

Le dosage de l'activité de la GPx cardiaque a été réalisé selon la méthode décrite par Flohe et Gunzler (1984), fondée sur la réduction des hydroperoxydes organiques en alcools par la GPx parallèlement à l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Ce dernier, dont la formation est dépendante de l'activité de la GPx, est ensuite réduit par la glutathion réductase (GRx) en présence de NADPH. L'activité de la GPx était déterminée par spectrophotométrie suivant la décroissance de l'absorption du NADPH à 340 nm.



1.1.4. Evaluation de l'activité de la thioredoxine réductase

La thioredoxine est une enzyme à activité antioxydante intrinsèque qui est réduite par la thioredoxine réductase (TrxR). L'évaluation de l'activité de la TrxR peut être utilisée comme marqueur du stress oxydant. En effet, en situation de stress oxydant, l'expression de la

thiorédoxine et de la TrxR est activée de façon à renforcer le statut antioxydant cellulaire global. Le dosage de l'activité de la TrxR a été réalisé selon la méthode dérivant de celle d'Ellman Riddles (Arner et al., 1999). Ce dosage est fondé sur la réduction du réactif d'Ellman (le DTNB) en TNB en présence de NADPH. L'activité de l'enzyme était déterminée en suivant l'augmentation de l'absorption du TNB à 405 nm.

1.2. Activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les effluents coronaires au cours du protocole d'IR

La LDH, utilisée comme marqueur de mort cellulaire, a été dosée à partir du recueil des effluents coronaires réalisé au cours du protocole d'IR. L'évaluation de son activité était effectuée à l'aide d'un kit de dosage spécifique (LDH-P, BIOLABO SA, France). Le principe repose sur la réaction, médiée par la LDH, du pyruvate avec le NAD pour former du lactate et du NADH. L'activité de la LDH était déterminée par spectrophotométrie suivant la disparition du NAD à 340 nm.

2. Production de NO au cours du protocole d'IR

La production de NO a été estimée à partir de l'évaluation de la concentration de dérivés nitrés (nitrites/nitrates) dans les effluents coronaires. La quantification des nitrites/nitrates dans ces effluents est en effet classiquement utilisée dans la littérature scientifique comme indice de la production de NO (Kobara et al., 2003 ; Bitar et al., 2005 ; Heinzl et al., 2008). Le dosage des nitrites totaux a été réalisé suivant la méthode de Griess après réduction des nitrates en nitrites (QuantiChrom Nitric Oxide Assay Kit (DINO-250)). La quantité de nitrite était déterminée par évaluation de l'absorbance à 540 nm.

3. Peroxydation lipidique myocardique

La peroxydation lipidique myocardique a été estimée à partir de la concentration tissulaire en substances réagissantes avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). Les tissus VG prélevés étaient homogénéisés dans 1 ml de solution d'acide trichloroacetic 0,1 % (TCA). L'homogénat était ensuite centrifugé à 12000 g pendant 15 min et 0.5 ml de surnageant était ajouté à 1 ml de solution à 0.5 % d'acide thiobarbiturique (TBA) et 20 % de TCA. La solution était incubée dans l'eau bouillante pendant 30 min, puis la réaction était stoppée en la plaçant dans un bain d'eau glacée. Les tubes étaient vortexés et 200 µl étaient placés dans une plaque 96 puits afin de lire l'absorbance du surnageant à 532 nm. La valeur d'absorption non spécifique à 600 nm était soustraite. La concentration de TBARS était ensuite calculée en utilisant un coefficient d'extinction de $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4. Western blots

4.1. Préparation des échantillons

Les échantillons tissulaires congelés étaient homogénéisés au potter, dans une solution tampon à 4°C (50 mM Tris-HCl, pH=6,7 ; 1 % SDS ; 10 % glycerol, inhibiteurs de la protéase (AEBSF 104 mM ; Aprotinine 80 µM ; Leupeptine 2 mM ; Bestatine 4 mM ; Pepstatin A 1.5 mM ; E-64 1.4 mM ; P8340 Sigma-Aldrich)).

4.2. Dosage des protéines

La méthode de l'acide bicinchonique (BCA) a été utilisée pour la quantification des protéines. Ce dosage est basé sur la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines et la réaction de ce dernier avec le BCA. Le complexe coloré BCA- Cu^+ formé présente une très forte absorbance à 562 nm, laquelle est linéaire avec l'augmentation des concentrations protéiques. Une gamme étalon d'albumine bovine était réalisée puis les échantillons étaient testés (100 μL d'échantillons pour 2 ml de réactif). Après 30 min d'incubation à 37°C avec le réactif kit de dosage BSA Pierce (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford IL), la densité optique était mesurée à 562 nm.

4.3. Western immunoblotting

Les échantillons étaient préparés avec du β -mercaptoethanol, bouillis pendant 5 min à 95°C puis, une quantité identique de protéines de chaque échantillon était placée sur le gel SDS-PAGE (gel à gradient de 4 – 20 % pour l'évaluation de l'expression des SERCA-2a et gel simple à 15 % pour l'évaluation de l'expression de TNF- α) et l'électrophorèse était réalisée. Un marqueur de poids moléculaire était mis à migrer simultanément avec les échantillons. Les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane en polyvinylidène difluoride (PVDF) par electroblotting dans un appareil de transblot « Bio-Rad transfer apparatus » (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Les membranes étaient placées à incuber dans une solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante (TBS 1X, 0.1 % Tween-20 et 3 % BSA). Ensuite, les membranes étaient incubées sous agitation avec l'anticorps primaire spécifique soit pendant 1 heure à température ambiante, soit toute la nuit à 4°C (TNF- α : 1/1000 ; SERCA-2a : 1/12500 ; GAPDH : 1/2000). Puis, l'anticorps

secondaire spécifique était mis au contact de la membrane 1 heure à température ambiante. Un système luminescent ECL (Pierce, Rockford, IL) était ensuite utilisé pour la mise en évidence autoradiographique. La photographie était scannée, puis l'intensité de chaque bande était quantifiée par le logiciel ImageJ (Image J, V1.28 image processing and analysis software from the National Health Institute, U.S.A.). La quantité de protéines était exprimée en fonction de la quantité de GAPDH.

4.4. Evaluation immuno-histologique de l'expression de iNOS cardiaque

Les cœurs étaient fixés durant un minimum de 24 heures dans la formaline (10 %, Sigma HT50) puis étaient coupés en tranches de 4 µm au microtome. Après avoir réalisé un déparaffinage et un démasquage antigénique (Dako S2031), un blocage des peroxydases endogènes était réalisé (Dako S2001). Les coupes étaient incubées avec l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C (iNOS ; 1/200) ; puis incubées 25 min avec l'anticorps secondaire biotinylé à température ambiante (Anti-mouse, anti-rabbit ; Dako (K5003)). Elles étaient ensuite incubées 25 min avec de la streptavidine peroxydase (Dako) et 6 min avec de l'AEC (substrat de la peroxydase). Les lames étaient enfin montées à l'eau (Faramount aqueous Dako (S3025)) et photographiées. L'expression de iNOS était évaluée par quantification colorimétrique à l'aide du logiciel ImageJ (Image J, V1.28 image processing and analysis software from the National Health Institute, U.S.A.).

VIII. Traitement statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm somme des erreurs standards (SEM). Le traitement statistique a été effectué à l'aide du logiciel Statview 5.0. (SAS institute Inc., Cary, NC, USA). Les différents paramètres évalués transversalement ont fait l'objet d'une analyse de variance factorielle (ANOVA à un facteur ou deux facteurs lorsque nécessaire). Les différents paramètres longitudinaux (pressions, débits coronariens...) ont été analysés à l'aide d'une ANOVA à mesures répétées. En cas d'interaction entre 2 facteurs, des tests *a posteriori* (test de Tukey-Kramer) ont été réalisés. La distribution des cœurs basée sur les scores d'arythmies a été analysée à partir du test non paramétrique de Mann-Whitney. Les variables réparties de façon binomiale ont été analysées à l'aide d'un test non paramétrique de comparaison des proportions dit du « Chi carré », corrigé pour la continuité par la méthode de Yates. Pour toutes les comparaisons statistiques réalisées dans ce travail, le risque d'erreur de 1^{ère} espèce α est fixé à 5 % et le degré de significativité est fixé à 5 % ($p < 0,05$).

Publications

Etude n°1

Aggravation des lésions cardiaques d'ischémie-reperfusion chez un modèle de rats exposés à une pollution de type citadine au CO

Am J Physiol Heart Circ Physiol 298: H1445–H1453, 2010.
First published March 5, 2010; doi:10.1152/ajpheart.01194.2009.

Simulated urban carbon monoxide air pollution exacerbates rat heart ischemia-reperfusion injury

G. Meyer,¹ L. André,² S. Tanguy,¹ J. Boissiere,² C. Farah,¹ F. Lopez-Lauri,⁴ S. Gayrard,¹ S. Richard,² F. Boucher,³ O. Cazorla,² P. Obert,¹ and C. Reboul¹

¹Research Laboratory: Equipe d'Accueil 4278, Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise, and ⁴Research Laboratory: Equipe d'Accueil 4279, Faculty of Sciences, Avignon University, Avignon; ²Research Laboratory: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 637, Cardiovascular Physiopathology, Montpellier University, Faculty of Medicine, Montpellier; and ³Research Laboratory: Unité Mixte de Recherche 5525 Physiologie cardio-Respiratoire Expérimentale Théorique et Appliquée-Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité, Grenoble University Joseph Fourier, Grenoble, France

Submitted 15 December 2009; accepted in final form 28 February 2010

I. Etude n°1

1. Résumé article 1

1.1. Contexte scientifique

Les effets cardiovasculaires du CO ont été fortement étudiés dans le cadre de travaux en toxicologie, toutefois peu d'études se sont intéressées aux effets d'une exposition chronique à de faibles concentrations de CO telles que retrouvées dans le cadre de pollutions urbaines. Quelques travaux récents ont cependant mis en évidence qu'une exposition prolongée à ce gaz, à des concentrations observées en milieu urbain, était à l'origine du développement d'un phénotype cardiomyocytaire pathologique (Bye et al., 2008 ; Andre et al., 2010). Celui-ci est caractérisé, chez une population de rats exposée à des faibles concentrations de CO, par une modification du statut redox cellulaire et une altération du couplage excitation-contraction expliquée notamment par des troubles de l'homéostasie calcique. Ce remodelage cellulaire pathologique, sans incidence fonctionnelle majeure au niveau de l'organe, est néanmoins discuté par les auteurs (Andre et al., 2010) comme étant un facteur important pouvant influencer la sensibilité du myocarde à un stress ischémique aigu (Myers et al., 1985 ; Steenbergen et al., 1987 ; Steenbergen et al., 1990 ; Steenbergen et al., 1993 ; Imahashi et al., 2005 ; Murphy et Steenbergen, 2008). Ainsi, l'objectif de cette étude n°1 était :

D'évaluer l'impact du remodelage phénotypique cellulaire, observé chez une population de rats exposés à une pollution de type citadine au CO, sur la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR ? Plus particulièrement, le travail a été axé sur l'implication potentielle de la surcharge calcique et du stress oxydant.

1.2. Méthodologie

Les rats sont répartis en 2 groupes expérimentaux. Un groupe est conservé en milieu sain et l'autre exposé durant 4 semaines 12 heures par jour à une pollution résiduelle de 30 ppm de CO complétée par 5 pics d'une heure à 100 ppm. Suite à cette période d'exposition, un protocole d'IR régionale sur cœur isolé perfusé de Langendorff est réalisé. Afin d'évaluer le rôle du Ca^{2+} intracellulaire sur la sensibilité du cœur à l'IR, un protocole d'A/R était également mis en oeuvre sur cardiomyocytes isolés chargés avec un indicateur calcique. Enfin, l'implication du stress oxydant est évaluée par incubation des cardiomyocytes avec de la N-acetylcystéine (NAC, 20 μ M) au cours du protocole d'A/R et par l'évaluation du statut enzymatique antioxydant.

1.3. Résultats majeurs

Ce travail montre pour la première fois qu'une exposition prolongée à de faibles concentrations de CO rend le cœur plus vulnérable à un accident ischémique aigu. En effet, les lésions de reperfusion sont plus marquées chez les rats CO comparés à leurs homologues exposés en environnement standard d'animalerie. Ceci est notamment caractérisé par une aggravation des arythmies de reperfusion et une augmentation de la mort cellulaire. Ce

résultat semble pouvoir être expliqué par le remodelage phénotypique cardiomyocytaire défavorable (diminution des défenses enzymatiques antioxydantes et altération de l'homéostasie calcique).

Les rats exposés pendant 4 semaines au CO sont plus sensibles à l'IR myocardique. La surcharge calcique diastolique et un stress oxydant plus important au cours de la reperfusion post-ischémique semblent pouvoir expliquer ce résultat.

2. Article n°1 :

Simulated urban carbon monoxide air pollution exacerbates rat heart ischemia-reperfusion injury

G. Meyer,¹ L. André,² S. Tanguy,¹ J. Boissiere,² C. Farah,¹ F. Lopez-Lauri,⁴ S. Gayrard,¹ S. Richard,² F. Boucher,³ O. Cazorla,² P. Obert,¹ and C. Reboul¹

¹Research Laboratory: Equipe d'Accueil 4278, Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise, and ⁴Research Laboratory: Equipe d'Accueil 4279, Faculty of Sciences, Avignon University, Avignon; ²Research Laboratory: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 637, Cardiovascular Physiopathology, Montpellier University, Faculty of Medicine, Montpellier; and ³Research Laboratory: Unité Mixte de Recherche 5525 Physiologie cardio-respiratoire Expérimentale Théorique et Appliquée-Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité, Grenoble University Joseph Fourier, Grenoble, France

Submitted 15 December 2009; accepted in final form 28 February 2010

Meyer G, André L, Tanguy S, Boissiere J, Farah C, Lopez-Lauri F, Gayrard S, Richard S, Boucher F, Cazorla O, Obert P, Reboul C. Simulated urban carbon monoxide air pollution exacerbates rat heart ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1445–H1453, 2010. First published March 5, 2010; doi:10.1152/ajpheart.01194.2009.—Myocardial damages due to ischemia-reperfusion (I/R) are recognized to be the result of a complex interplay between genetic and environmental factors. Epidemiological studies suggested that, among environmental factors, carbon monoxide (CO) urban pollution can be linked to cardiac diseases and mortality. The aim of this work was to evaluate the impact of exposure to CO pollution on cardiac sensitivity to I/R. Regional myocardial I/R was performed on isolated perfused hearts from rats exposed for 4 wk to air enriched with CO (30–100 ppm). Functional variables, reperfusion ventricular arrhythmias (VA) and cellular damages (infarct size, lactate dehydrogenase release) were assessed. Sarcomere length shortening and Ca²⁺ handling were evaluated in intact isolated cardiomyocytes during a cellular anoxia-reoxygenation protocol. The major results show that prolonged CO exposure worsens myocardial I/R injuries, resulting in increased severity of postischemic VA, impaired recovery of myocardial function, and increased infarct size (60 ± 5 vs. 33 ± 2% of ischemic zone). The aggravating effects of CO exposure on I/R could be explained by a reduced myocardial enzymatic antioxidant status (superoxide dismutase –45%; glutathione peroxidase –49%) associated with impaired intracellular Ca²⁺ handling. In conclusion, our results are consistent with the idea that chronic CO pollution dramatically increases the severity of myocardial I/R injuries.

environmental pollution; myocardial infarction; antioxidant status

MYOCARDIAL DAMAGES RESULTING from ischemia-reperfusion (I/R) are a major cause of morbidity and mortality in western nations. Those myocardial I/R injuries result in cardiac dysfunction, arrhythmias, as well as irreversible myocyte damages (25, 28). The sensitivity of the myocardium to I/R-induced cellular injuries is recognized today to be the result of a complex interplay between genetic, pathological, and environmental factors. Moreover, it appears to be aggravated in several diseases, including hypertension, metabolic disorders, and complications from cigarette smoking and environmental pollution.

Address for reprint requests and other correspondence: C. Reboul, Research Laboratory: EA 4278, Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise, Faculty of Sciences, Avignon Univ., F-84000 Avignon, France (e-mail: Cyril.reboul@univ-avignon.fr).

Among the environmental factors that could influence the development of cardiovascular diseases, several epidemiological studies have recently suggested that urban atmospheric pollution may exert adverse effects on cardiovascular health (7, 11, 12, 15). Among the numerous pollutants, carbon monoxide (CO) has been described as one of the main pollutants responsible for the development of cardiovascular diseases (9, 35). In urban environments, CO concentration usually varies from 2 to 40 ppm, but during heavy traffic it may be as high as 170 ppm (10, 34, 40). At this level, CO exposure has been correlated with hospital admissions, mortality, and morbidity related to cardiovascular diseases (9, 13, 29). Today, although the pathophysiological mechanisms regarding acute CO poisoning are well known, mechanisms associated with chronic exposure to lower concentrations of CO, consistent with urban environmental pollution, remain unclear. We (2) and Bye et al. (14) have recently reported that prolonged CO exposure induces a pathological myocardial cellular phenotype characterized by a major remodeling of the excitation-contraction coupling. Such deleterious consequences may worsen the effect of cardiovascular diseases.

The aim of this experimental work was to challenge the impact of a chronic exposure to simulated CO urban pollution on the sensitivity of the myocardium to I/R in a rat model. The major result shows that prolonged exposure to CO at a level found in the urban environment has a dramatic deleterious impact on the sensitivity of the myocardium to I/R.

METHODS

Experiments complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the United States National Institutes of Health (National Institutes of Health Publications no. 85-23, revised 1996) and was approved by the French Ministry of Agriculture.

Animals and CO Exposure

Adult, male Wistar rats ($n = 64$; 345 ± 7 g; Charles River Laboratories) were randomly assigned to the following two groups: CO rats (exposed for 4 wk to simulated CO urban pollution, $n = 32$) and control animals (Ctrl rats, exposed to standard filtered air, $n = 32$). CO rats were housed in an airtight exposure container for 4 wk. Exposure was performed according to a 12:12-h CO in the air-ambient air cycle. To simulate CO urban pollution, exposure was performed as follows: during CO exposure, a CO concentration of 30 ppm was maintained in the airtight container and monitored with an aspirative CO analyzer (CHEMGARD Infrared Gas Monitor NEMA 4 Version;

MSA). This initial concentration was supplemented with five 1-h peaks at 100 ppm CO. During ambient air exposure, animals were placed in the laboratory animal house with a CO concentration of 0 ppm. Ctrl rats were confined in the laboratory animal house for 4 wk and were manipulated daily. At the end of the 4-wk CO exposure, rats were housed 24 h in standard filtered air to avoid the acute effects of CO on the myocardium.

Regional Myocardial Ischemia and Reperfusion on Isolated Perfused Rat Heart

Rats were anaesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg ip). A thoracotomy was performed, and the heart was rapidly removed, by cutting the great vessels, and immersed in ice-cold Krebs solution. The heart was transferred to the perfusion apparatus, and the aorta was cannulated for perfusion with oxygenated (95% O₂-5% CO₂) Krebs solution (37°C) composed of (in mM) 118.3 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 11.1 glucose, and 2.5 CaCl (pH = 7.4). The hearts were perfused at a constant pressure (80 mmHg).

Evaluation of postischemic reperfusion injury. On a first set of rats ($n = 8$ /group), the atrioventricular node was crushed using fine forceps, the right atrium was excised, and the hearts were paced at a rate of 300 beats/min with an electrical stimulator (low voltage stimulator, BSL MP35 SS58L, 3V). An ultrathin, water-filled balloon was inserted in the left ventricle via the mitral valve, and the balloon volume was adjusted to achieve a left ventricular (LV) end diastolic pressure of 5 mmHg. Coronary blood flow was measured by collection of the infiltration effluents. A suture on a round-bodied needle was placed around the left anterior descending coronary artery (LAD), and the suture ends were placed around a small length of tubing to form a snare. The heart was allowed to stabilize for 30 min. Following the stabilization period, the LAD was occluded for 30 min. Subsequently, the snare occluder was released to allow reperfusion of the previously ischemic vascular bed for 120 min. The LAD was then reoccluded, and Evans blue dye solution (5 ml, 2%) was injected in the left ventricle to allow perfused (stained blue) and nonperfused (unstained) areas of the heart to be distinguished. After removal of the hearts, it was divided into five slices perpendicular to the apex-base axis. Triphenyltetrazolium chloride staining (0.5 mg/ml for 20 min at 37°C) was used to assess myocardial tissue viability and to determine myocardial infarct size. Tissue slices were photographed, and area at risk and infarcted area were then determined using a computer-based system (ImageJ; NIH).

Evaluation of postischemic reperfusion-induced ventricular arrhythmias. On a second set of rats ($n = 14$ /group), arrhythmic events were evaluated on isolated nonpaced hearts. The heart was mounted, and the LAD occlusion was performed as previously described. A computerized electrocardiogram was obtained continuously during the protocol. The various types of arrhythmias were defined as described in the Lambeth conventions (39). The analysis of the electrocardiogram enabled assessment of the incidence (percent no. of hearts exhibiting a given type of arrhythmia) of different types of ventricular arrhythmias (Fig. 1A) as follows: sinus rhythm, ventricular premature beats (VPB), ventricular tachycardia (VT), and ventricular fibrillation (VF). To allow the comparison of the severity of rhythm disturbances occurring upon reperfusion, each individual heart was characterized according to a five-point arrhythmic score previously described by Tanguy et al. (37) and designed so that the more severe the arrhythmia, the larger the number (Fig. 1B). Such a simplified scoring system allows the assignment of a single number to each heart, and the comparison of the distribution of the hearts by various scores.

Cardiomyocyte Excitation-Contraction Analysis After Cellular Anoxia-Reoxygenation

On a third set of rats ($n = 4$ /group), single ventricular cardiomyocytes were isolated by enzymatic digestion as previously described (24). Cardiomyocytes were transferred to a glass petri dish and placed

in an anoxic chamber (O₂ level ~2%) for 60 min, followed by a 60-min reoxygenation in ambient air (O₂ ~19.4%). Unloaded cell shortening and Ca²⁺ concentration (indo 1 dye) were measured using field stimulation (0.5 Hz, 22°C, 1.8 mM external Ca²⁺) before and after anoxia-reoxygenation (A/R). Sarcomere length (SL) and fluorescence (405 and 480 nm) were recorded simultaneously (IonOptix system; Hilton). The A/R experiment was then carried out in the presence or absence of a nonspecific antioxidant [*N*-acetylcysteine (NAC), 20 μM].

Biochemical Assays

Heart antioxidant enzyme activity. A fourth set of rats ($n = 6$ /group) was used to evaluate the enzymatic antioxidant status of the myocardium consecutive to chronic CO exposure and before I/R. After the end of CO exposure (24 h), the hearts were freeze-clamped, and the frozen ventricular tissue was homogenized in Tris-HCl buffer (60 mM Tris-HCl and 1 mM diethyltriaminopentaacetic acid, pH 7.4, 10 ml/g wet wt) using a Teflon potter homogenizer. Tissue homogenates were then centrifuged for 10 min at 200 g at 4°C to remove all nuclear debris. Cardiac superoxide dismutase (SOD) activity was assessed in the supernatant according to the method described by Marklund (22). Cardiac glutathione peroxidase (GPx) activity was assessed spectrophotometrically on the cytosolic fraction according to the method described by Flohe and Günzler (18). Catalase activity was determined according to the method described by Beers and Sizer (8). All enzyme activities were expressed in units per milligram protein (U/mg protein). The modified method of Lowry et al. (21) was used to determine protein content of tissue homogenates, using BSA as standard.

Lactate dehydrogenase in coronary effluents. Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in coronary effluents by spectrophotometry using an LDH kit (LDH-P; BIOLABO). Measurements were made at the end of stabilization and at 10, 30, and 60 min of reperfusion. LDH activity was normalized to coronary blood flow.

Thiobarbituric acid-reactive substances in LV tissues. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were assessed in LV tissues after 30 min of reperfusion using the thiobarbituric acid (TBA) test. Frozen heart tissue (120 mg) was homogenized in 1 ml 0.1% TCA solution. The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 15 min, and 0.5 ml of the supernatant was added to 1 ml of 0.5% TBA in 20% TCA. The mixture was incubated in boiling water for 30 min, and the reaction was stopped by placing the reaction tubes in an ice bath. Tubes were briefly vortexed, triplicate 200-μl aliquots were taken from each tube and placed in 96-well plates, and the supernatant absorbance was read at 532 nm in a microplate reader. The value for nonspecific absorption at 600 nm was subtracted. The amount of TBARS (red pigment) was calculated using an extinction coefficient of 155 mM⁻¹·cm⁻¹.

Statistics

Data were analyzed using one-way ANOVA between groups and repeated-measures ANOVA when necessary. When significant interactions were found, a Tukey-Kramer test was applied. The distribution of the hearts based on the various arrhythmic scores was analyzed by a nonparametric Mann-Whitney *U*-test. Binomially distributed variables (such as incidence of VF) were analyzed using nonparametric Yates' chi square test (Statview; Adept Scientific, Letchworth, UK). A level of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data are expressed as group means or group mean fractions of baseline ± SE.

RESULTS

Effects of CO Exposure on Myocardial Reperfusion Ventricular Arrhythmias

The time course of reperfusion-induced VPB, VT, and VF in individual hearts is shown in Fig. 1C. Figure 1D shows a

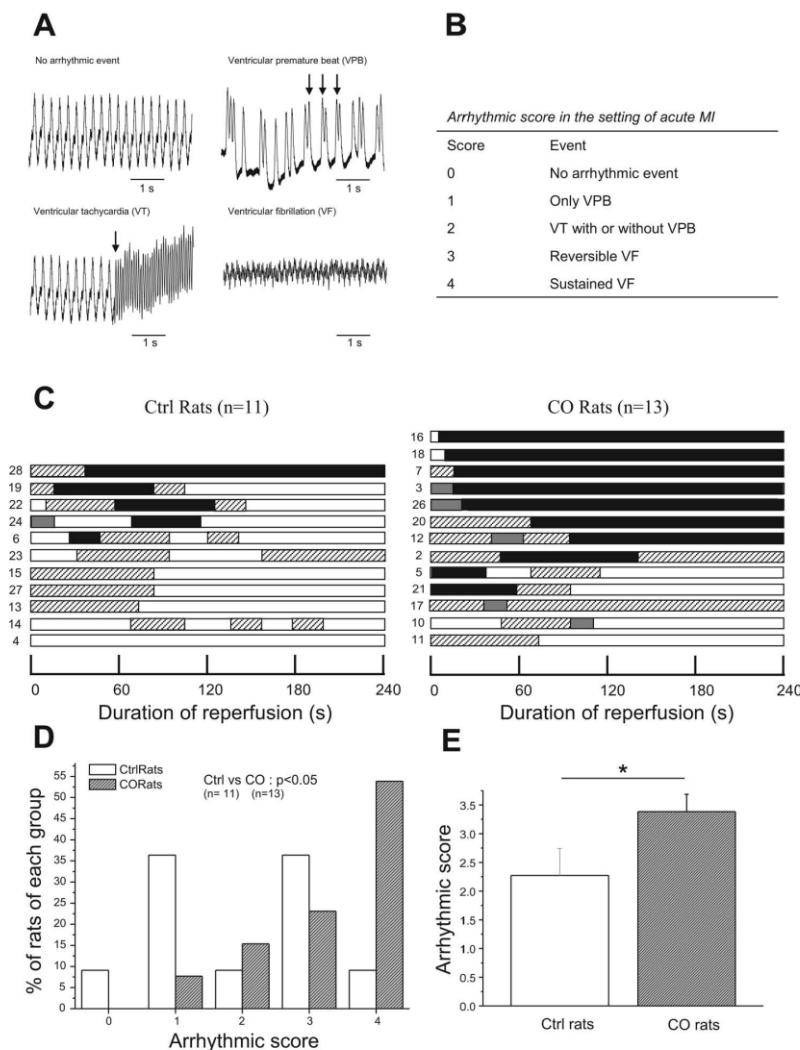


Fig. 1. Effects of carbon monoxide (CO) exposure on the severity of posts ischemic reperfusion-induced arrhythmic events. Electrocardiographic recordings (A) of normal sinus rhythm and of arrhythmias identified during posts ischemic reperfusion as described in the Lambeth Convention [sinus rhythm, ventricular premature beat (VPB), ventricular tachycardia (VT), and ventricular fibrillation (VF)] and related arrhythmic scores (B). C: time course of reperfusion-induced VPB (crossed out bars), VT (gray bars), and VF (black bars) of each heart of the control (Ctrl) group (left) and CO (right) group (nos. on left refer to the order of the experiments). D: categorization of arrhythmia classes (score) according to B. Values are expressed as a percentage of the total no. of hearts for each group (Ctrl rats $n = 11$, CO rats $n = 13$, distribution was tested using nonparametric Mann-Whitney's test, Ctrl vs. CO rats: $P < 0.05$). MI, myocardial infarction. E: effects of CO exposure on mean arrhythmic score (data are presented as means \pm SE, Ctrl rats $n = 11$, CO rats $n = 13$, one-way ANOVA, $*P < 0.05$, Ctrl vs. CO rats).

significant difference in the distribution of the arrhythmic scores observed in both experimental groups. According to the increased mean arrhythmic score observed in CO rats during reperfusion, the arrhythmia severity was higher in CO rats compared with Ctrl rats (Fig. 1E). Moreover, sustained VF were triggered more frequently in the CO rats compared with Ctrl rats (54 vs. 9%, $P < 0.05$ nonparametric Yates' chi square test).

Effects of CO Exposure on Posts ischemic Recovery of Myocardial Function

Any difference regarding cardiac function was reported between CO and Ctrl rats before ischemia (Table 1). Posts ischemic recovery of LV developed pressure and contractility, assessed during reperfusion, was significantly lower in CO rats compared with Ctrl (Fig. 2). Indeed, the posts ischemic recovery

of LV developed pressure, $+dP/dt_{max}$, and $-dP/dt_{max}$ were significantly altered in the CO rats compared with Ctrl rats (Fig. 2, A-C).

These functional results were paired with some deleterious effects of CO exposure on posts ischemic myocardial coronary blood flow recovery (Fig. 2D). Indeed, although no difference in coronary blood flow was reported between CO and Ctrl rats before ischemia (Ctrl rats: 11.5 ± 0.9 ml/min vs. CO rats: 11.8 ± 1.4 ml/min), coronary blood flow was significantly lower in CO rats compared with Ctrl rats during reperfusion.

Effects of CO Exposure on Myocardial Posts ischemic Reperfusion-Induced Cellular Death

The deleterious effects of CO exposure on I/R-induced injury were characterized by an increase in myocardial infarct

H1448

CO POLLUTION AND MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION

Table 1. Myocardial function during regional ischemia-reperfusion protocol in Ctrl and CO rats

	LVDP, mmHg	+dP/dt _{max} , mmHg/s	-dP/dt _{min} , mmHg/s
Baseline			
Ctrl rats	91.79 ± 7.47	3,365 ± 304	-1,944 ± 123
CO rats	93.85 ± 12.11	2,932 ± 369	-1,994 ± 219
30 min of Ischemia			
Ctrl rats	65.50 ± 4.82	2,304 ± 487	-1,447 ± 199
CO rats	53.29 ± 5.66	1,757 ± 240	-1,111 ± 162
5 min of Reperfusion			
Ctrl rats	61.28 ± 3.05	2,169 ± 318	-1,255 ± 103
CO rats	41.86 ± 3.61*	1,372 ± 276*	-902 ± 131*
30 min of Reperfusion			
Ctrl rats	63.31 ± 5.15	2,376 ± 331	-1,344 ± 114
CO rats	43.71 ± 5.66*	1,541 ± 364*	-887 ± 216*
60 min of Reperfusion			
Ctrl rats	50.99 ± 1.85	1,996 ± 320	-1,063 ± 81
CO rats	36.10 ± 6.62*	1,332 ± 365	-761 ± 115*
90 min of Reperfusion			
Ctrl rats	43.54 ± 1.33	1,747 ± 376	-920 ± 120
CO rats	31.78 ± 9.76	1,203 ± 331	-703 ± 121
120 min of Reperfusion			
Ctrl rats	39.85 ± 2.52	1,609 ± 258	-832 ± 110
CO rats	24.52 ± 5.91*	1,028 ± 237*	-570 ± 169*

Values are means ± SE; LVDP, left ventricular developed pressure; +dP/dt_{max}, maximal derivative of left ventricular pressure; -dP/dt_{min}, minimal derivative of left ventricular pressure; Ctrl rats, rats exposed to filtered standard air; CO rats, rats exposed to carbon monoxide. **P* < 0.05 vs. Ctrl rats.

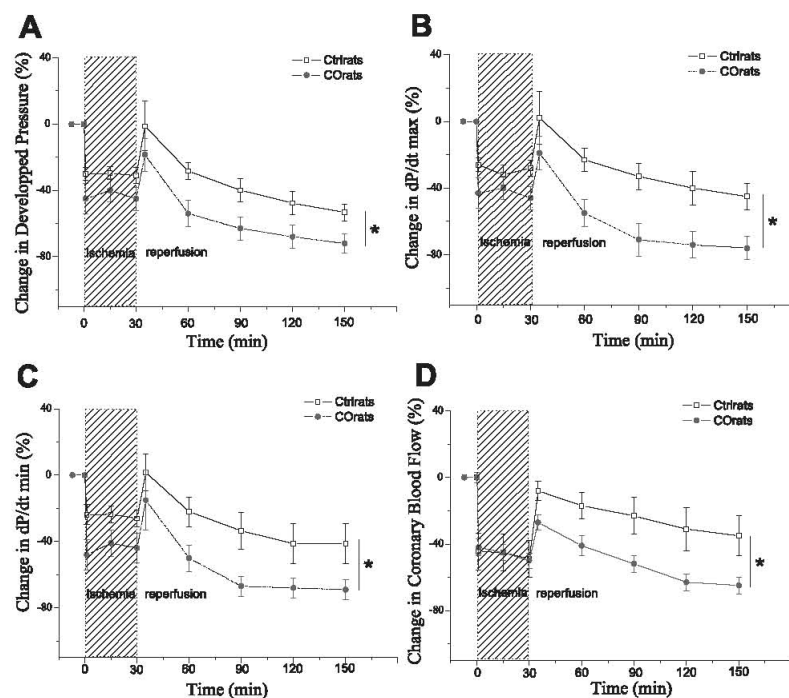
size in CO rats compared with Ctrl rats (Fig. 3, A and B). Indeed, no difference regarding the risk zone (ischemic zone) was observed between CO and Ctrl rats after 120 min of reperfusion. However, the infarct size was markedly increased

in CO rats (60 ± 5 vs. 33 ± 2% of the risk zone; *P* < 0.05). LDH released in coronary effluents, used as an index of cell death, was significantly augmented at the onset of reperfusion in both Ctrl and CO rats (1.91 ± 0.30 to 5.84 ± 1.45 U/min for Ctrl rats; 2.69 ± 0.54 to 14.26 ± 3.20 U/min for CO rats; *P* < 0.05). Moreover, the peak of LDH release at the onset of reperfusion was significantly higher in CO rats than in Ctrl rats. Finally, LDH release remained significantly higher in CO rats after 30 and 60 min of reperfusion. No difference regarding LDH release was observed during the stabilization period (Fig. 3C). LV TBARS concentration was significantly increased in CO compared with Ctrl rats after 30 min of reperfusion (6.43 ± 0.76 vs. 4.40 ± 0.35 nmol/g; Fig. 3D).

Effects of CO Exposure on Cardiomyocyte Excitation-Contraction Coupling Before and After A/R

At the cellular level, prolonged CO exposure induced impairments of ventricular myocyte function (Fig. 4). Indeed, before A/R, SL shortening (Fig. 4, A and B) as well as Ca²⁺ transient (Fig. 4, C and D) were significantly impaired in CO rats compared with Ctrl rats. In addition, diastolic cytosolic Ca²⁺ was markedly higher in CO compared with Ctrl rats (Fig. 4E). Consecutively to A/R, SL shortening was decreased in both groups (Fig. 4, A and B) and remained significantly lower in CO compared with Ctrl rats. This decreased SL shortening was associated with a decreased Ca²⁺ transient in both groups consecutive to A/R. It is of note that Ca²⁺ transient from CO rats remained lower than Ca²⁺ transient from Ctrl rats (Fig. 4, C and D). Following A/R, diastolic Ca²⁺ increased in the two experimental groups; however, for this parameter, statistical significance was reported only in Ctrl rats. Consequently,

Fig. 2. Effects of CO exposure on the time course of changes in left ventricular function parameters during a 30-min ischemia and 120 min of reperfusion. Change in left ventricle developed pressure (A), maximal (+dP/dt_{max}, B), and minimal (-dP/dt_{min}, C) derivative of left ventricular pressure over time, and coronary blood flow (D). Data are presented as mean fraction of baseline ± SE (*n* = 6 rats/group, repeated-measures ANOVA, **P* < 0.05, Ctrl vs. CO rats).



AJP-Heart Circ Physiol • VOL 298 • MAY 2010 • www.ajpheart.org

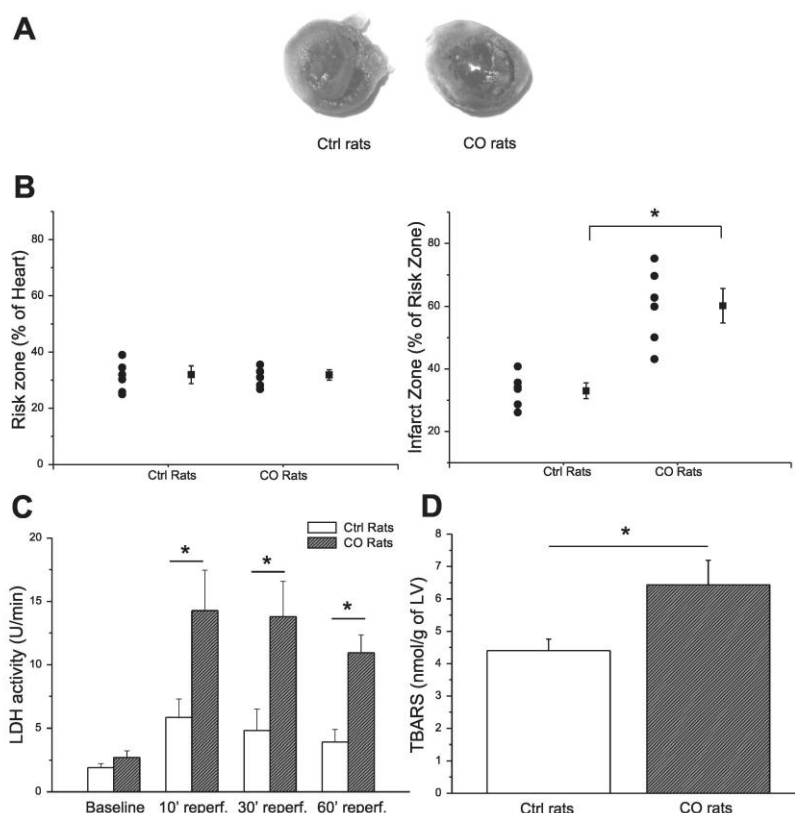


Fig. 3. Effects of CO exposure on I/R-induced cellular death. *A*: representative sections of rat hearts stained with triphenyltetrazolium chloride (TTC) after a regional ischemia of 30 and 120 min reperfusion from the isolated heart experiments in Ctrl and CO rats. *B*: risk zone expressed as a percentage of heart area (*left*) and infarct zone expressed as a percentage of risk zone (*right*). Data are presented as means \pm SE ($n = 6$ /group, one-way ANOVA, $*P < 0.05$, Ctrl vs. CO rats). *C*: lactate dehydrogenase (LDH) release in coronary effluents during stabilization and reperfusion, and used as a marker of cell death. *D*: thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) concentration in left ventricular (LV) tissues after 30 min of postischemic reperfusion, and used as a marker of lipid peroxidation. Data are presented as means \pm SE ($n = 6$ rats/group, repeated-measures ANOVA, $*P < 0.05$, Ctrl vs. CO rats).

following A/R, no difference was observed concerning intracellular diastolic Ca^{2+} between Ctrl and CO rats (Fig. 4E).

Following A/R, the incubation of NAC (a nonspecific antioxidant) reduced the impairment of cardiac cell contraction in both Ctrl and CO rats. In addition, NAC infusion partly blunted the higher sensitivity of CO rat cardiomyocytes to A/R, since in this condition no difference was reported between Ctrl and CO groups regarding SL shortening (Fig. 5A). As far as the alterations of Ca^{2+} handling are concerned, the incubation of NAC improved Ca^{2+} transient in both Ctrl and CO rats. However, the difference between the two experimental populations was still reported (Fig. 5B). Finally, diastolic cytosolic Ca^{2+} was significantly reduced in CO rat cardiomyocytes in the presence of NAC compared with the corresponding controls (Fig. 5C). In the presence of NAC, no difference was reported regarding this variable between Ctrl and CO rats.

Effects of CO Exposure on Myocardial Antioxidant Enzyme Activity

In CO rats, following 4 wk of exposure to simulated urban CO pollution, cardiac SOD and GPx activities were significantly lower compared with Ctrl rats (Fig. 6, A and B). No significant change in catalase activity was observed in this model of CO exposure (Fig. 6C).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, our study is the first to investigate the effects of prolonged exposure to simulated urban environmental CO pollution on myocardial sensitivity to I/R. The major result is that prolonged exposure to simulated urban CO pollution worsens myocardial I/R injuries, promoting a major increase in the severity of arrhythmic events, an impairment of myocardial function observed at both global and cellular levels, and an increase in the infarct size. These phenomena could be mainly related to hidden effects of CO exposure on myocardial phenotype, including 1) an impairment of cellular Ca^{2+} handling and 2) an altered antioxidant status of the myocardium.

CO Exposure and Myocardial I/R

Eventhough CO urban pollution has been associated with increased cardiovascular disease and cardiac mortality (9, 13, 29), we demonstrate here that chronic CO exposure renders the heart more vulnerable to I/R. Previous experimental studies have only documented the effect of acute CO exposure or to CO-releasing molecules used as preconditioning strategies to protect the myocardium against I/R injury (3, 6, 19). It was also reported that endogenous CO production could protect the heart from I/R injuries. These beneficial effects of endogenous

H1450

CO POLLUTION AND MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION

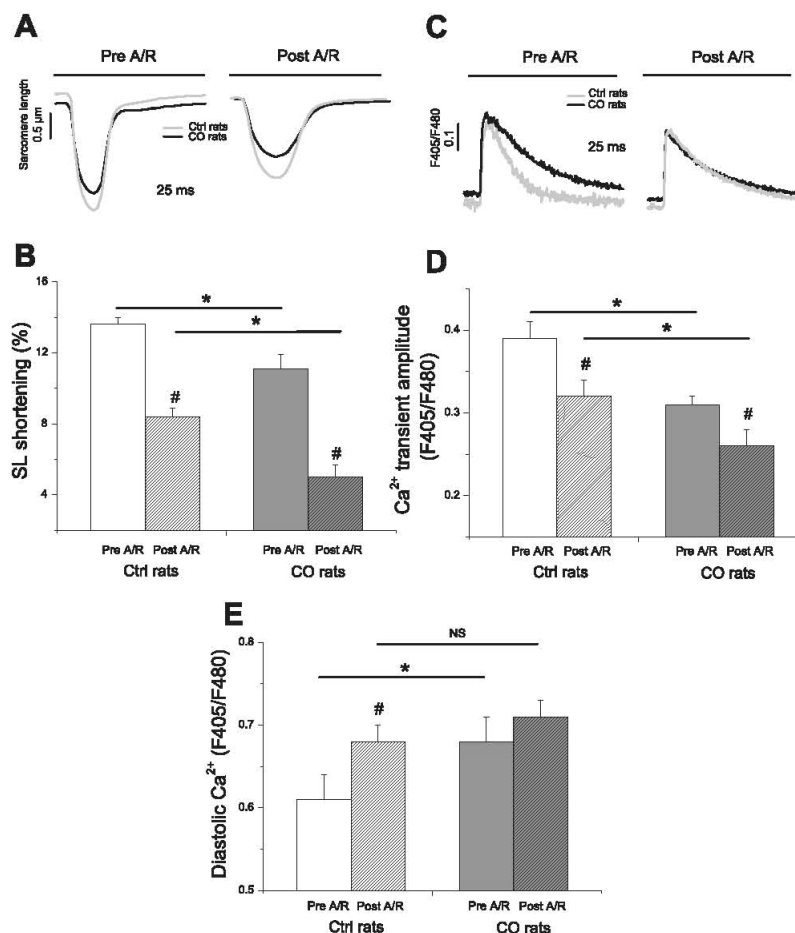


Fig. 4. Effects of CO exposure on cardiomyocyte excitation-contraction before and after cellular anoxia-reoxygenation (A/R). *A*: representative contraction of intact myocytes. *B*: contraction of intact myocytes, measured by sarcomere length (SL) shortening. SL shortening is presented as a mean of the percentage of shortening \pm SE [$n = 4$ rats/group, 2-way ANOVA; $P < 0.05$, pre-A/R vs. post-A/R (#) and Ctrl vs. CO rats (*)]. *C*: representative superimposed Ca²⁺ transients in intact myocytes. Ca²⁺ transients (*D*) and diastolic Ca²⁺ (*E*) in intact myocytes. Ca²⁺ transients and diastolic Ca²⁺ are presented as means \pm SE [$n = 4$ rats/group, 2-way ANOVA; $P < 0.05$, pre-A/R vs. post-A/R (#) and Ctrl vs. CO rats (*)]. NS, not significant.

CO production during I/R could be because of a decrease in oxidative stress (26), an enhanced Ca²⁺ handling (36), and CO anti-inflammatory and anti-apoptotic properties (20), which may ultimately lead to a decrease in I/R-induced VF (4, 5). In our model, no difference regarding cardiac function and coronary blood flow was evidenced between Ctrl and CO rats before I/R. Remarkably, only postischemic reperfusion allowed us to distinguish the hearts of CO-exposed rats from those of Ctrl rats, thereby pointing out the deleterious effect of CO. These results are in line with our previous study (2), which exhibited no difference of cardiac function in the basal condition but highlighted functional impairments in CO rats in stressful conditions (i.e., β -adrenergic stimulation). Therefore, discrepancies between our results and studies reporting the protective role of CO exposure could be explained by differences in the duration and severity of CO exposure (3, 6, 19). In our model, CO rats experimented a chronic (4 wk with 12 h daily exposure) CO exposure mimicking urban concentrations (30–100 ppm). In addition, it has to be noted that, in our model, to avoid the acute effects of CO on the myocardium, rats were housed for 24 h in standard filtered air before I/R

study. Therefore, under our experimental conditions, no difference of carboxyhemoglobin was made obvious between Ctrl and CO rats at the time of the I/R procedure (carboxyhemoglobin 24 h after exposure, CO rats: $1.2 \pm 0.4\%$ vs. Ctrl rats $1.0 \pm 0.5\%$; not significant).

Effects of CO Exposure on Postischemic Myocardial Injuries

The higher susceptibility of the myocardium to I/R in CO-exposed rats was notably characterized by higher propensity to arrhythmic events at the onset of reperfusion. Higher arrhythmic score and higher occurrence of sustained VF (54 vs. 9%) were evidenced. Arrhythmias, and more particularly sustained VF, are the most dangerous consequences of myocardial I/R, since they induce an impairment of blood circulation and ultimately lead to sudden cardiac death. Sheps et al. (31, 32) have already highlighted the proarrhythmic effect of CO exposure (1 day at 100 or 200 ppm) in patients with documented coronary artery diseases. However, as mentioned above, in our model, no difference of carboxyhemoglobin was reported between Ctrl and CO rats

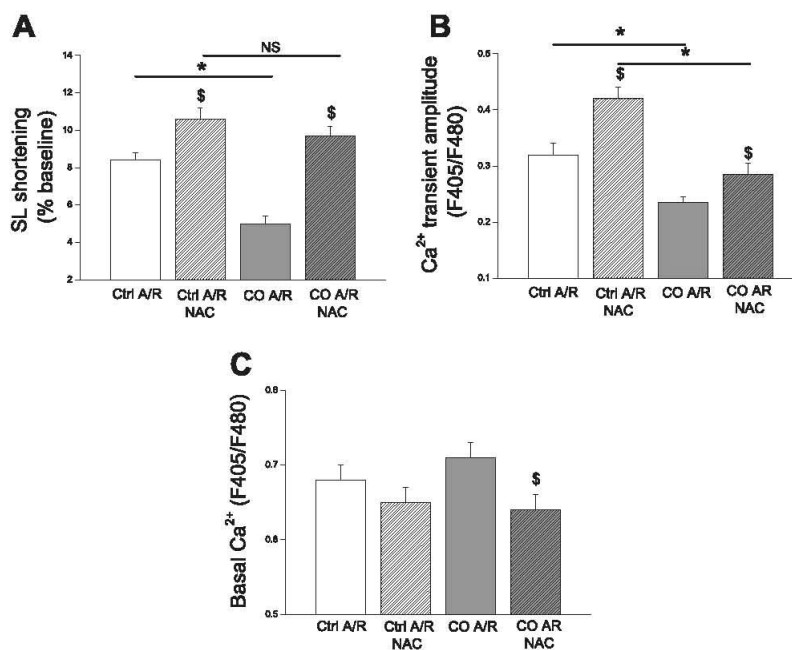


Fig. 5. Effects of *N*-acetylcystein (NAC) incubation on the sensitivity to A/R of cardiomyocytes from Ctrl and CO rats. *A*: contraction of intact myocytes, measured by SL shortening. SL shortening is presented as a mean of the percentage of shortening \pm SE. *B* and *C*: Ca²⁺ transients (*B*) and (*C*) diastolic Ca²⁺ (*C*) in intact myocytes. Ca²⁺ transients and diastolic Ca²⁺ are presented as means \pm SE [$n = 4$ rats/group, 2-way ANOVA; $P < 0.05$, with NAC vs. without NAC (\$) and Ctrl vs. CO rats (*)].

at the time of the I/R procedure, avoiding then the acute effects of CO on the myocardium. In CO rats, the higher sensitivity of the myocardium was also characterized by an impairment of postischemic recovery of myocardial function. This could be related to the significantly impaired cellular contractile function observed, consecutive to A/R, on isolated cardiomyocytes of CO rats compared with Ctrl rats. This result suggests that cardiomyocyte damages lead to a reduced postischemic recovery of cardiac function. It seems, however, that the main factor involved in the explanation of this result was that CO pollution is associated, in our model, with a marked increase of I/R-induced cardiac cell death. I/R injuries, including cardiomyocyte impairments as well as arrhythmic events, were mainly explained, in past literature, by increased oxidative stress and Ca²⁺-handling alteration (25, 41).

Implication of Ca²⁺ and Oxidative Stress

The increased sensitivity to I/R of the myocardium after CO exposure was characterized by the increase of arrhythmic events, increased functional disturbances, and cell death. The cellular mechanisms underlying these aspects of the reperfusion syndrome may involve impairments of Ca²⁺ handling or overproduction of oxygen-derived free radicals. In a recent study, we have shown that CO pollution by itself initiates a pathological phenotype of the cardiomyocytes involving a profound remodeling of the excitation-contraction coupling through Ca²⁺-handling alteration (2), which was confirmed in the present work. This remodeling was characterized by an impairment of cardiomyocyte shortening that was not observed at the whole heart level. This phenomenon, which has already been reported by our team, may involve compensatory mechanisms (2) that remain to

be investigated. The cardiomyocytes also exhibit an increase in diastolic Ca²⁺ resulting from an altered Ca²⁺ reuptake in the sarcoplasmic reticulum (SR) due to a decreased sarco-(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 2a expression and also potentially from a Ca²⁺ leak from the SR through the ryanodine receptors (2). Alterations of Ca²⁺ handling may be involved in cardiomyocyte dysfunction and ultimately in cell death during I/R (1, 33, 38). It is therefore very likely that these alterations, associated with CO exposure, increase the severity of cardiomyocytes and whole heart injuries related to I/R. Indeed, in our study, at the whole heart level, CO exposure increases cardiomyocyte death after I/R. Considering only viable myocytes, we report here that SL shortening and Ca²⁺ handling are altered by A/R to the same extent in both Ctrl and CO rats, resulting therefore in more pronounced dysfunctions in CO rats compared with Ctrl rats. Therefore, it seems that Ca²⁺ handling in viable cardiomyocytes was not more impaired by A/R in CO rats, but that the lower amplitude of Ca²⁺ transient reported in this population following A/R was the result of prolonged CO exposure-induced phenotypical changes. Consequently, a major finding of the present study was that the impaired Ca²⁺ handling observed before to A/R is a key factor in the development of functional impairments and arrhythmic events observed at the onset of reperfusion in CO rats and is therefore a candidate to explain higher sensitivity of CO rat myocardium to I/R.

The essential role of oxidative stress in the pathogenesis of myocardial I/R injury has been largely reported (16, 30, 41). Indeed, exacerbated oxidative stress during I/R is a key factor in the worsening of postischemic arrhythmias, cardiac dysfunction, and irreversible cardiomyocyte damages (16, 17, 25, 41). Oxidative stress is defined as an imbalance between the pro-

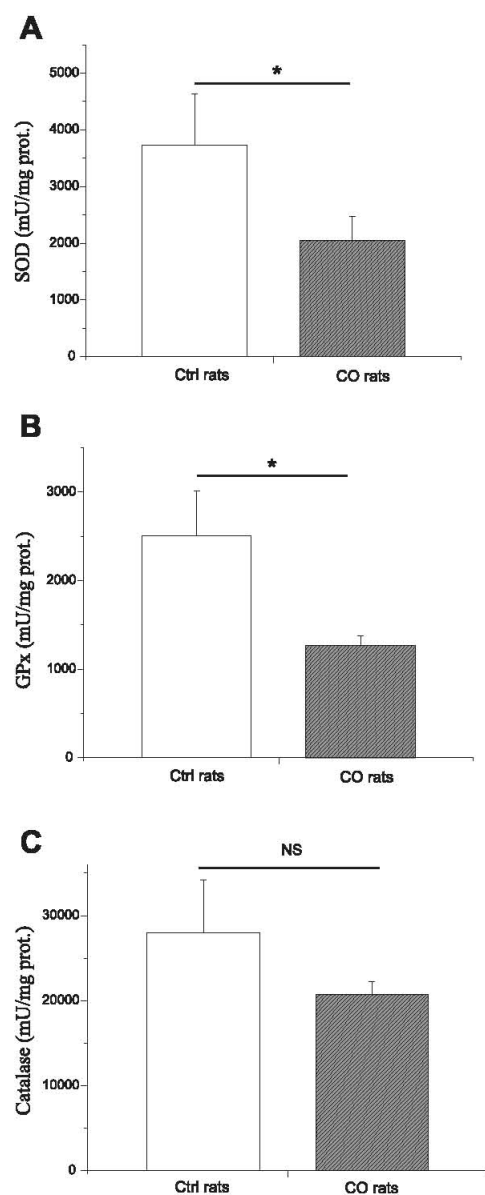


Fig. 6. Effects of CO exposure on superoxide dismutase (SOD, *A*), glutathione peroxidase (GPx, *B*), and catalase (*C*) activities expressed in mU/mg protein. Data are presented as means \pm SE ($n = 6$ rats/group, 1-way ANOVA, $*P < 0.05$, Ctrl vs. CO rats).

duction of reactive oxygen species and biological antioxidant systems that are involved in the detoxification of reactive intermediates. An important result of our study is the impaired enzymatic antioxidant status of the myocardium, including a major decreased activity of SOD (-45%), GPx (-49%), and catalase (-26% , not statistically significant). We previously discussed the potential role of altered redox status of the

myocardium to explain the effects of prolonged exposure to CO on excitation-contraction coupling (2). Indeed, since proteins involved in Ca^{2+} handling are potential targets for redox alterations, decrease of antioxidant defenses associated with the increased activity of thioredoxin reductase observed in our previous study (2) confirmed a CO-induced oxidative stress. Therefore, those alterations of enzymatic antioxidant defense could play a major role in phenotypical changes of CO-exposed rat myocardium, mainly affecting Ca^{2+} homeostasis. Besides, SOD prevents changes in myocardial function, and Ca^{2+} homeostasis in isolated hearts subjected to I/R (27), catalase, and GPx plays a major role in protecting the myocardium from I/R injury (16). We have observed an increase in TBARS production, used as a marker of lipid peroxidation, and therefore oxidative stress, in CO-exposed rats following I/R. Therefore, we can postulate that the lower enzymatic antioxidant defense that was observed consecutively to CO exposure could contribute to the increased sensitivity of the myocardium to I/R damages. To prevent oxidative stress-induced alterations, an acute antioxidant strategy, using a nonspecific antioxidant (NAC), was performed during cellular A/R. This acute antioxidant strategy was found able to prevent the deleterious effects of CO exposure on SL shortening during A/R. This result highlights the implication of an increased cardiac oxidative stress in our model of CO-exposed rats. However, the deleterious effects of CO exposure on Ca^{2+} transient were not prevented by this acute antioxidant strategy. This observation is not surprising, since prolonged exposure to CO pollution results in phenotypical remodeling of Ca^{2+} -handling proteins, such as decreased SERCA2a expression (2). This profound remodeling of the Ca^{2+} -handling phenotype, which was reported in CO rat myocardium, could not be reversed by such an acute antioxidant strategy. Therefore, chronic antioxidant therapy, notably by preventing myocardial phenotypical changes, could be a promising strategy for protecting the heart against the deleterious effects of chronic CO exposure on myocardial sensitivity to I/R.

In conclusion, this study shows that chronic exposure to CO consistent with air pollution from the urban type significantly increases the effects of a myocardial infarction in rats and could be considered as a major health risk. Indeed, the World Health Organization estimates that air pollution is responsible for 800,000 premature deaths worldwide each year, and, particularly, exposure to air pollution increases the risk of mortality from cardiovascular disease by 76% (23). Among the numerous pollutants, CO has been described as one of the main pollutants responsible for the development of cardiovascular diseases (9, 35). Prolonged CO exposure worsens I/R-linked cardiac injuries and therefore provides an experimental rationale to explain the increased risk of cardiac mortality observed in exposed populations. In summary, prolonged CO exposure-induced cardiac phenotypical changes, such as an imbalance in the cardiomyocyte oxidant status and an impairment of Ca^{2+} handling, are likely to predispose the heart to I/R injuries.

GRANTS

This work was funded by a French National Research Agency grant (COMYOCARD).

DISCLOSURES

No competing financial interests exist.

REFERENCES

- Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schluter KD, Schafer M, Piper HM, Schafer C. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res* 70: 346–353, 2006.
- Andre L, Boissiere J, Reboul C, Perrier P, Zalvidea S, Thireau J, Meyer G, Bideaux P, Obert P, Cazorla O, Richard S. Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. *Am J Respir Crit Care Med* In press.
- Bagul A, Hosgood SA, Kaushik M, Nicholson ML. Carbon monoxide protects against ischemia-reperfusion injury in an experimental model of controlled nonheartbeating donor kidney. *Transplantation* 85: 576–581, 2008.
- Bak I, Papp G, Turoczy T, Varga E, Szendrei L, Vecsernyes M, Joo F, Tosaki A. The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free Radic Biol Med* 33: 639–648, 2002.
- Bak I, Szendrei L, Turoczy T, Papp G, Joo F, Das DK, de Leiris J, Der P, Juhasz B, Varga E, Bacskay I, Balla J, Kovacs P, Tosaki A. Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J* 17: 2133–2135, 2003.
- Bak I, Varadi J, Nagy N, Vecsernyes M, Tosaki A. The role of exogenous carbon monoxide in the recovery of post-ischemic cardiac function in buffer perfused isolated rat hearts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51: 453–459, 2005.
- Barnett AG, Williams GM, Schwartz J, Best TL, Neller AH, Petroschovsky AL, Simpson RW. The effects of air pollution on hospitalizations for cardiovascular disease in elderly people in Australian and New Zealand cities. *Environ Health Perspect* 114: 1018–1023, 2006.
- Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195: 133–140, 1952.
- Bell ML, Peng RD, Dominici F, Samet JM. Emergency Hospital Admissions for Cardiovascular Diseases and Ambient Levels of Carbon Monoxide. Results for 126 United States Urban Counties, 1999–2005. *Circulation* 120: 949–955, 2009.
- Bevan MA, Proctor CJ, Baker-Rogers J, Warren ND. Exposure to carbon monoxide, respirable suspended particulates, and volatile organic compounds while commuting by bicycle. *Environ Sci Technol* 25: 788–779, 1991.
- Bhatnagar A. Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution and heart disease. *Circ Res* 99: 692–705, 2006.
- Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC Jr, Tager I. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 109: 2655–2671, 2004.
- Burnett RT, Cakmak S, Brook JR, Krewski D. The role of particulate size and chemistry in the association between summertime ambient air pollution and hospitalization for cardiorespiratory diseases. *Environ Health Perspect* 105: 614–620, 1997.
- Bye A, Sorhaug S, Ceci M, Hoydal MA, Stolen T, Heinrich G, Tjonna AE, Najjar SM, Nilsen OG, Catalucci D, Grimaldi S, Contu R, Steinshamm S, Condorelli G, Smith GL, Ellingsen O, Waldum H, Wisloff U. Carbon monoxide levels experienced by heavy smokers impair aerobic capacity and cardiac contractility and induce pathological hypertrophy. *Inhal Toxicol* 20: 635–646, 2008.
- Chen TM, Shofer S, Gokhale J, Kuschner WG. Outdoor air pollution: overview and historical perspective. *Am J Med Sci* 333: 230–234, 2007.
- Dhalla NS, Temsah RM, Neticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18: 655–673, 2000.
- Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G, Zweier JL. Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15081–15086, 2007.
- Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114–121, 1984.
- Fujimoto H, Ohno M, Ayabe S, Kobayashi H, Ishizaka N, Kimura H, Yoshida K, Nagai R. Carbon monoxide protects against cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo via MAPK and Akt-eNOS pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1848–1853, 2004.
- Li Volti G, Rodella LF, Di Giacomo C, Rezzani R, Bianchi R, Borsani E, Gazzolo D, Motterlini R. Role of carbon monoxide and biliverdin in renal ischemia/reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol* 104: e135–e139, 2006.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951.
- Marklund S. Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 251: 7504–7507, 1976.
- Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, Shepherd K, Sullivan JH, Anderson GL, Kaufman JD. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med* 356: 447–458, 2007.
- Mou YA, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, Cazorla O. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res* 81: 555–564, 2009.
- Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 88: 581–609, 2008.
- Nakao A, Neto JS, Kanno S, Stolz DB, Kimizuka K, Liu F, Bach FH, Billiar TR, Choi AM, Otterbein LE, Murase N. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 5: 282–291, 2005.
- Neticadan T, Temsah R, Osada M, Dhalla NS. Status of Ca²⁺/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C384–C391, 1999.
- Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D. Translational cardiovascular medicine (II) Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 62: 199–209, 2009.
- Samoli E, Touloumi G, Schwartz J, Anderson HR, Schindler C, Forsberg B, Vigotti MA, Vonk J, Kosnik M, Skorkovsky J, Katsouyanni K. Short-term effects of carbon monoxide on mortality: an analysis within the APHEA project. *Environ Health Perspect* 115: 1578–1583, 2007.
- Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 61: 402–413, 2004.
- Sheps DS, Herbst MC, Hinderliter AL, Adams KF, Ekelund LG, O'Neil JJ, Goldstein GM, Bromberg PA, Ballenger M, Davis SM. Effects of 4 percent and 6 percent carboxyhemoglobin on arrhythmia production in patients with coronary artery disease. *Res Rep Health Eff Inst* 1–58, 1991.
- Sheps DS, Herbst MC, Hinderliter AL, Adams KF, Ekelund LG, O'Neil JJ, Goldstein GM, Bromberg PA, Dalton JL, Ballenger MN. Production of arrhythmias by elevated carboxyhemoglobin in patients with coronary artery disease. *Ann Intern Med* 113: 343–351, 1990.
- Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation* 96: 4372–4379, 1997.
- Stern FB, Halperin WE, Hornung RW, Ringenburg VL, McCammon CS. Heart disease mortality among bridge and tunnel officers exposed to carbon monoxide. *Am J Epidemiol* 128: 1276–1288, 1988.
- Stieb DM, Szyszkowicz M, Rowe BH, Leech JA. Air pollution and emergency department visits for cardiac and respiratory conditions: a multi-city time-series analysis (Abstract). *Environ Health* 8: 25, 2009.
- Szabo ME, Gallyas E, Bak I, Rakotavao A, Boucher F, de Leiris J, Nagy N, Varga E, Tosaki A. Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 3727–3732, 2004.
- Tanguy S, Boucher F, Besse S, Ducros V, Favier A, de Leiris J. Trace elements and cardioprotection: increasing endogenous glutathione peroxidase activity by oral selenium supplementation in rats limits reperfusion-induced arrhythmias. *J Trace Elem Med Biol* 12: 28–38, 1998.
- Venetucci LA, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA. The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovasc Res* 77: 285–292, 2008.
- Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 22: 447–455, 1988.
- Wright GR, Jewczyk S, Onrot J, Tomlinson P, Sheppard RJ. Carbon monoxide in the urban atmosphere: hazards to the pedestrian and the street-worker. *Arch Environ Health* 30: 123–129, 1975.
- Zhao X, Chen YR, He G, Zhang A, Druhan LJ, Strauch AR, Zweier JL. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) knockout decreases NOS2 induction, limiting hyperoxygenation and conferring protection in the postischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1541–H1550, 2007.

3. Résultats additionnels

Au cours du protocole d'IR myocardique, nous avons également mesuré la production de NO au moment de la reperfusion dans nos deux populations. De plus, une évaluation de l'expression de la eNOS cardiaque a aussi été réalisée. Ces résultats, n'ayant pas donné lieu à publication, font l'objet de cette présentation séparée.

Le NO

La quantité de NO synthétisée est aujourd'hui largement décrite comme jouant un rôle non négligeable dans la sévérité des lésions d'IR myocardique (Jones et Bolli, 2006 ; Ferdinandy et al., 2007). Une surproduction de NO liée à l'apport massif d'O₂ au niveau des NOS a préalablement été rapportée au moment de la reperfusion, (Wang et Zweier, 1996). En condition pro-oxydante, cette production accrue de NO pourrait jouer un rôle délétère notamment via sa réaction avec l'O₂⁻ à l'origine de la formation de ONOO⁻ (Beckman et Koppenol, 1996 ; Wang et Zweier, 1996). Il semblait donc intéressant d'évaluer les effets du CO sur la production myocardique de NO au cours de la reperfusion post-ischémique.

La production de NO estimée à partir du dosage des nitrites/nitrates au cours des premières minutes de reperfusion est dans notre travail significativement augmentée chez les rats CO comparés aux rats Ctrl ($10,02 \pm 0,89$ vs. $4,86 \pm 0,65$ $\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; $p < 0,05$) (Figure 29). Le rôle potentiel de cette surproduction de NO dans la plus grande vulnérabilité du myocarde au syndrome d'IR sera l'objet de l'étude n°2 de ce travail de thèse.

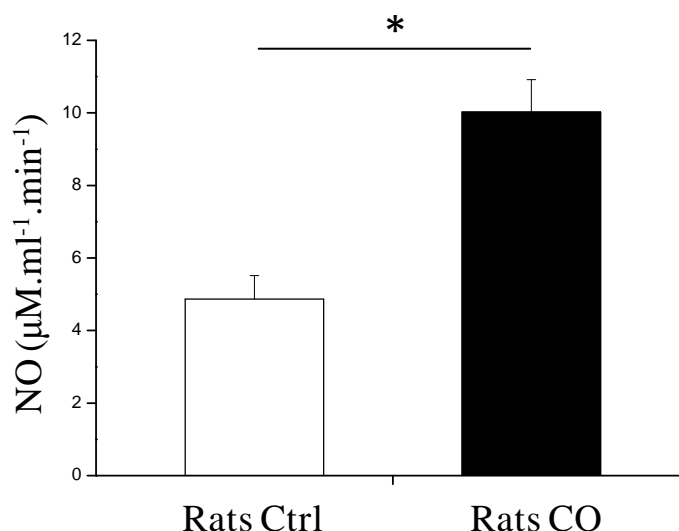


Figure 29 : Production myocardique de NO après une séquence d'ischémie (30 min) et de reperfusion (5 min), évaluée par quantification des nitrites et nitrates dans les effluents coronaires. * p<0,05 rats CO vs. rats Ctrl.

La eNOS cardiaque

L'expression des différents isoformes de NOS est modulable en condition physiopathologique. Il a notamment été montré qu'une grande variété de stimuli peut entraîner une augmentation (Insuline, VEGF, forces de cisaillement...) ou une diminution (Erythropoïétine, TNF- α , iNOS...) de l'expression tissulaire de eNOS (Govers et Rabelink, 2001 ; Balligand et al., 2009). Bien qu'une surproduction de NO liée à une activité/expression augmentée de la eNOS soit le plus souvent rapportée comme bénéfique, dans notre modèle, cette production accrue de NO au cours du syndrome d'IR est associée, chez la population de rats CO, à une plus grande vulnérabilité du myocarde. Cependant, il nous a semblé intéressant, au vu des résultats présentés, d'évaluer l'expression de la eNOS cardiaque chez nos rats exposés de façon prolongée au CO.

L'expression de la eNOS cardiaque est dans notre travail inchangée chez les rats exposés au CO comparés aux rats Ctrl (Figure 30). Il apparaît donc probable que cette surproduction de NO chez la population de rats CO soit liée à une modification d'expression d'un autre isoforme de NOS. Ainsi la potentielle implication d'une expression induite de iNOS dans le tissu myocardique de nos rats exposés au CO sera étudiée dans l'étude n°2 de ce travail de thèse.

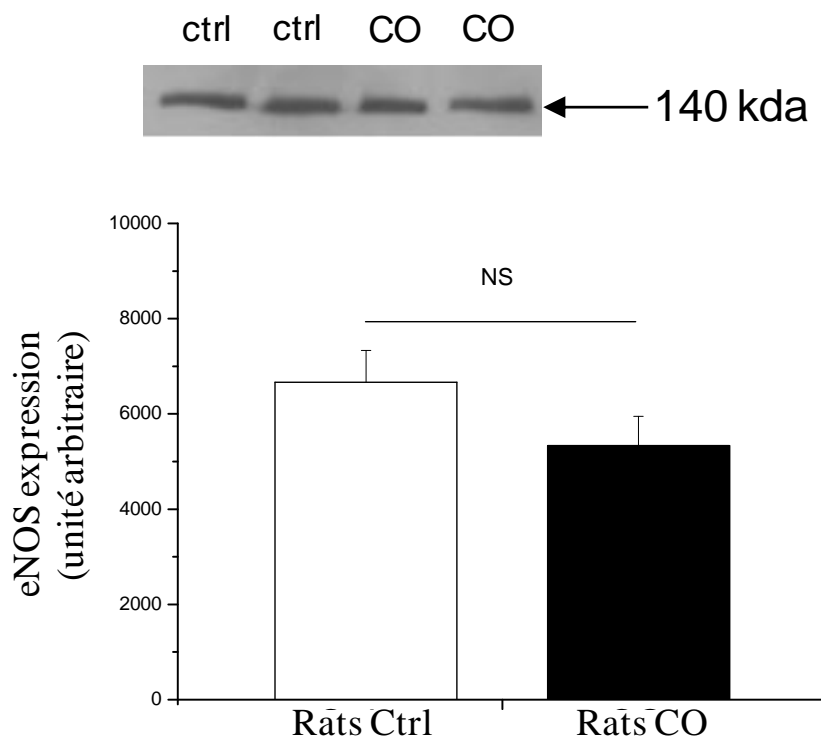


Figure 30 : Expression myocardique de eNOS évaluée par western blot.

Etude n°2

Aggravation des lésions cardiaques d'ischémie-reperfusion par une
pollution de type citadine au CO : Rôle crucial de la iNOS

.....

Carbon monoxide air pollution exacerbates cardiac ischemia-
reperfusion injury: a pivotal role for iNOS.

G. Meyer, L. André, S. Tanguy, C. Rugale, S. Gayrard, S. Richard, F. Boucher, O.

Cazorla, P. Obert, C. Reboul

II. Etude n°2

1. Résumé article 2

1.1. Contexte scientifique

L'étude n°1 a mis en avant des effets aggravants d'une exposition de type citadine au CO sur la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR. Par ailleurs, l'exposition à de faibles concentrations de CO est également à l'origine d'un remodelage pathologique cardiomyocytaire qui semble pouvoir être expliqué par une modification du statut redox cellulaire (Andre et al., 2010). Il est classiquement rapporté dans le cadre de pathologies myocardiques associées à un stress oxydant récurrent, une augmentation de l'expression induite d'un isoforme de la NOS, appelé iNOS ou NOS2 (Xie et al., 1994 ; Zhen et al., 2008). Cette enzyme est rapportée dans la littérature scientifique comme étant à l'origine d'une surproduction de NO, notamment expliquée par son absence de régulation post-traductionnelle (Cho et al., 1992 ; Xia, 2007). Par ailleurs, son expression cellulaire est rapportée comme étant responsable, au niveau myocardique, d'un remodelage pathologique (Mungrue et al., 2002 ; Gealekman et al., 2002 ; Massion et Balligand, 2007) associé à une plus grande sensibilité à l'IR (Marfella et al., 2004 ; Hu et al., 2006). Dans notre modèle, nous avons pu observer, dans l'étude n°1, un pic de production de NO au cours des premières minutes de reperfusion (cf. résultats additionnels de l'étude n°1) chez la population de rats CO. En l'absence d'effet du CO sur l'expression de eNOS myocardique (cf. résultats additionnels de l'étude n°1), l'objectif de cette étude n°2 était de répondre au questionnement suivant :

L'exposition au CO, via notamment une modification du statut redox cellulaire, est-elle associée à une expression induite de iNOS cardiaque à l'origine d'une surproduction de NO ? Cette surproduction de NO en condition pro-oxydante peut-elle expliquer la plus grande sensibilité du myocarde au stress d'IR ?

1.2. Méthodologie :

Les conditions expérimentales concernant l'exposition au CO sont similaires à celles décrites dans l'étude n°1. Suite à la période d'exposition, une évaluation du statut redox (activité de la TrxR) et de l'expression tissulaire du TNF- α et de la iNOS est réalisée. Afin d'étudier les effets de l'expression de la iNOS au niveau cellulaire, notamment sur les altérations de l'homéostasie calcique, un protocole d'A/R, en présence ou non de SMT (0,5 μ M) (inhibiteur spécifique de iNOS) ou de NAC (20 μ M) (antioxydant non spécifique) est réalisé sur cardiomyocytes isolés, chargés avec un indicateur calcique. Enfin, un protocole d'IR régionale sur cœur isolé perfusé de Langendorff est réalisé en présence ou non de SMT pour évaluer l'implication de la iNOS dans la sensibilité accrue à l'IR des myocards de rats exposés au CO.

1.3. Résultats majeurs :

Un résultat majeur de cette étude est que l'exposition au CO est caractérisée par un état pro-oxydant et un stress inflammatoire à l'origine d'une surexpression de iNOS au niveau myocardique. Ce phénotype a notamment comme conséquence une surproduction de NO dépendante de la iNOS. Enfin, il est intéressant de noter, que l'inhibition spécifique de cette

enzyme au cours du syndrome d'IR, permet, via une inhibition de la surproduction de NO, de normaliser le Ca^{2+} diastolique basale et ainsi la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR.

L'exposition au CO est à l'origine d'une surproduction de NO, dépendante d'une surexpression de la iNOS myocardique. Cette production accrue de NO en condition pro-oxydante semble jouer un rôle majeur dans la plus grande vulnérabilité du myocarde au stress d'IR chez les rats exposés au CO.

2. Article n°2 :

Carbon monoxide air pollution exacerbates cardiac ischemia-reperfusion injury: a pivotal role for iNOS.

G. Meyer MSc¹, L. André MSc², S. Tanguy PhD¹, C. Rugale MD³, S. Gayrard BSc¹, S. Richard PhD², F. Boucher PhD⁴, O. Cazorla PhD², P. Obert PhD¹, C. Reboul PhD¹

¹, Research Laboratory: EA 4278, Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise, Faculty of Sciences, Avignon University, F-84000 Avignon, France

², Research Laboratory: INSERM U637, Cardiovascular Physiopathology, MONTPELLIER1 University, Faculty of Medicine, F-34295 Montpellier, France

³, Research Laboratory: EA3127, Groupe Rein et Hypertension, MONTPELLIER1 University, Faculty of Medicine, F-34295 Montpellier, France

⁴, Research Laboratory: UMR5525 PRETA-TIMC, Grenoble University Joseph Fourier, Grenoble, France

Running Title: Cardiac toxicity of chronic CO exposure

Contact information: Cyril.reboul@univ-avignon.fr

Phone number: 00.334.90.16.29.32

Fax number: 00.334.90.16.29.01

Abstract

Carbon monoxide (CO) is a ubiquitous environmental pollutant, which impacts on mortality and morbidity from cardiovascular diseases. We have previously shown that CO exposure aggravates myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury in rats. Nevertheless, the cellular mechanisms underlying cardiac CO toxicity still remain hypothetical. The aim of the present study was to investigate whether iNOS expression is involved in the deleterious effects of prolonged CO exposure on myocardial sensitivity to IR. Wistar rats were exposed to simulated urban CO pollution (low level of CO) for 4 weeks. Myocardial IR was performed on isolated perfused hearts in presence or absence of S-methyl-isothiourrea (SMT, 0.5 μ M) a specific iNOS inhibitor. Calcium (Ca^{2+}) handling was evaluated on isolated myocytes after an anoxia-reoxygenation sequence performed with or without SMT or N-acetylcystein (NAC), a non specific antioxidant. Finally, the effects of CO exposure on myocardial NO production and iNOS expression were evaluated. Our main results are that 1) CO exposure induces a pro-inflammatory state to the heart, with an increased cardiac level of TNF- α ; 2) iNOS expression and cardiac NO production are increased in CO rats ; 3) Specific iNOS inhibition reduces CO-induced NO overproduction and reduces infarct size in CO rats (29 % vs. 51 % of risk zone). This last result may be explained by the deleterious effects of NO derivatives on Ca^{2+} handling observed at the cardiomyocytes level and probably due to oxidative/nitrative stress. In conclusion, this study highlights the involvement of iNOS over-expression in the pathogenesis of simulated urban CO air pollution exposure.

1. Introduction

Nitric oxide (NO) is produced in eukaryotic cells by a group of three NO synthases (NOS). Two of them are constitutive: the neuronal (nNOS) and the endothelial (eNOS) isoforms; and the third one is inducible (iNOS). Contrarily to constitutive NOS, iNOS expression is upregulated in response to inflammatory cytokines, such as TNF- α , or to oxidative stress (31). Therefore iNOS expression is generally associated with pathological states characterized by pro-inflammatory and/or pro-oxidative background. Because iNOS is irreversibly bound to calmodulin throughout the range of physiological Ca^{2+} concentration, increased iNOS expression is usually associated with elevated NO production (4). Induction of iNOS-expression has been associated with pathological cardiac remodeling (16), notably in response to alterations of calcium (Ca^{2+}) homeostasis (12, 28, 29). Indeed, high concentrations of NO impair Ca^{2+} handling proteins such as the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA-2a) or the ryanodine receptor (RyR-2). In addition, increased iNOS expression has been reported to increase myocardial sensitivity to ischemia and reperfusion (IR) (9, 24, 30). Indeed, in recent literature, oxidative/nitrative stress, resulting mainly from the reaction of NO with superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) to form peroxynitrite (ONOO^-), was mainly involved in myocardial damages observed during IR (11, 15, 17, 24). Moreover, in rodent models overexpressing iNOS, specific inhibition of this enzyme markedly reduced myocardial IR injuries (9).

Carbon monoxide (CO) is a ubiquitous environmental pollutant, which was reported to increase cellular oxidative stress (21, 32). Recently, we and others reported that a chronic exposure to low concentration of CO, relevant to urban environment, induces pathological changes of cardiomyocytes phenotypes, with an

associated decrease in antioxidant defences and impairment of Ca^{2+} handling (2, 5). We also highlighted that these alterations render the heart more vulnerable to IR (13).

Today, it is generally recognized that CO exposure induces both oxidative (2, 13, 21, 32) and inflammatory stresses in the heart (1), leading to profound rearrangements of the phenotype of myocardial cells. However, whether low concentrations of CO are responsible for an increased cardiac expression of iNOS has never been challenged. In the present work, we investigated : i) whether CO-induced myocardial stress results in inducible expression of iNOS; and, ii) whether induction of iNOS expression in CO-exposed rat hearts contributes to enhance oxidative/nitrative stress and, thereby, renders the heart more vulnerable to IR.

2. Methods

Experiments complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publications No. 85-23, revised 1996) and was approved by the French Ministry of Agriculture.

2.1. Animals and carbon monoxide exposure

Adult, male Wistar rats (n=66; 367 ± 7 g; Charles River Laboratories) were randomly assigned to 2 groups, carbon monoxide exposed rats (CO rats, exposed for 4 weeks to simulated CO urban pollution, n=33) and Control rats (Ctrl rats, exposed to standard filtered Air, n=33). CO rats were housed in an airtight exposure container for 4 weeks. Exposure was performed according to a 12:12-hours CO in air-ambient air cycle, as previously described (2, 13). During CO exposure, a CO concentration of 30 ppm was maintained and completed with five 1 hour peaks at 100 ppm. At the end of the 4 week CO exposure, rats were housed for 24 hours in standard filtered air, in order to avoid the acute effects of CO on the myocardium.

2.2. Regional myocardial ischemia and reperfusion on isolated perfused rat hearts

On a first set of rats (n=16 per group) a regional myocardial IR was achieved as previously described (13). The IR protocol was performed with or without SMT, a specific iNOS inhibitor at the concentration of 0.5 μ M (n=8 per condition). The heart was mounted on a Langendorff isolated heart system and perfused with an oxygenated (95 % O₂ / 5 % CO₂) Krebs solution (37°C) composed of (in mM) NaCl

118.3, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, Glucose 11.1, CaCl 2.5 (pH= 7.4). When necessary, SMT was added to the Krebs solution (SMT, 0.5 µM). The hearts were perfused at a constant pressure (80 mmHg) and paced at 300 beats/min with an electrical stimulator (Low voltage stimulator, BSL MP35 SS58L, 3V). The heart was allowed to stabilize for 30 min. Then a regional ischemia (left anterior descending coronary artery occlusion) was performed during 30 min. Subsequently the heart was allowed to reperfuse for 120 min. At the end of the protocol, a staining protocol was performed in order to assess infarct size (13).

2.3. Cardiomyocyte excitation-contraction analysis after cellular anoxia/reoxygenation

On a second set of rats (n=4 per group), single ventricular cardiomyocytes were isolated by enzymatic digestion (14). Cardiomyocytes were transferred into a glass Petri dish and placed in an anoxic chamber (O₂ level ~ 2 %) for 60 minutes, followed by a 60-minute reoxygenation in ambient air (O₂ ~ 19.4 %). Unloaded cell shortening and Ca²⁺ concentration (Indo-1 dye) were measured using field stimulation (0.5 Hz, 22°C, 1.8 mM external Ca²⁺) before and after anoxia/reoxygenation (A/R). Sarcomere length (SL) and fluorescence (405 and 480 nm) were simultaneously recorded (IonOptix system, Hilton, USA). The A/R experiment was carried out in presence or not of SMT (0.5 µM) or in presence or not of a non specific antioxidant N-Acetylcystein (NAC, 20 µM).

2.4. Biochemical assays

2.4.1. Lactate dehydrogenase in coronary effluents

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in coronary effluents from isolated hearts, by spectrophotometry using an LDH kit (LDH-P, BIOLABO SA, France). Measurements were made at 5, 10 and 15 min of reperfusion time. LDH activity was normalized to coronary blood flow.

2.4.2. Nitrites/Nitrates in coronary effluents

Nitrites/nitrates in coronary effluents from isolated hearts, used as an index of total NO production, were determined using a quantitative colorimetric assay kit based on the Griess method (QuantiChrom™ Nitric oxide Assay Kit (DINO-250). Measurements were made at the end of stabilisation and at 5, 10 and 15 min of reperfusion. NO production was normalized to coronary blood flow.

2.4.3. Immunohistological detection of iNOS expression

On a third set of rats (n=7 per group), LV tissues sections of 5- μ m-thick were removed and used for immunohistological study. Identification of iNOS protein was performed using a Rabbit polyclonal anti-iNOS (Santa-cruz). iNOS was quantified using colorimetric quantification (20 X objective).

2.4.4. Thioredoxin reductase activity

On a another set of rats (n=6 per group), hearts were freeze-clamped and the frozen ventricular tissue was homogenized in Tris-HCl buffer (Tris HCl 60 mM, diethyltriaminopentaacetic acid 1 mM, pH 7.4, 10 ml/g w.wt), using a Teflon Potter homogenizer. Tissue homogenates were then centrifuged (10 min at 20.000xg at 4°C). Activities of thioredoxin reductase (TrxR), reflecting the oxidant status, were measured using supernatants as previously described (Andre et al., 2010).

2.4.5. Immunoblotting detection of TNF- α expression

TNF- α expression in LV tissues was evaluated using western immunoblotting. Proteins were separated using 15 % SDS-PAGE. Identification of TNF- α protein was performed using a goat polyclonal anti-TNF- α (Santa-cruz 1:1000) and were expressed relative to GAPDH content.

2.5. Statistics

Data were analyzed using two-way ANOVA between groups and repeated measures ANOVA when necessary. When significant interactions were found, a Tukey-Kramer test was applied (Statview; SAS Institute, NC, USA). A level of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Data are expressed as group means or group mean fractions of baseline \pm Standard error (S.E.).

3. Results

3.1. CO-induced iNOS expression in myocardial tissues

As assessed by immunostaining, iNOS was overexpressed in CO rats when compared to Ctrl ones (Figure 1A). iNOS expression in tissues can be the consequence of both increased inflammatory cytokines and/or oxidative stress. In our model, both an overexpression of TNF- α (Figure 1B) and an increased oxidative stress, characterized by a higher TrxR activity (Figure 1C) was observed in CO rats compared to controls.

3.2. iNOS induced NO overproduction in coronary effluents

The consequence of the increased iNOS expression was that total NO production, measured in coronary effluents, was significantly higher in hearts from CO rats compared to controls (Figure 1D). The involvement of iNOS in CO induced NO overproduction was confirmed by the incubation of 0.5 μ M SMT (a specific inhibitor of iNOS), which prevented this overproduction and maintained its level close to Ctrl level (Figure 1D). No effect of SMT incubation was observed on Ctrl rats.

3.3. Infarct size and myocardial cell death.

Infarct size measurements (Figure 2A) revealed a worsening effect of CO exposure on IR-induced cell death (Figure 2B). The adverse effect of CO exposure on myocardial necrosis was prevented by SMT incubation (Figure 2B). In presence of

SMT, the infarct sizes in CO rats were similar to those of Ctrl animals (Figure 2B). No effect of SMT per se was observed in Ctrl rats (Figure 2AB). Evaluation of LDH release in coronary effluents, used as an index of cell membrane damage, corroborated these results (Figure 2C). Indeed, during post-ischemic reperfusion, LDH release was increased in the CO group when compared to the Ctrl group. This augmentation was prevented by specific inhibition of iNOS with SMT. LDH release was lower in the coronary effluent of CO+SMT rats during reperfusion, and the difference between Ctrl and CO rats was abolished by SMT. No effect of SMT per se was observed on LDH release in Ctrl rats. During IR, NO production evaluated by nitrite-nitrate assessment was increased in CO rats (Figure 2D). This increase was prevented by the specific inhibition of iNOS by SMT incubation, since NO release was significantly lower in the effluents of CO+SMT rats during reperfusion and the difference between Ctrl and CO rats was abolished by SMT (Figure 2D).

3.4. Ca²⁺ handling after anoxia-reoxygenation

At the cellular level, prolonged CO exposure sensitizes ventricular myocytes to A/R (Figure 3). This is characterized by a marked alteration of sarcomere length (SL) shortening in CO rats when compared to Ctrl ones following A/R (Figure 3AB). In addition, higher sensitivity of CO rat cardiomyocytes to A/R was associated with a significant diastolic Ca²⁺ overload (Figure 3CD) resulting in an altered Ca²⁺ transient in this population (Figure 3CE).

To evaluate the potential implication of NO overproduction but also of the reaction of NO with O₂⁻ to form ONOO⁻, we have incubated isolated myocytes during the A/R procedure, with a specific inhibitor of iNOS (SMT, 0.5 μM) or with a

scavenger of ROS (NAC, 20 μ M). Incubation with NAC reduced the impairment of cardiac cell contraction in both Ctrl and CO rats, confirming the contribution of ROS in the deleterious effects of A/R. In addition, NAC incubation prevented the CO-induced increase in cardiac sensitivity to A/R. Indeed, in this condition, no difference was reported between Ctrl and CO groups regarding SL shortening (Figure 3B). As far as Ca^{2+} handling is concerned, no effect of NAC incubation was observed in both Ctrl and CO rats, therefore the difference between the two experimental populations was still observed (Figure 3E). Finally, the diastolic cytosolic Ca^{2+} overload observed in CO rat cardiomyocytes after A/R was prevented by incubation with NAC and no difference between Ctrl and CO rats was observed (Figure 3D). Specific iNOS inhibition by SMT significantly prevented the increased sensitivity of CO rat cardiomyocytes to A/R (Figure 3). Indeed, the deleterious effects of prolonged exposure to CO on SL shortening and diastolic Ca^{2+} level after A/R were prevented by the specific inhibition of iNOS (Figure 3BD). In presence of SMT, the sensitivity of cardiomyocytes to A/R in CO and Ctrl rats was similar. No effect of SMT incubation was observed during A/R in Ctrl groups (Figure 3).

4. Discussion

To the best of our knowledge, our study is the first to investigate the implication of iNOS-induced NO overproduction in the enhanced sensitivity of the myocardium to IR after prolonged exposure to CO in conditions relevant to urban pollution. The major results are that: i) chronic CO pollution induced expression of iNOS in CO rats myocardium, and ii) specific inhibition of iNOS prevented increased NO production and subsequent worsening of myocardial vulnerability to IR.

4.1. How does CO exposure induce iNOS overexpression?

Our study provides evidence that chronic CO exposure upregulates iNOS expression in the heart, as revealed by immunochemical staining, which resulted in increased NO production. This production, indeed, was prevented specifically by acute treatment with a selective iNOS inhibitor. It is well-established that iNOS is expressed in response to inflammatory and/or oxidative stresses (22, 31). Yet, we show here that inflammatory cytokines and pro-oxidative marker, such as TNF- α and TrxR respectively, were increased in response to prolonged CO exposure. We also previously showed in the same experimental model that CO exposure is associated with lower enzymatic antioxidant activities and altered redox status (2, 13).

The mechanism responsible for upregulation of iNOS in response to oxidative stress is unclear. It is possibly mediated by ROS-induced activation of nuclear factor κ B (NF κ B) and subsequent initiation of the inflammatory cascade that includes induction of iNOS (10, 31). The close relationship between inflammatory stress and

iNOS expression is in contrast better understood. Indeed, it is well recognized that NF κ B -dependent activation of the iNOS promotor promotes an inflammation mediated stimulation of this transcript (27). Then, further studies are needed to illustrate potential interaction between pro-inflammatory/oxidative mediators and iNOS up-regulation in CO exposed rats.

4.2. Implication of iNOS in CO rats' myocardium sensitivity to IR

The major result here was that the higher cardiac vulnerability of 'CO rats' to IR was prevented by specific inhibition of iNOS. As opposed to the Ca²⁺-dependent regulation of constitutive NOS enzymes, iNOS has been described as Ca²⁺ insensitive, likely due to its tight non-covalent interaction with calmodulin and Ca²⁺ (6, 26). iNOS isoform can produce large amounts of NO that are up to 100 times greater than normal level in cardiac cells (16). Basal NO production protects cardiomyocytes from cells death, whereas high production by iNOS promotes cells death (8, 18). Indeed, NO is a short-lived and relatively unreactive radical, but in pro-oxidative condition, high amount of NO can combine with superoxide to form the potent oxidant ONOO⁻ shown to play a significant role in iNOS-mediated post-IR cell damages (3, 23). It is well recognized that, during IR, interaction between ROS and high amount of NO promotes cell death, notably due to the formation of ONOO⁻ (11, 30). Consequently, the specific inhibition of iNOS was found to be protective in hearts submitted to IR (9, 11, 25, 30). Such an implication of iNOS-induced NO overproduction in the higher vulnerability of CO rats myocardium to IR was reported in our model. In addition, in our work, specific inhibition of ONOO⁻ precursors (NO overproduction by iNOS and ROS) blunted the exacerbated sensitivity of CO rat's

myocytes to A/R. This result is notably explained by normalized Ca^{2+} homeostasis alterations. Oxyradical generation and peroxynitrite formation play an important role in the development of intracellular Ca^{2+} overload in cardiomyocytes as a consequence of IR injury (7, 19). Particularly, in pathological conditions, formation of ONOO^- due to iNOS is responsible for an alteration of Ca^{2+} handling proteins through a nitration of SERCA-2a (12), and a s-nitrosylation of RyR (20, 29), leading then to intracellular Ca^{2+} overload. Then, in CO rats' myocardium, the specific inhibition of iNOS, blunting the overproduction of NO, prevents exacerbated IR-induced intracellular Ca^{2+} overload and then normalizes heart vulnerability to IR.

In conclusion, we have shown that urban CO pollution upregulates inducible expression of iNOS, which renders the heart more vulnerable to stress or damages, notably in pro-oxidant conditions such as IR. Specific iNOS inhibition, by reducing NO overproduction, has protective effect and reduce IR injuries in CO exposed rats. A possible explanation of the increased myocardial IR injury consecutive to CO exposure is the deleterious effect of NO overproduction on Ca^{2+} homeostasis, probably mediated by its reaction with ROS to form peroxynitrite.

5. Grants

This work was supported by a French National Research Agency grant (COMYOCARD).

6. Author Disclosure Statement.

No competing financial interests exist

7. Bibliography

1. **Aberg AM, Abrahamsson P, Johansson G, Haney M, Winso O, and Larsson JE.** Does carbon monoxide treatment alter cytokine levels after endotoxin infusion in pigs? A randomized controlled study. *J Inflamm (Lond)* 5: 13, 2008.
2. **Andre L, Boissiere J, Reboul C, Perrier R, Zalvidea S, Meyer G, Thireau J, Tanguy S, Bideaux P, Hayot M, Boucher F, Obert P, Cazorla O, and Richard S.** Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 587-595, 2010.
3. **Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, and Kelly RA.** Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res* 85: 829-840, 1999.
4. **Bredt DS.** Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 31: 577-596, 1999.
5. **Bye A, Sorhaug S, Ceci M, Hoydal MA, Stolen T, Heinrich G, Tjonna AE, Najjar SM, Nilsen OG, Catalucci D, Grimaldi S, Contu R, Steinshamn S, Condorelli G, Smith GL, Ellingsen O, Waldum H, and Wisloff U.** Carbon monoxide levels experienced by heavy smokers impair aerobic capacity and cardiac contractility and induce pathological hypertrophy. *Inhal Toxicol* 20: 635-646, 2008.
6. **Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, and Nathan C.** Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176: 599-604, 1992.
7. **Dhalla NS, Temsah RM, and Netticadan T.** Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18: 655-673, 2000.

8. **Han W, Fu S, Wei N, Xie B, Li W, Yang S, Li Y, Liang Z, and Huo H.** Nitric oxide overproduction derived from inducible nitric oxide synthase increases cardiomyocyte apoptosis in human atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 130: 165-173, 2008.
9. **Hu A, Jiao X, Gao E, Koch WJ, Sharifi-Azad S, Grunwald Z, Ma XL, and Sun JZ.** Chronic beta-adrenergic receptor stimulation induces cardiac apoptosis and aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury by provoking inducible nitric-oxide synthase-mediated nitrative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 469-475, 2006.
10. **Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, and Lee JH.** Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 917-922, 1999.
11. **Li D, Qu Y, Tao L, Liu H, Hu A, Gao F, Sharifi-Azad S, Grunwald Z, Ma XL, and Sun JZ.** Inhibition of iNOS protects the aging heart against beta-adrenergic receptor stimulation-induced cardiac dysfunction and myocardial ischemic injury. *J Surg Res* 131: 64-72, 2006.
12. **Lokuta AJ, Maertz NA, Meethal SV, Potter KT, Kamp TJ, Valdivia HH, and Haworth RA.** Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure. *Circulation* 111: 988-995, 2005.
13. **Meyer G, Andre L, Tanguy S, Boissiere J, Farah C, Lopez-Lauri F, Gayrard S, Richard S, Boucher F, Cazorla O, Obert P, and Reboul C.** Simulated urban carbon monoxide air pollution exacerbates rat heart ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1445-1453, 2010.
14. **Mou YA, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, and Cazorla O.** Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res* 81: 555-564, 2009.

15. **Mukhopadhyay P, Rajesh M, Batkai S, Kashiwaya Y, Hasko G, Liaudet L, Szabo C, and Pacher P.** Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1466-1483, 2009.
16. **Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, Schulz R, Butany J, Stewart DJ, and Husain M.** Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest* 109: 735-743, 2002.
17. **Pacher P, Beckman JS, and Liaudet L.** Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315-424, 2007.
18. **Razavi HM, Hamilton JA, and Feng Q.** Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol Ther* 106: 147-162, 2005.
19. **Saini-Chohan HK and Dhalla NS.** Attenuation of ischemia-reperfusion-induced alterations in intracellular Ca²⁺ in cardiomyocytes from hearts treated with N-acetylcysteine and N-mercaptopyrionylglycine. *Can J Physiol Pharmacol* 87: 1110-1119, 2009.
20. **Stoyanovsky D, Murphy T, Anno PR, Kim YM, and Salama G.** Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 21: 19-29, 1997.
21. **Thom SR and Ischiropoulos H.** Mechanism of oxidative stress from low levels of carbon monoxide. *Res Rep Health Eff Inst*: 1-19; discussion 21-17, 1997.
22. **Umar S and van der Laarse A.** Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem* 333: 191-201.
23. **Walker LM, Walker PD, Imam SZ, Ali SF, and Mayeux PR.** Evidence for peroxynitrite formation in renal ischemia-reperfusion injury: studies with the inducible nitric oxide synthase inhibitor L-N(6)-(1-Iminoethyl)lysine. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 417-422, 2000.
24. **Wang XL, Liu HR, Tao L, Liang F, Yan L, Zhao RR, Lopez BL, Christopher TA, and Ma XL.** Role of iNOS-derived reactive nitrogen species and resultant nitrative stress in

leukocytes-induced cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion. *Apoptosis* 12: 1209-1217, 2007.

25. **Wildhirt SM, Suzuki H, Horstman D, Weismuller S, Dudek RR, Akiyama K, and Reichart B.** Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction. *Circulation* 96: 1616-1623, 1997.

26. **Xia Y.** Superoxide generation from nitric oxide synthases. *Antioxid Redox Signal* 9: 1773-1778, 2007.

27. **Xie QW, Kashiwabara Y, and Nathan C.** Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 4705-4708, 1994.

28. **Xu L, Eu JP, Meissner G, and Stamler JS.** Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279: 234-237, 1998.

29. **Xu S, Ying J, Jiang B, Guo W, Adachi T, Sharov V, Lazar H, Menzoian J, Knyushko TV, Bigelow D, Schoneich C, and Cohen RA.** Detection of sequence-specific tyrosine nitration of manganese SOD and SERCA in cardiovascular disease and aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H2220-2227, 2006.

30. **Zhao X, Chen YR, He G, Zhang A, Druhan LJ, Strauch AR, and Zweier JL.** Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) knockout decreases NOS2 induction, limiting hyperoxygenation and conferring protection in the postischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1541-1550, 2007.

31. **Zhen J, Lu H, Wang XQ, Vaziri ND, and Zhou XJ.** Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. *Am J Hypertens* 21: 28-34, 2008.

32. **Zuckerbraun BS, Chin BY, Bilban M, d'Avila JC, Rao J, Billiar TR, and Otterbein LE.** Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J* 21: 1099-1106, 2007.

Legends to figures

Fig. 1 A, Effects of CO exposure on iNOS expression evaluated by immunostaining on myocardial slices, quantified by colorimetric assessment (red color) and expressed in arbitrary unit. Data are presented as mean \pm S.E. (one-way ANOVA, * $p < 0.05$ vs. Ctrl rats). B, Effects of CO exposure on TNF- α expression, expressed relative to GAPDH content. Data are presented as mean \pm S.E. (one-way ANOVA, * $p < 0.05$ vs. Ctrl rats). C, Effects of CO exposure on thioredoxin reductase (TrxR) activity expressed in U/mg of protein. Data are presented as mean \pm S.E. (one-way ANOVA, * $p < 0.05$ vs. Ctrl rats). D, Effects of iNOS inhibition and CO exposure on NO synthesis (Nitrites/Nitrates). Data are presented as mean \pm S.E. (n=10 per group, repeated measures ANOVA, * $p < 0.05$ Ctrl vs. CO rats; # $p < 0.05$ SMT vs. non-SMT).

Fig. 2 Effect of iNOS inhibition and CO exposure on IR-induced cellular death. A, Representative sections of AAR and infarct size of rat hearts stained respectively with Evans Blue and triphenyltetrazolium chloride (TTC) after 30 min regional ischemia and 120 min reperfusion from isolated heart experiments in each experimental group. B, Infarct zone expressed as a percentage of risk zone. Data are presented as mean \pm S.E. (n=8 per group, one way ANOVA, * $p < 0.05$ Ctrl vs. CO rats; # $p < 0.05$ SMT vs. non-SMT) C, LDH activity observed in coronary effluents at 5, 10 and 15 min of reperfusion and used as a marker of cell death. Data are presented as mean \pm S.E. (n=8 per group, repeated measures ANOVA, * $p < 0.05$ Ctrl vs. CO rats; # $p < 0.05$ SMT vs. non-SMT). D, Effects of iNOS inhibition and CO exposure on NO synthesis at 5, 10 and 15 min of reperfusion time during IR protocol. Data are

presented as mean \pm S.E. (n=8 per group, repeated measures ANOVA, * p <0.05 Ctrl vs. CO rats; # p <0.05 SMT vs. non-SMT).

Fig. 3 Effects of iNOS inhibition and antioxidant treatment on the sensitivity to A/R of cardiomyocytes from Ctrl and CO rats. A, Representative contraction of intact cardiomyocytes measured by sarcomere shortening at 0.5 Hz. B, Contraction of intact myocytes, measured by sarcomere length (SL) shortening. Data are presented as percentage of baseline \pm S.E. C, Representative Ca^{2+} transient during cardiomyocyte excitation-contraction. D, Diastolic intracellular Ca^{2+} and E, Ca^{2+} transient amplitude in intact myocytes. Data are presented as mean \pm S.E. (n=4 per group, two-way ANOVA, * p <0.05 Ctrl vs. CO rats; # p <0.05 SMT vs. without SMT; \$ p <0.05 NAC vs. without NAC).

Fig. 1

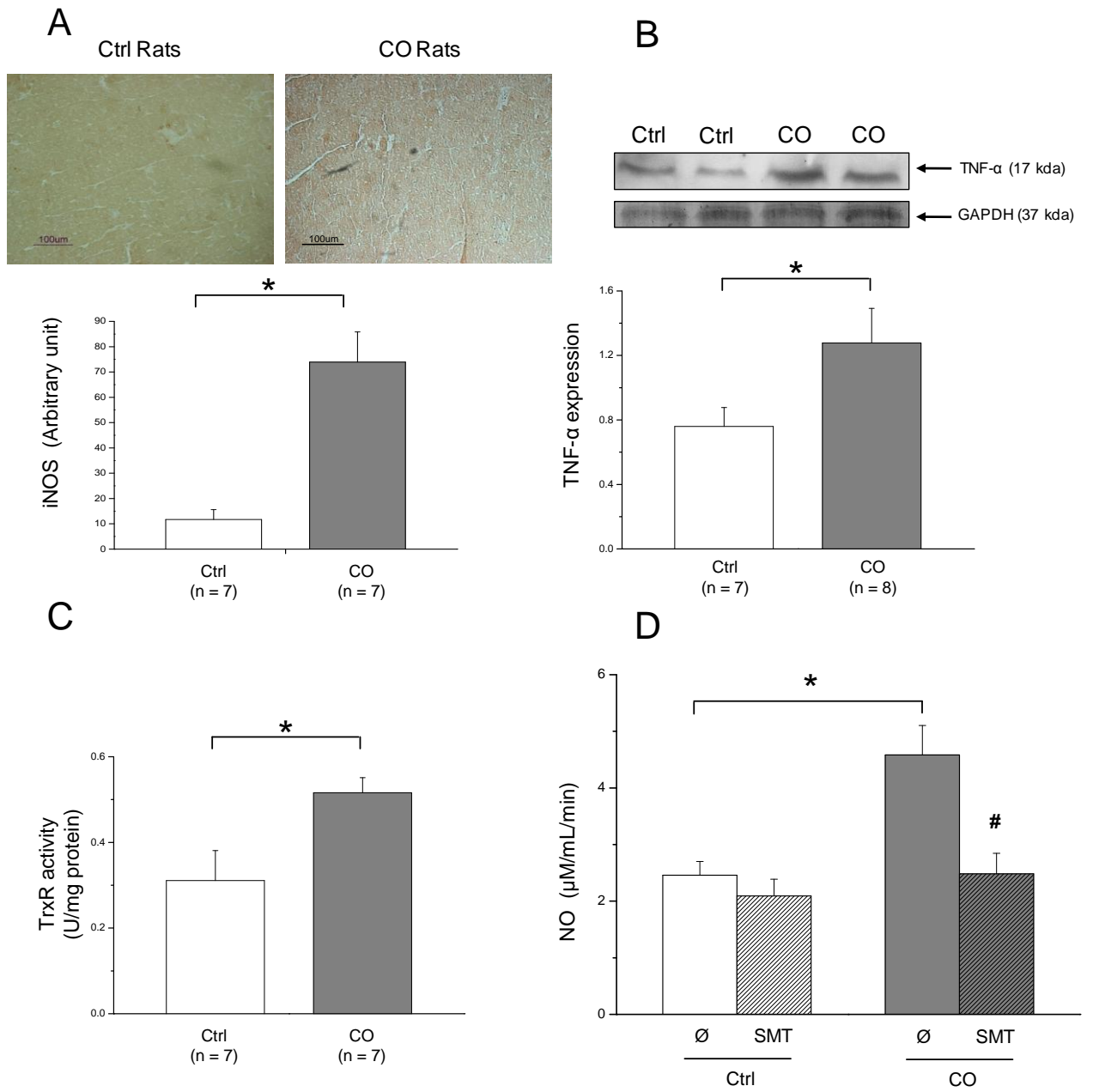
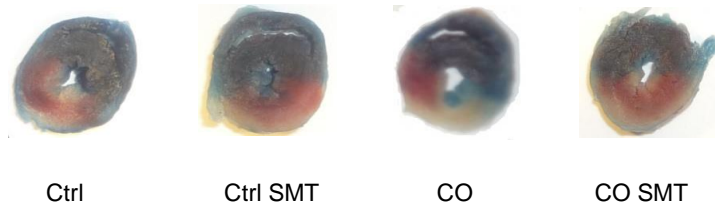


Fig. 2

A



B

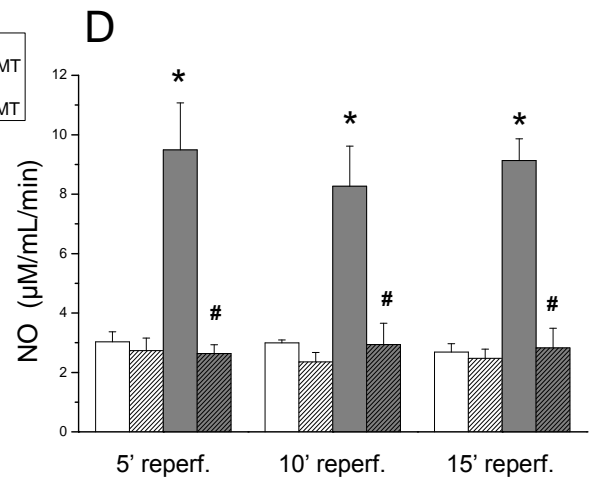
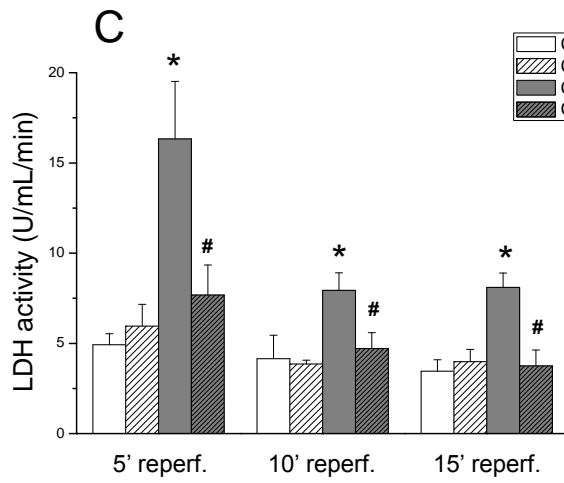
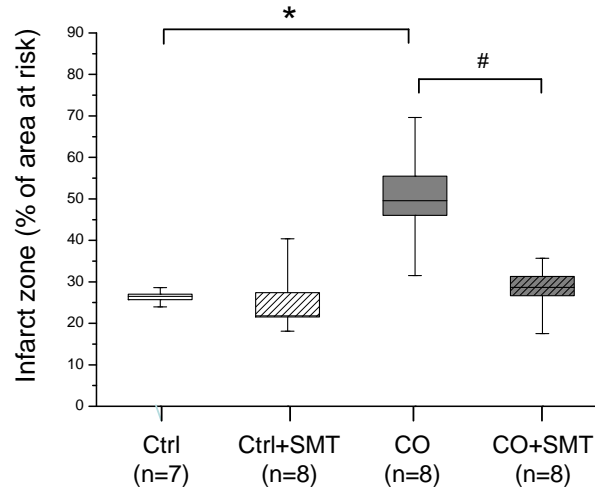
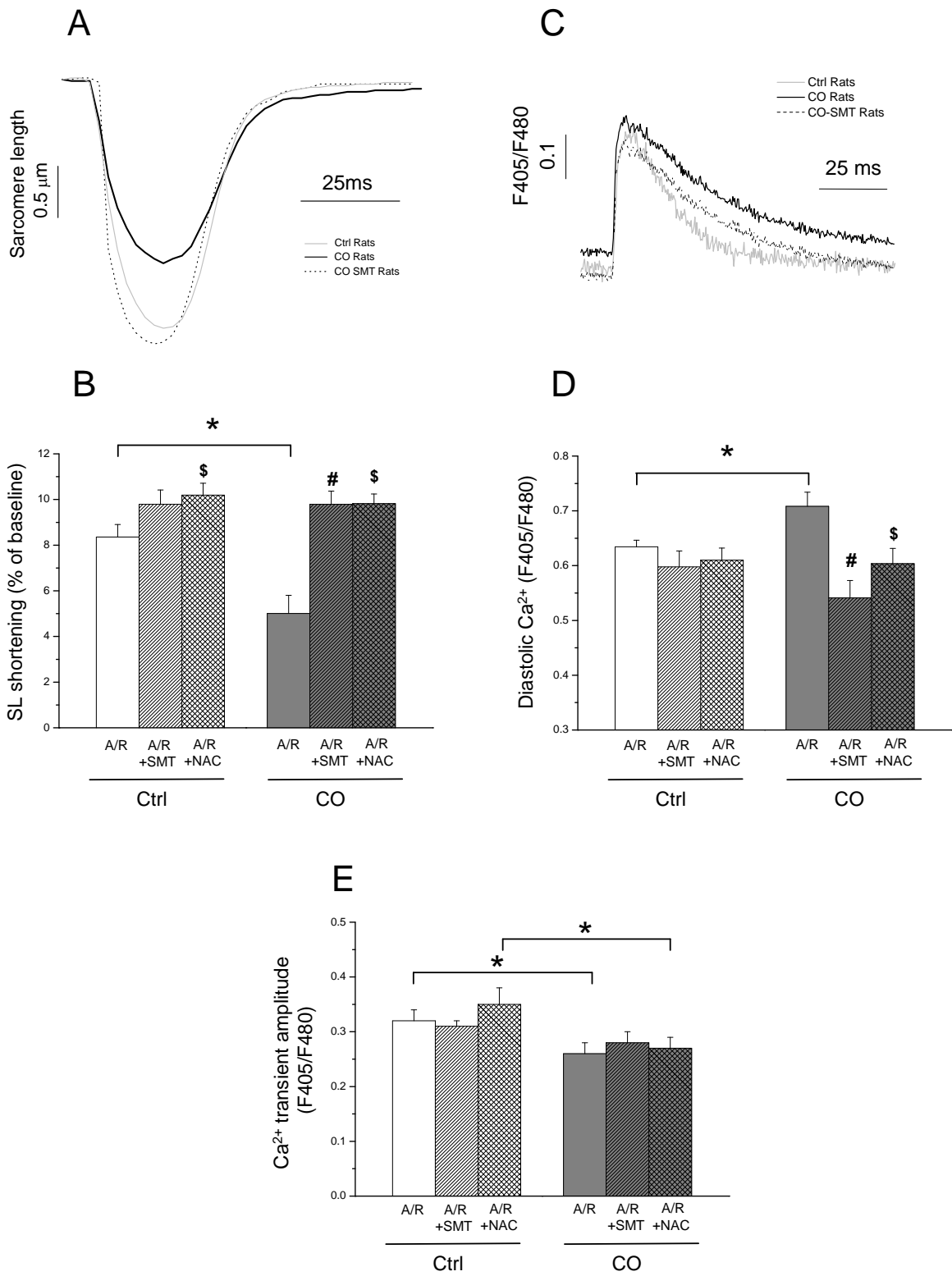


Fig. 3



Etude n°3

Prévention par l'exercice des effets délétères d'une exposition au CO
sur l'homéostasie calcique cardiomyocytaire : implication dans la
sensibilité à l'ischémie-reperfusion

.....

Exercise prevents impaired Ca²⁺ handling in heart of CO exposed rat:
implication for sensitivity to ischemia-reperfusion

C. Farah*, G. Meyer*, L. André, J. Boissière, S. Gayrard, O. Cazorla, S. Richard, F.
Boucher, S. Tanguy, P. Obert, C. Reboul

* ces deux auteurs ont contribué équitablement au travail

Soumis à *Am J Physiol Heart Circ Physiol*

N° de soumission : H-00835-2010

III. Etude n°3

1. Résumé article 3

1.1. Contexte scientifique :

La plus grande sensibilité du myocarde à l'IR est expliquée par le remodelage phénotypique délétère des cardiomyocytes de rats exposés pendant 4 semaines au CO (Etude n°1). Ce remodelage est notamment caractérisé par une moindre capacité de défense enzymatique antioxydante et par une surcharge calcique plasmatique cardiomyocytaire. La pratique régulière d'exercice à intensité modérée est une stratégie de prévention largement reconnue aujourd'hui comme permettant notamment d'améliorer la protection du muscle cardiaque contre la survenue d'événements pro-oxydants aigus (French et al., 2006 ; French et al., 2008 ; Kavazis et al., 2008 ; Powers et al., 2008). Par ailleurs, l'exercice est reconnu comme permettant d'améliorer le pronostic vital cardiaque dans le cadre du développement de cardiomyopathies, notamment via une normalisation de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire (French et al., 2008 ; Kemi et Wisloff, 2010). Le développement d'un phénotype cellulaire de type pathologique semblant secondaire à l'augmentation du stress oxydant dans notre modèle. L'objectif de cette étude n°3 était de répondre aux interrogations suivantes:

Quels sont les effets protecteurs d'un entraînement en endurance sur le remodelage phénotypique cardiomyocytaire associé à une période d'exposition prolongée au CO ? Cette stratégie préventive influence-t-elle la sensibilité du myocarde, de rats exposés au CO, au syndrome d'IR ?

1.2. Méthodologie :

Pour répondre à ces questions, une troisième population de rats entraînée pendant 4 semaines avant d'être exposée au CO (rats CO-Ex) a été ajoutée aux deux groupes de rats sédentaires (rats Ctrl et rats CO). Suite aux différents protocoles d'exposition et/ou d'entraînement, une évaluation du statut enzymatique antioxydant et des mouvements calciques intracellulaires au cours du couplage excitation-contraction a été réalisée. Enfin, afin d'évaluer l'implication des différentes modifications phénotypiques sur la sensibilité du cœur à l'IR, un protocole d'IR régionale sur cœur isolé perfusé était conduit.

1.3. Résultats majeurs :

Le résultat majeur de notre étude est la prévention, par l'entraînement régulier à intensité modérée conduit préalablement à l'exposition au CO, du développement d'un phénotype cellulaire cardiaque pathologique. En effet, les conséquences délétères d'une exposition au CO sur l'activité enzymatique antioxydante sont prévenues par l'exercice en endurance. De plus, un tel entraînement permet également d'inhiber les effets délétères du CO sur l'expression de SERCA-2a et ainsi de préserver l'homéostasie calcique cellulaire chez les rats exposés au CO. Enfin, ces effets bénéfiques de l'exercice, rapportés à l'étage cellulaire,

ont permis de normaliser la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR chez la population de rats CO.

L'entraînement à intensité modérée permet de prévenir le développement d'un phénotype cardiomyocytaire pathologique chez la population de rats exposés au CO, et ainsi de normaliser la sensibilité myocardique au syndrome d'IR.

2. Article n°3 :

**Exercise prevents impaired Ca²⁺ handling in heart of CO exposed rat:
implication for sensitivity to ischemia-reperfusion**

C. Farah^{1*}, G. Meyer^{1*}, L. André², J. Boissière¹, S. Gayrard¹, O. Cazorla², S. Richard², F. Boucher³, S. Tanguy¹, P. Obert¹, C. Reboul¹.

¹, Research Laboratory: EA 4278, Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise, Faculty of Sciences, Avignon University, F-84000 Avignon, France

², Research Laboratory: INSERM U637, Cardiovascular Physiopathology, MONTPELLIER1 University, Faculty of Medicine, F-34295 Montpellier, France

³, Research Laboratory: CNRS UMR5525 PRETA-TIMC, F-38000 Grenoble University Joseph Fourier, Grenoble, France

^{*}, both authors contributed equally to this work

Running Title: CO pollution and exercise cardioprotection

Words count: 3775

Contact information: Cyril.reboul@univ-avignon.fr

Phone number: 00.334.90.16.29.32

Fax number: 00.334.90.16.29.0

Abstract

Sustained urban carbon monoxide (CO) exposure exacerbates heart vulnerability to ischemia reperfusion via deleterious effects on the antioxidant status and Ca²⁺ homeostasis of cardiomyocytes. The aim of this work was to evaluate whether moderate exercise training prevents these effects. Wistar rats were randomly assigned to control group and to CO groups, living during 4 weeks in simulated urban CO pollution (30-100 ppm, 12 hours/day) with (CO-Ex) or without exercise (CO-Sed). Exercise procedure began 4 weeks before CO exposure and was maintained twice a week in standard filtered air during CO exposure. On a first set of rats, myocardial ischemia (30 min) and reperfusion (120 min) were performed on isolated perfused rat hearts. On another set of rats, myocardial antioxidant status and Ca²⁺ handling were evaluated following environmental exposure. Exercise training prevented CO-induced myocardial phenotypical changes. Indeed, exercise induced myocardial antioxidant status recovery in CO exposed rats, which is accompanied by normalization of SERCA-2a expression and then of Ca²⁺ handling. Importantly, in CO exposed rats, the normalization of cardiomyocytes phenotype with moderate exercise was associated with restored sensitivity of the myocardium to IR. Indeed, CO-Ex rats present a lower infarct size and a significant decrease of reperfusion arrhythmias when compared to their sedentary counterparts. To conclude, moderate exercise, by preventing CO-induced Ca²⁺ handling and myocardial antioxidant status alterations, reduces heart vulnerability to IR.

Keywords: Myocardial infarction, Environmental pollution, Endurance training, antioxidant status

1. Introduction

The severity of myocardial infarction results from a complex interplay between genetic, pathological and environmental factors (20, 24). Among environmental factors, numerous epidemiological studies have demonstrated that carbon monoxide (CO) pollution correlated with hospital admissions for cardiovascular diseases (3, 15), as well as cardiovascular mortality (25). We recently reported that sustained low level CO exposure, similar to that found in an urban environment, induced a pathological remodelling of the myocardium (1) rendering the heart more vulnerable to ischemia-reperfusion (IR) (16). This remodelling involves a marked alteration of enzymatic antioxidant status associated with marked changes in Ca^{2+} handling (1), promoting cardiomyocyte death and severe ventricular arrhythmias (16).

Today, amongst numerous cardioprotective strategies used to prevent deleterious myocardial remodelling associated with several pathological states, and/or to reduce the vulnerability of the heart to acute ischemic events, regular endurance exercise training is reported as one of the most practicable and sustainable methods (2, 7, 11, 22, 23). Although mechanisms responsible for exercise-induced cardioprotection remain unclear, many studies suggest that increased enzymatic antioxidant status plays an important role (7, 10, 32). In addition, exercise training is also reported to normalize Ca^{2+} homeostasis in the pathological myocardium (26, 29). Therefore, we have hypothesized that regular exercise training started prior to sustained CO exposure could prevent pathological cardiac remodelling and/or modulate heart vulnerability to IR.

The aim of this study was to evaluate potential cardioprotective effects of regular bouts of endurance training in an experimental rat model exposed to

simulated sustained urban CO pollution. Especially, we focused on the effects of exercise training on Ca^{2+} handling, myocardial enzymatic antioxidant status alterations and consequences on heart vulnerability to IR. The major results showed that regular bouts of endurance training prevented the pathological cardiac remodelling and the higher vulnerability to IR of the hearts of rats exposed to chronic CO.

2. Methods

All investigations complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publications No. 85-23, revised 1996) and with the approval of the French Ministry of Agriculture. All experiments have been approved by the local research ethics committee (Comité Régional d'Ethique).

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (n=57; 384±8 g; Charles Rivers Laboratories) were randomly assigned to three experimental groups: 1) sedentary control group (Ctrl-Sed rats), 2) sedentary CO exposed group (CO-Sed rats), 3) trained CO exposed group (CO-Ex rats). All experimental groups were maintained on a 12:12 hour light-dark cycle and provided rat chow and water *ad libitum*.

2.2. Exercise training protocol

Exercise training protocol was performed on a motor driven treadmill for 4 weeks, 5 days/week at a relative work rate corresponding to 50 % of maximal aerobic velocity (20 m/min; 40 min/day). During the 4 following weeks, corresponding to CO exposure period, to preserve exercise training benefits, exercise training was maintained in CO-Ex rats on a frequency of 2 days/week.

2.3. Carbon monoxide exposure

CO groups were exposed to simulated CO urban pollution for 4 weeks, 12 hours/day during the night phase. CO rats were housed in an airtight exposure container and exposure was performed as follows: i) During CO exposure, a CO concentration of 30 ppm was maintained in the airtight container and monitored with an aspirative CO analyzer (CHEMGARD Infrared Gas Monitor NEMA 4 Version, MSA), this initial concentration was completed with five 1 hour peaks at 100 ppm CO; ii) During ambient air exposure, animals were placed in the laboratory animal-house at a CO concentration of 0 ppm. Throughout this CO exposure period, Ctrl-Sed rats were confined in the laboratory animal-house and were manipulated daily. At the end of the 4 weeks of CO exposure, the rats were housed for 24 hours in standard filtered air before euthanasia in order to avoid acute effects of CO on the myocardium.

2.4. Ca²⁺ handling in cardiomyocytes

In the first set of rats (n=4/group), evaluation of exercise training and CO exposure on excitation-contraction was performed on single ventricular cardiomyocytes isolated by enzymatic digestion (19). Unloaded cell shortening and Ca²⁺ concentration (Indo-1 dye) were measured using field stimulation (0.5 Hz, 22°C, 1.8 mM external Ca²⁺). Sarcomere length (SL) and fluorescence (405 and 480 nm) were simultaneously recorded (IonOptix system, Hilton, USA) (1).

2.5. Regional myocardial ischemia-reperfusion protocol on isolated perfused heart

In a second set of rats (n=10/group), a regional myocardial IR protocol on isolated-perfused heart was performed (16). The coronary occlusion-induced

myocardial regional ischemia was maintained for 30 min. Subsequently, the heart was allowed to reperfuse during 120 min. Lactate dehydrogenase (LDH) release, incidence of ventricular fibrillation and infarct size were evaluated.

2.6. Biochemical assays

2.6.1. Heart antioxidant enzyme activity

In order to assess the effects of exercise training and/or CO exposure on the antioxidant capacity, heart enzymatic antioxidant status was measured in the third set of rats as previously described (n=5/group), (16). Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzymatic activities were evaluated.

2.6.2. Lactate dehydrogenase activity in coronary effluents

LDH activity, used as an index of cell membrane damage, was measured in coronary effluents at 5 min of reperfusion. LDH activity was measured spectrophotometrically using a LDH kit (LDH-P, BIOLABO SA, France).

2.6.3. Western blot analysis

Proteins were separated using 4-20 % SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane (Protran, Schleichen and Schuele, Dassel, Germany). Membranes were incubated overnight at 4°C with the SERCA-2a antibody (A010-20, Badrilla, UK), and levels were expressed relative to glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) content on the same membrane. Immunodetection was

carried out using the ECL Plus system (Amersham Pharmacia, Little Chalfont Buckinghamshire, England).

2.7. Statistics

Data were analyzed using either one-way factorial or repeated measures ANOVA. When significant interactions were found, a Student-Newman-Keuls test was applied. Binomially distributed variables (such as incidence of ventricular fibrillations) were analyzed using a non parametric Yates' chi square test (Statview; Adept scientific, Letchworth, UK). A level of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Data are expressed as group means or group mean fractions of baseline \pm S.E.

3. Results

3.1. Contraction and Ca²⁺ handling in single cells

Chronic exposure to CO pollution decreased SL shortening (Fig. 1 AB), increased diastolic cytosolic Ca²⁺ (Fig. 1 CD), and decreased the amplitude of the Ca²⁺ transient (Fig. 1 CE). In addition, the decay kinetics (tau) of the Ca²⁺ transient were impaired (Fig. 1 F), which was explained by a decrease in SERCA-2a expression in CO rats (Fig. 1 G). Exercise training prevented both SERCA-2a reduction (Fig. 1 G) and Ca²⁺ handling alterations (Fig. 1 DEF). Exercise training therefore preserved normal SL shortening, which was similar to that of rats living in standard filtered air (Fig. 1 AB).

3.2. Myocardial enzymatic antioxidant status.

After 4 weeks of sustained CO exposure, myocardial enzymatic antioxidant status was depressed. The SOD and GPx activities were reduced in CO-Sed rats compared to Ctrl-Sed rats (Fig. 2 AB). Exercise training prevented these deleterious effects as SOD and GPx activities did not differ between CO-Ex rats and Ctrl-Sed rats. In contrast, no effect from CO exposure or exercise training was reported on CAT activity (Fig. 2 C).

3.3. Infarct size and myocardial cells death.

Cardiac cells death induced by IR was aggravated by prolonged CO exposure (Fig. 3 AB). Indeed, infarct size was higher in CO rats than in controls. In addition, LDH release, measured in coronary effluents at the time of post-ischemic myocardial reperfusion and used as an index of cell membrane damage, was higher in CO exposed rats than in their counterparts. The promoting effect of CO exposure on myocardial necrosis was fully prevented by regular exercise as no difference in infarct size was observed between CO-Ex and Ctrl-Sed rats (Fig. 3 AB). Consistently, the same result was obtained regarding the effects of exercise on LDH release during post-ischemic reperfusion (Fig. 3 C).

3.4. Myocardial reperfusion arrhythmias.

Although no difference was observed in the incidence of VF (33 %, Ctrl-Sed vs. 50 % CO-Sed), chronic CO exposure was responsible for a marked increase in the severity of post-ischemic reperfusion VF. Indeed, sustained VF (Fig. 3 D) occurred in 25 % of CO-Sed rats, whereas this phenomenon was not observed in Ctrl-Sed rats (Fig. 3 E). Interestingly the pronounced deleterious effect of CO exposure on the severity of reperfusion arrhythmias was fully prevented by exercise training since no VF was reported in CO-Ex rats (Fig. 3 E).

4. Discussion

The major results of this study are that endurance training prevents the deleterious effects of sustained CO exposure on myocardial antioxidant status, cellular Ca²⁺ handling and myocardial vulnerability to IR injury.

4.1. CO exposure and cardioprotective effects of exercise training

In line with previous reports, including ours, we confirmed here deleterious effects of simulated urban CO exposure on enzymatic antioxidant status and cardiomyocyte Ca²⁺ handling (1, 4). Low and sustained levels of CO exposure promoted pathological cardiac remodelling with impaired Ca²⁺ handling due to increased diastolic Ca²⁺, decreased Ca²⁺ transient and Ca²⁺ reuptake in the sarcoplasmic reticulum (SR) due to reduced SERCA-2a expression (1, 4). These changes are related to CO-induced oxidative stress (16, 34), being associated with altered redox (1) and enzymatic antioxidant statuses (1, 16).

One main result of the present study was that exercise training conducted prior to CO exposure, successfully prevented the deleterious effects of CO exposure on myocardial enzymatic antioxidant activities (SOD and GPx). Even if the underlying mechanisms are not fully understood yet, exercise training is well-recognized today as one of the most efficient cardioprotective strategies, notably through the enhancement of myocardial antioxidant status (2, 7, 12-14). Consistently, exercise preserved antioxidant status and, thereby, prevented cytosolic Ca²⁺ overload and depressed Ca²⁺ transient in CO-trained rats, in line with various reports of beneficial effects of exercise training on Ca²⁺ handling in pathological population (19, 26, 29).

Maintenance of normal SERCA-2a expression mainly explained this benefit on Ca^{2+} homeostasis. Although direct effects of exercise training on SERCA-2a expression could not be ruled out (19, 30), our results are consistent with indirect effects mediated by the normalization of enzymatic antioxidant status on this redox sensitive protein (8, 18, 28, 31).

4.2. Endurance training and sensitivity to IR consecutive to CO exposure

We recently reported that sustained CO-exposure increased the vulnerability to IR (16). We showed here that occurrence of sustained ventricular fibrillations and cellular death were enhanced after IR in CO-Sed rats. Our results are in line with the well-reported determinant role of oxidative stress and Ca^{2+} overload in the severity of post-ischemic reperfusion arrhythmias, cardiac dysfunction, and irreversible cardiomyocyte damages (5, 6, 20, 33). A major result of our study was that endurance training, by preventing CO-induced cellular alterations, fully prevented the worsened sensitivity of CO rats to IR. This is in accordance with numerous studies supporting the successful cardioprotective effect of exercise training against IR injuries (2, 7, 11, 22, 23). This beneficial effect has been largely proposed to reflect improved myocardial enzymatic antioxidant status (7, 9, 22, 32). In our work, normalization of enzymatic antioxidant activities certainly contributed to decrease the sensitivity of CO-rat hearts to IR. In addition, various studies also reported the preservation of Ca^{2+} homeostasis as being a key factor for improvement in ischemic heart disease tolerance (27). In particular, the functional level of SERCA-2a is one of the factors that determines intracellular Ca^{2+} overload following IR injuries (21, 27). Taken together, our results show that indirect effects (mediated by antioxidant

effects) or/and direct beneficial effects of exercise on SERCA-2a expression play a major role to normalize heart vulnerability to IR in rats exposed to sustained CO.

Taken together, our results demonstrate that regular exercise training mainly prevents the toxicity of prolonged exposure to environmental CO due to urban pollution. These results point out the essential role of CO-induced cellular Ca²⁺ handling and antioxidant status alterations in the higher vulnerability of CO rats' myocardium to IR and the prevention of these alterations by exercise training. Endurance training, recognized as an efficient antioxidant strategy, seems to be a relevant cardioprotective approach capable of preventing higher cardiac vulnerability to ischemic stress. Given that exposure to air pollutants is an important health issue, responsible for 800,000 premature deaths worldwide each year and with increases in the risk of mortality from cardiovascular disease by 76% (17), such a workable preventive strategy is very attractive and deserves further interests.

5. Grants

This work was supported by a French National Research Agency grant (COMYOCARD).

6. Author Disclosure Statement.

No competing financial interests exist

7. Bibliography

1. **Andre L, Boissiere J, Reboul C, Perrier R, Zalvidea S, Meyer G, Thireau J, Tanguy S, Bideaux P, Hayot M, Boucher F, Obert P, Cazorla O, and Richard S.** Carbon Monoxide Pollution Promotes Cardiac Remodeling and Ventricular Arrhythmia in Healthy Rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009.
2. **Ascensao A, Ferreira R, and Magalhaes J.** Exercise-induced cardioprotection--biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol* 117: 16-30, 2007.
3. **Burnett RT, Cakmak S, Brook JR, and Krewski D.** The role of particulate size and chemistry in the association between summertime ambient air pollution and hospitalization for cardiorespiratory diseases. *Environ Health Perspect* 105: 614-620, 1997.
4. **Bye A, Sorhaug S, Ceci M, Hoydal MA, Stolen T, Heinrich G, Tjonna AE, Najjar SM, Nilsen OG, Catalucci D, Grimaldi S, Contu R, Steinshamn S, Condorelli G, Smith GL, Ellingsen O, Waldum H, and Wisloff U.** Carbon monoxide levels experienced by heavy smokers impair aerobic capacity and cardiac contractility and induce pathological hypertrophy. *Inhal Toxicol* 20: 635-646, 2008.
5. **Dhalla NS, Temsah RM, and Netticadan T.** Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18: 655-673, 2000.
6. **Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G, and Zweier JL.** Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15081-15086, 2007.

7. **French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA, and Powers SK.** Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *Faseb J* 22: 2862-2871, 2008.
8. **Grover AK, Samson SE, Robinson S, and Kwan CY.** Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C294-301, 2003.
9. **Hamilton KL, Quindry JC, French JP, Staib J, Hughes J, Mehta JL, and Powers SK.** MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radic Biol Med* 37: 1360-1368, 2004.
10. **Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, and Powers SK.** Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 34: 800-809, 2003.
11. **Kavazis AN.** Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med* 39: 923-935, 2009.
12. **Kavazis AN, McClung JM, Hood DA, and Powers SK.** Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H928-935, 2008.
13. **Lennon SL, Quindry JC, French JP, Kim S, Mehta JL, and Powers SK.** Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand* 182: 161-169, 2004.
14. **Lew H and Quintanilha A.** Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidative capacity and acetaminophen detoxification. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 16: 59-68, 1991.
15. **Mann JK, Tager IB, Lurmann F, Segal M, Quesenberry CP, Jr., Lugg MM, Shan J, and Van Den Eeden SK.** Air pollution and hospital admissions for ischemic heart disease

in persons with congestive heart failure or arrhythmia. *Environ Health Perspect* 110: 1247-1252, 2002.

16. **Meyer G, Andre L, Tanguy S, Boissiere J, Farah C, Lopez-Lauri F, Gayrard S, Richard S, Boucher F, Cazorla O, Obert P, and Reboul C.** Simulated urban carbon monoxide air pollution exacerbates rat heart ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1445-1453, 2010.

17. **Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, Shepherd K, Sullivan JH, Anderson GL, and Kaufman JD.** Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med* 356: 447-458, 2007.

18. **Morris TE and Sulakhe PV.** Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 22: 37-47, 1997.

19. **Mou YA, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, and Cazorla O.** Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res* 81: 555-564, 2009.

20. **Murphy E and Steenbergen C.** Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 88: 581-609, 2008.

21. **Niwano K, Arai M, Koitabashi N, Watanabe A, Ikeda Y, Miyoshi H, and Kurabayashi M.** Lentiviral vector-mediated SERCA2 gene transfer protects against heart failure and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Mol Ther* 16: 1026-1032, 2008.

22. **Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, and Jessup J.** Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol* 275: R1468-1477, 1998.

23. **Powers SK, Quindry JC, and Kavazis AN.** Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 44: 193-201, 2008.

-
24. **Ruiz-Meana M and Garcia-Dorado D.** Translational cardiovascular medicine (II). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 62: 199-209, 2009.
25. **Samoli E, Touloumi G, Schwartz J, Anderson HR, Schindler C, Forsberg B, Vigotti MA, Vonk J, Kosnik M, Skorkovsky J, and Katsouyanni K.** Short-term effects of carbon monoxide on mortality: an analysis within the APHEA project. *Environ Health Perspect* 115: 1578-1583, 2007.
26. **Stolen TO, Hoydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, Larsen T, Rolim N, Condorelli G, Smith GL, and Wisloff U.** Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res* 105: 527-536, 2009.
27. **Talukder MA, Zweier JL, and Periasamy M.** Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 84: 345-352, 2009.
28. **Viner RI, Krainev AG, Williams TD, Schoneich C, and Bigelow DJ.** Identification of oxidation-sensitive peptides within the cytoplasmic domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Biochemistry* 36: 7706-7716, 1997.
29. **Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, and Ellingsen O.** Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 54: 162-174, 2002.
30. **Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, and Ellingsen O.** Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res* 50: 495-508, 2001.
31. **Xu KY, Zweier JL, and Becker LC.** Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res* 80: 76-81, 1997.

32. **Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, and Hori M.** Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 189: 1699-1706, 1999.
33. **Zhao X, Chen YR, He G, Zhang A, Druhan LJ, Strauch AR, and Zweier JL.** Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) knockout decreases NOS2 induction, limiting hyperoxygenation and conferring protection in the postischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1541-1550, 2007.
34. **Zuckerbraun BS, Chin BY, Bilban M, d'Avila JC, Rao J, Billiar TR, and Otterbein LE.** Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Faseb J* 21: 1099-1106, 2007.

Legends to figures

Fig. 1. Effects of exercise training and CO exposure on sarcomere length (SL) shortening and Ca^{2+} handling in cardiomyocytes. A, Representative contraction of intact cardiomyocytes measured by sarcomere shortening at 0.5 Hz. B, Amplitude of sarcomere length shortening. Data are presented as percentage of baseline. C, Representative Ca^{2+} transient during cardiomyocyte excitation-contraction. D, Diastolic intracellular Ca^{2+} . E, Ca^{2+} transient amplitude. F, Ca^{2+} reuptake kinetics (Tau). G, Cardiac expression of SERCA-2a. The GAPDH blot (37KDa) was used as a loading control to normalize SERCA-2a protein expression. Data are presented as mean \pm S.E. (n=5 per group, one way ANOVA; §, p<0.05 Ctrl-Sed vs. CO-Sed, *, p<0.05 CO-Sed vs. CO-Ex).

Fig. 2. Effects of exercise training and CO exposure on myocardial antioxidant enzyme activities. A, Superoxide dismutase (SOD) activity; B, Glutathione peroxidase (GPx) activity; C, Catalase (CAT) activity. Activities are expressed in U/mg of protein. Data are presented as mean \pm S.E. (n=5 per group, one way ANOVA; §, p<0.05 Ctrl-Sed vs. CO-Sed, *, p<0.05 CO-Sed vs. CO-Ex).

Fig. 3. Effects of exercise training and CO exposure on IR-induced cellular death and post-ischemic ventricular fibrillations. A, Representative sections of area at risk and infarct size of rat hearts stained respectively with Evans Blue and triphenyltetrazolium chloride (TTC) after 30 min regional ischemia and 120 min reperfusion from isolated

heart experiments in each experimental group. B, Infarct sizes expressed as percentage of area at risk. Data are presented as mean \pm S.E. (Ctrl-Sed n=7, CO-Sed n=6, CO-Ex- n=6, one way ANOVA; §, $p < 0.05$ Ctrl-Sed vs CO-Sed, *, $p < 0.05$ CO-Sed vs CO-Ex). C, LDH activity observed in coronary effluents at 5 min of reperfusion and used as a marker of cell death. Data are presented as mean \pm S.E.(Ctrl-Sed n=9, CO-Sed n=7, CO-Ex n=10, one way ANOVA; §, $p < 0.05$ Ctrl-Sed vs. CO-Sed, *, $p < 0.05$ CO-Sed vs. CO-Ex). D, Representative plot of ventricular fibrillation (VF). E, Incidence of ventricular fibrillations occurring during the 5 first minutes of reperfusion. Data are presented as percentage of rats per experimental group. (Ctrl-Sed n=6, CO-Sed n=8, CO-Ex n=9, non parametric Yates' chi square test; §, $p < 0.05$ Ctrl-Sed vs. CO-Sed, *, $p < 0.05$ CO-Sed vs. CO-Ex).

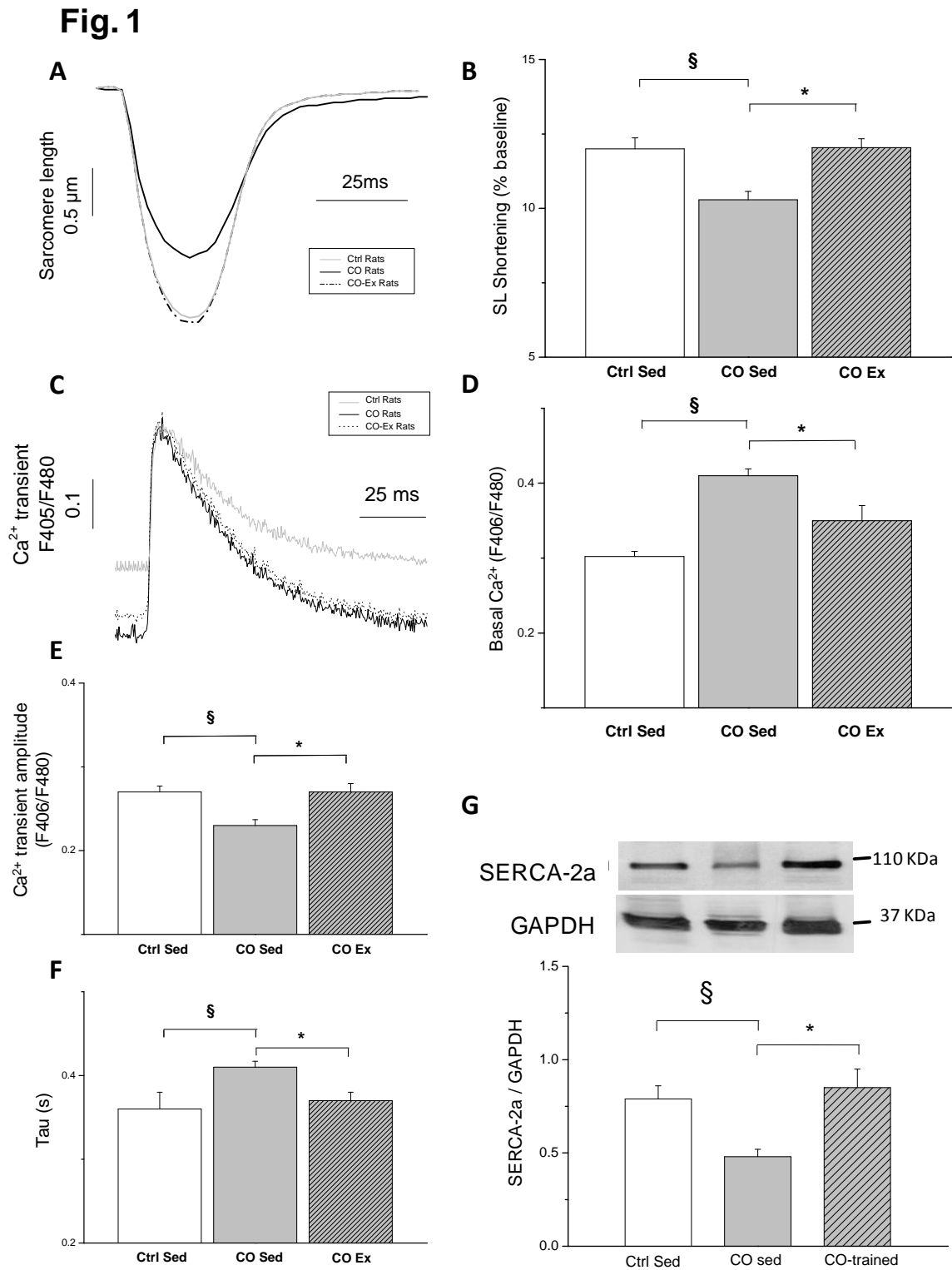


Fig. 2

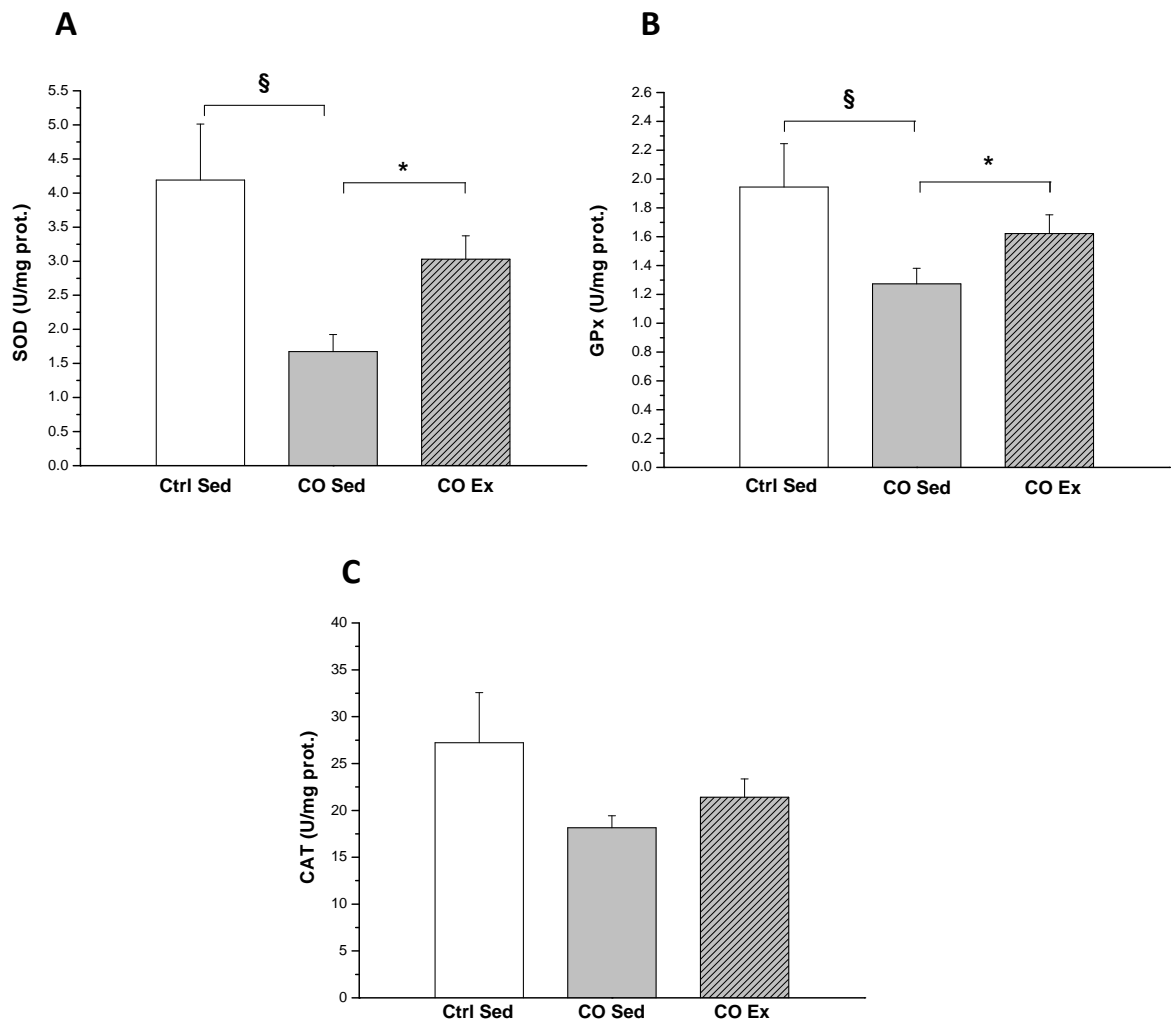
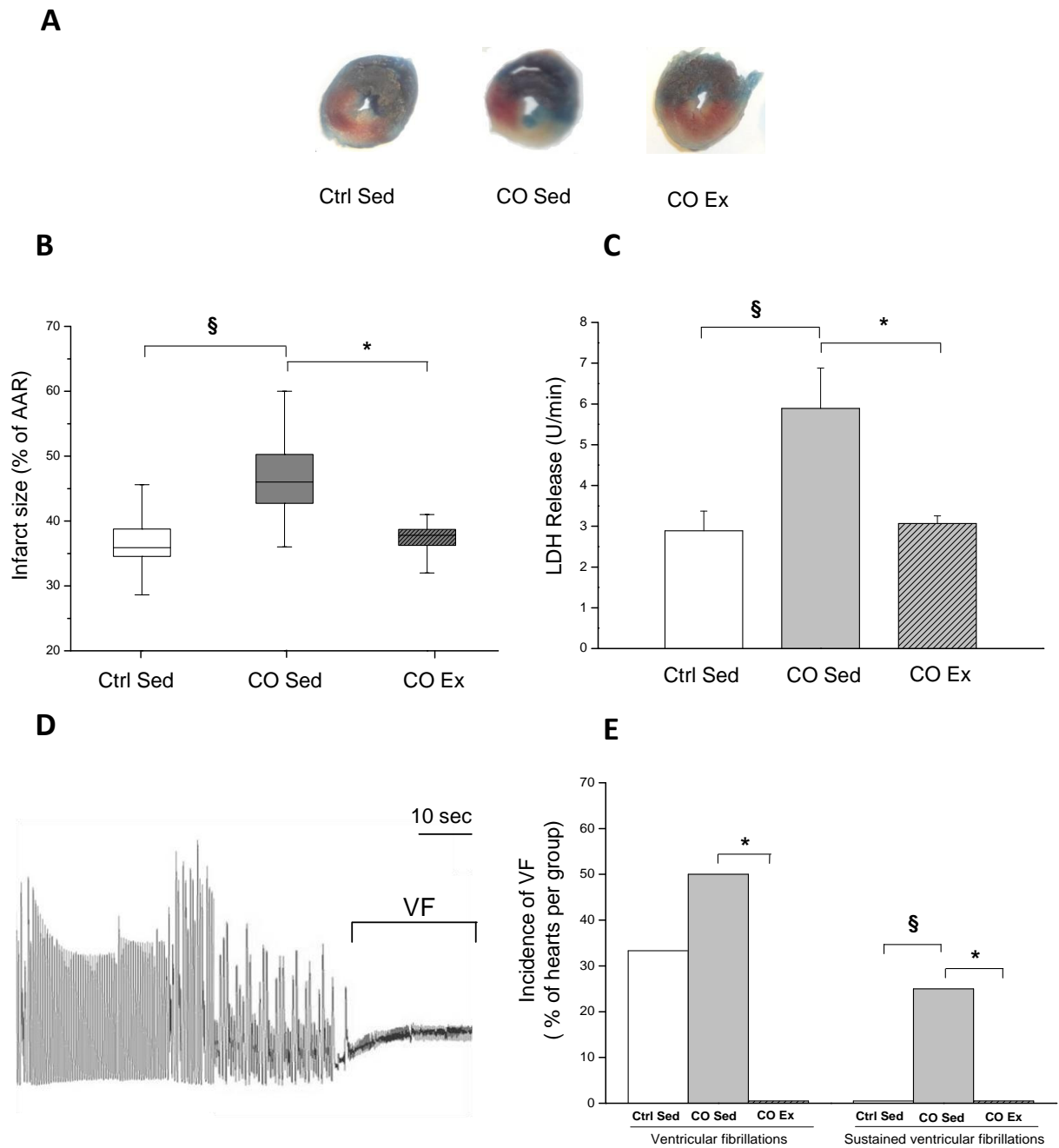


Fig. 3



Discussion

I. Exposition prolongée à de faibles concentrations de CO et sensibilité du myocarde à l'IR

L'exposition prolongée à de faibles concentrations de CO, telles que retrouvées dans le cadre d'une pollution urbaine, est reconnue comme étant à l'origine d'un remodelage pathologique cardiomyocytaire (Bye et al., 2008 ; Andre et al., 2010) caractérisé notamment par une altération de la régulation des mouvements du Ca^{2+} intracellulaire. L'hyperphosphorylation PKA-dépendante des RyR-2 associée à une diminution de l'expression des pompes SERCA-2a au niveau du RS semblent être à l'origine de ce phénomène avec pour conséquence une surcharge sarcoplasmique diastolique en Ca^{2+} . Ces altérations cellulaires, également retrouvées dans notre travail, sont discutées par Andre et al., (2010) comme pouvant résulter d'un stress oxydant exacerbé chez la population de rats CO. En effet, l'exposition prolongée au CO est à l'origine d'une baisse marquée des défenses enzymatiques antioxydantes associée à une modification du statut redox cardiomyocytaire (Andre et al., 2010 ; étude n°1). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les protéines régulant l'homéostasie calcique intracellulaire sont aujourd'hui largement décrites comme étant « rédox » sensibles (Zima et Blatter, 2006). Ainsi, une augmentation du stress oxydant cellulaire est rapporté comme étant à l'origine d'une hyperphosphorylation PKA-dépendante des canaux RyR-2, avec comme conséquence principale une fuite de Ca^{2+} du RS (Gyorke et Carnes, 2008 ; Sun et al., 2008) et une oxydation des pompes SERCA-2a, à l'origine d'un moindre recaptage du Ca^{2+} par le RS (Kobayashi et al., 2007 ; Kuster et al., 2010). Ainsi, en condition de stress oxydant, la fuite de Ca^{2+} (hyperphosphorylation des RyR-2) associée à l'altération du repompage calcique (oxydation des SERCA-2a), se traduit par une baisse de la charge calcique du RS et une augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} .

Un premier résultat majeur de ce travail de thèse (étude n°1) est que, le remodelage pathologique des myocytes cardiaques, résultant d'une exposition prolongée à une pollution de type environnementale urbaine au CO est à l'origine d'une plus grande vulnérabilité du cœur au stress d'IR. Celle-ci est caractérisée, dans notre travail, par une sévérité accrue des arythmies de reperfusion, une augmentation de la mort cellulaire au cours de la reperfusion et une moindre récupération de la fonction contractile cardiaque. L'aggravation des lésions d'IR chez la population de rats CO semble pouvoir être expliquée dans notre travail par i) une diminution des capacités de défenses enzymatiques antioxydantes, et ii) une surcharge calcique cellulaire, certainement à l'origine d'une instabilité membranaire, confirmant ainsi notre hypothèse impliquant le stress oxydant dans les désordres observés.

L'augmentation massive de la production de RLO au moment de la reperfusion post-ischémique, joue un rôle majeur dans le développement des lésions de reperfusion (Zweier, 1988 ; Vanden Hoek et al., 1996). Il est ainsi largement reconnu qu'une altération du statut enzymatique antioxydant est à l'origine d'une exacerbation des lésions liées au stress oxydant au cours de la reperfusion post-ischémique (Yoshida et al., 2000 ; Marczin et al., 2003 ; Van Remmen et al., 2004). Dans notre travail, l'incubation d'un antioxydant non spécifique (NAC) au cours du protocole d'A/R cellulaires, permet de limiter la sévérité des atteintes fonctionnelles cardiomyocytaires.

Les effets protecteurs de l'incubation d'un antioxydant non spécifique semblent pouvoir être expliqués, dans ce travail, par une normalisation de la surcharge cytosolique en Ca^{2+} au cours de la reperfusion. En effet, à l'étage cellulaire, l'état pro-oxydant est associé chez les rats exposés au CO à une altération de la régulation des mouvements de Ca^{2+} intracellulaires, ayant comme conséquence majeure une surcharge cytosolique en Ca^{2+} . Le rôle du Ca^{2+} cytosolique dans la sévérité des lésions de reperfusion est aujourd'hui largement décrit (Netticadan et al., 1999 ; Abdallah et al., 2006 ; Venetucci et al., 2008). Ainsi, cette

surcharge ionique, induite au cours du phénomène d'IR est reconnue comme pouvant être à l'origine de modifications électrophysiologiques favorisant l'apparition de troubles du rythme (Marban et al., 1994 ; Antoons et Sipido 2008), d'altérations fonctionnelles contractiles (Valverde et al., 2010), mais également de l'initiation de processus conduisant à la mort de la cellule par nécrose ou apoptose, via différents mécanismes tels que l'ouverture du mPTP (Crompton, 1999), une hypercontracture myocytaire associée à une peroxydation des phospholipides membranaires (Ganote, 1983) ou encore l'activation de différentes protéases à activité Ca^{2+} -dépendantes telles que les calpaines (Liu et al., 2004). Dès lors, il semble que chez la population de rats CO, l'exacerbation, stress oxydant-dépendante, de la surcharge cytosolique en Ca^{2+} au cours de la reperfusion myocardique soit impliquée de manière majeure dans la sensibilité accrue du cœur au syndrome d'IR.

Un résultat original de ce travail de thèse est que l'exposition au CO, caractérisée à l'échelle cellulaire par un état pro-oxydant, mais aussi pro-inflammatoire (identifié ici par l'expression myocardique de $TNF-\alpha$), est à l'origine d'une surexpression tissulaire de l'isoforme inductible de la NOS (iNOS) (étude n°2). Cette surexpression de iNOS a pour conséquence principale une surproduction de NO au niveau myocardique chez les rats CO. Le rôle de la iNOS au cours de l'IR myocardique est encore sujet à controverses. En effet, certaines études mettent en avant le rôle de la iNOS dans le préconditionnement myocardique à l'IR (Zhao et al., 1997 ; Imagawa et al., 1999), alors que dans un grand nombre de travaux l'expression tissulaire de cette enzyme est associée à une aggravation des lésions d'IR (Wildhirt et al., 1997 ; Wildhirt et al., 1999 ; Wang et al., 2007 ; Ji et al., 2010). La iNOS est une enzyme exprimée dans des conditions pathologiques sous l'influence de produits bactériens, de cytokines pro-inflammatoires ou encore du stress oxydant (Xie et al., 1994 ; Zhen et al., 2008). Contrairement aux isoformes constitutifs de la NOS, la synthèse de NO par la iNOS n'est pas régulée de façon post-traductionnelle et est Ca^{2+} indépendante (Cho et al.,

1992 ; Xia, 2007). Ainsi l'expression tissulaire de cet isoforme peut être à l'origine d'une synthèse de NO jusqu'à 100 fois supérieure à celle induite par les isoformes constitutifs (Pacher et al., 2007). Bien que le NO soit reconnu comme bénéfique et cardioprotecteur dans des conditions physiologiques, il peut s'avérer délétère lorsqu'il est produit en trop grande quantité (Shah et MacCarthy, 2000). En effet, il a été démontré que le NO libre, lorsque synthétisé en grande quantité par la iNOS, a tendance en condition pro-oxydante, à réagir avec l' $O_2^{\cdot-}$ pour former du $ONOO^-$ (Mungrue et al., 2002 ; Billiar, 1995). Cette réaction se fait à une vitesse 5 fois supérieure à celle de la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ par la SOD (Pacher et al., 2007). Le $ONOO^-$ ainsi produit est un EROA hautement réactif, reconnu comme étant le principal responsable d'un grand nombre de réactions cytotoxiques impliquées dans les lésions du tissu myocardique lors de l'IR (Yasmin et al. 1997 ; Wang et al., 2007 ; Ji et al., 2010). Plusieurs études ont notamment rapporté un rôle délétère majeur du $ONOO^-$ sur les protéines régulatrices des mouvements calciques intracellulaire telles que les SERCA-2a (Lokuta et al., 2005) et les RyR-2 (Stoyanovsky et al., 1997 ; Xu et al., 1998) contribuant ainsi à perturber l'homéostasie calcique au cours de l'IR. Par conséquent, la potentielle formation en excès de $ONOO^-$ chez la population de rats CO, lié à la surproduction de NO par la iNOS, pourrait, également contribuer à l'exacerbation des lésions cellulaires au cours de l'IR. Cette hypothèse est en partie confirmée lors de la phase cellulaire de notre étude n°2, puisque l'inhibition des précurseurs de la formation de $ONOO^-$, $O_2^{\cdot-}$ et NO, par l'incubation respective de NAC et de SMT, a permis de normaliser la surcharge calcique cytosolique consécutive à l'A/R et ainsi de réduire la sensibilité des cardiomyocytes de rats CO au stress d'A/R. A l'étage de l'organe isolé, il est d'ailleurs intéressant de noter que l'inhibition spécifique et exclusive de la iNOS au cours de l'IR permet de normaliser la sévérité des lésions de reperfusion post-ischémique chez les rats CO au niveau des rats Ctrl. Ce résultat

suggère donc un rôle majeur de la surproduction iNOS-dépendante de NO au cours de l'IR dans la physiopathologie d'une exposition de type citadine au CO.

La surproduction de NO par la iNOS myocardique, en condition pro-oxydante exacerbée (baisse de l'activité enzymatique antioxydante), semble jouer un rôle majeur dans les troubles de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire. Ce phénomène, à l'origine d'une surcharge calcique cytosolique est rapporté dans ce travail comme étant responsable de la plus grande vulnérabilité du cœur à un stress d'IR chez des rats exposés pendant 4 semaines à une pollution de type environnementale urbaine au CO, (Figure 1).

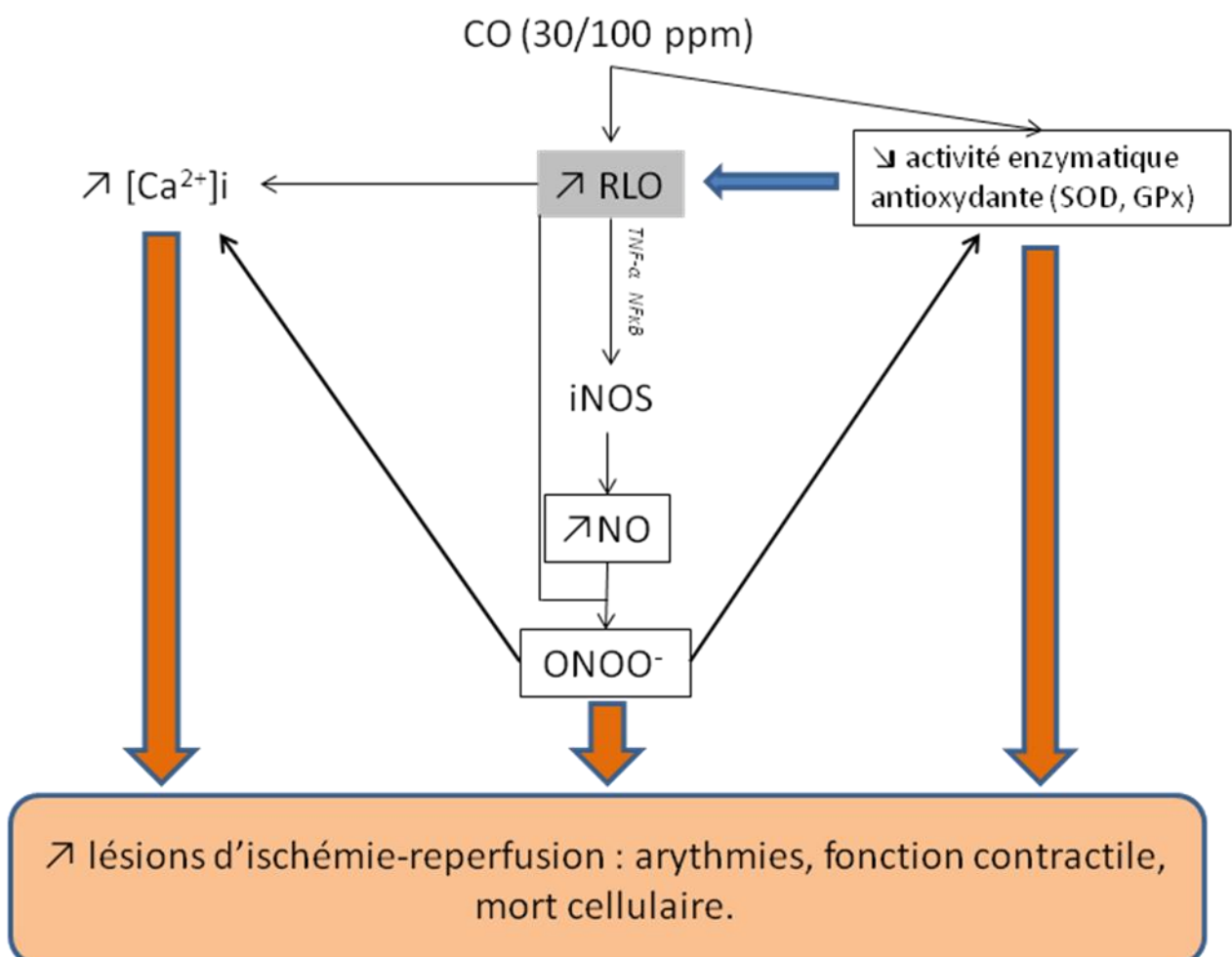


Figure 31 : Mécanismes délétères du CO entraînant le développement d'un phénotype cellulaire pathologique et à l'origine d'une plus grande sensibilité à l'IR.

II. Entraînement en endurance et cardioprotection

Comme discuté préalablement dans ce travail, le stress environnemental lié à l'exposition au CO est à l'origine d'un remodelage pathologique cardiomyocytaire, caractérisé notamment par i) une hausse du stress oxydant cellulaire et ii) une altération de l'homéostasie calcique intracellulaire. Ce remodelage cellulaire consécutif à 4 semaines d'exposition au CO semble jouer un rôle majeur dans la plus grande sensibilité du myocarde au syndrome d'IR. Dès lors, un autre objectif de ce travail de thèse était d'évaluer les effets potentiellement cardioprotecteurs d'un exercice physique régulier sur le remodelage pathologique cardiomyocytaire et sur la sensibilité du myocarde de rats CO au syndrome d'IR. L'exercice est en effet classiquement reconnu comme étant responsable d'une amélioration du statut enzymatique antioxydant et d'une amélioration/restauration des mouvements intracellulaires de Ca^{2+} (Powers et al., 2008 ; Kemi et Wisloff, 2010). Dans notre travail, la pratique d'une activité physique régulière, préalablement à la période d'exposition environnementale, a permis de prévenir les effets délétères du CO sur la régulation de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire. En effet, alors que l'on observe au niveau des cardiomyocytes de rats exposés au CO une surcharge calcique cytosolique expliquée notamment par une fuite de Ca^{2+} au niveau du RS et un moindre repompage de cet ion, conséquence d'une baisse d'expression des pompes SERCA-2a ; les rats CO entraînés en endurance, présentent un phénotype cellulaire sain, caractérisé notamment par une concentration intracellulaire en Ca^{2+} normalisée. Ce résultat est expliqué dans ce travail par une restauration de l'expression des pompes SERCA-2a permettant ainsi une restauration de la séquestration du Ca^{2+} dans le RS. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, puisque dans les différentes études centrées sur les effets bénéfiques de l'exercice chez des populations présentant des pathologies cardiaques, il est classiquement rapporté une

normalisation et/ou une amélioration des mouvements calciques intracellulaires à l'issue d'une période d'activité physique régulière (Wisloff et al., 2001 ; Kemi et al., 2008 ; Kemi et Wisloff, 2010). Dans ce travail, nous avons également rapporté une prévention des effets délétères du CO sur l'activité enzymatique antioxydante se traduisant par une normalisation de l'activité de la SOD et de la GPx chez les rats CO entraînés. Cette amélioration du statut enzymatique antioxydant suite à un entraînement en endurance pourrait être à l'origine de la prévention des altérations calciques (French et al., 2008). Toutefois, on ne peut écarter de potentiels effets bénéfiques directs de l'entraînement sur les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique (Wisloff et al., 2001 ; Kemi et al., 2005).

Les effets protecteurs de l'exercice sur le remodelage phénotypique des cardiomyocytes de rats exposés au CO sont associés à une normalisation de la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR, constituant un autre résultat majeur de ce travail de thèse. En effet nous avons pu observer, dans ce modèle, une diminution de la sévérité des arythmies de reperfusion et de la mort cellulaire chez les rats exposés au CO et préalablement entraînés en endurance. Comme discuté au chapitre précédent, la sévérité accrue des lésions de reperfusion semble être en grande partie liée aux troubles de l'homéostasie calcique cellulaire (Netticadan et al., 1999 ; Abdallah et al., 2006 ; Venetucci et al., 2008) et à l'altération du statut antioxydant myocardique (Dhalla et al., 1999 ; Dhalla et al., 2000). Dans la littérature, les effets protecteurs de l'exercice permettant de réduire la sévérité des lésions d'IR sont largement décrits (Yamashita et al., 1999 ; Powers et al., 2008). Ces effets sont liés à une amélioration des capacités de défenses enzymatiques antioxydantes, dont notamment la SOD (Powers et al., 2008 ; French et al., 2008) et la GPx (Lew et Quintanilha, 1991 ; Kavazis, 2009), résultats également retrouvés dans ce travail. Les effets cardioprotecteurs de cette normalisation des défenses enzymatiques antioxydantes pourraient donc être directs (Powers et al., 2007), via un meilleur piégeage des RLO au cours de la reperfusion post-ischémique et

donc une meilleure préservation de l'intégrité cellulaire ; mais également indirects via une préservation des effets délétères du stress oxydant sur les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique (French et al., 2008). En effet, il a été mis en évidence dans plusieurs études qu'un entraînement en endurance permettait de réduire la sévérité des lésions d'IR, via notamment une meilleure préservation des mouvements calciques au cours du cycle cardiaque pendant l'IR (French et al., 2006 ; French et al., 2008). Il semble donc, que la normalisation de la sévérité des lésions d'IR chez la population de rats CO préalablement entraînés puisse être expliquée par une préservation du statut enzymatique antioxydant permettant potentiellement une protection des protéines impliquées dans la régulation des mouvements de Ca^{2+} intracellulaire, dont les pompes SERCA-2a.

Un résultat majeur de ce travail est qu'une stratégie de cardioprotection par un exercice d'intensité modérée pratiqué de manière régulière, permet de prévenir le remodelage pathologique cardiomyocytaire, via notamment une prévention des effets délétères du CO sur les capacités de défenses enzymatiques antioxydantes myocardiques et une normalisation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique basale. Cette normalisation du phénotype cellulaire myocardique a notamment permis de prévenir la plus grande vulnérabilité du myocarde au syndrome d'IR.

III. Conclusion

Ce travail de doctorat a permis de mettre en avant les effets aggravants d'une exposition de type environnementale urbaine au CO sur la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR. En effet, alors qu'il avait été clairement rapporté dans une étude préalable que

ce type de stress environnemental était à l'origine d'un remodelage pathologique cardiomyocytaire (Andre et al., 2010), les conséquences de ce phénotype cellulaire altéré sur la cohérence fonctionnelle myocardique ne semblait pas apparaître comme étant majeur. Dès lors, nos travaux mettant en évidence des effets potentiellement aggravants du CO sur le pronostic vital post-infarctus, permettent, au moins en partie, de mieux appréhender la relation mise en avant dans les enquêtes épidémiologiques, entre pollution citadine au CO et morbi-mortalité cardiovasculaire (Samoli et al., 2008 ; Stieb et al., 2009 ; Bell et al., 2009). Par ailleurs, ce travail de thèse a permis, via l'étude des différents mécanismes potentiellement impliqués dans ce phénomène, de mettre en avant des cibles cellulaires d'intérêts dans la mise en place de stratégies de prévention des effets cardiovasculaires néfastes d'une pollution de type urbaine au CO. Parmi ces cibles nous pouvons notamment retenir les protéines de l'homéostasie calcique, le statut enzymatique antioxydant et la iNOS. Ainsi, de nouvelles études pharmacologiques, permettant notamment de renforcer les défenses antioxydantes et/ou d'inhiber spécifiquement la iNOS au cours de la période d'exposition au CO, semble être nécessaires afin d'améliorer la compréhension des effets physiopathologiques cardiovasculaires d'une exposition de type environnementale urbaine au CO.

Enfin, un autre résultat majeur de ce travail est qu'une activité physique régulière même pratiquée à intensité modérée, telle que conseillée par l'OMS (OMS et FIMS, 1995), permet de prévenir le remodelage pathologique des cardiomyocytes de rats exposés au CO et ainsi d'améliorer le pronostic vital post-infarctus. Ces résultats méritent d'être confirmés, *in-vivo* sur un modèle de rongeur, puis chez l'homme, et doivent donc être pris avec beaucoup de précautions. Néanmoins, il semblerait que chez les sujets exposés de manière prolongée et régulière à une pollution atmosphérique urbaine, notamment au CO, la pratique régulière d'un exercice physique à intensité modérée en environnement sain non pollué soit particulièrement

pertinente afin de lutter contre le développement d'un phénotype cardiaque à risque, voire pathologique.

Perspectives

Les résultats présentés dans ce travail suggèrent une potentielle implication de la formation de ONOO⁻ consécutive à la surproduction de NO par la iNOS, dans les effets délétères du CO. Ainsi, une première perspective de ce travail de thèse serait de tenter de mieux comprendre l'implication, dans notre modèle, de la formation de ONOO⁻ dans la sévérité accrue des lésions d'IR. Ainsi il serait intéressant de pouvoir comparer la production de ONOO⁻ entre les cœurs de rats CO et de rats Ctrl au cours de l'IR. Pour cela une évaluation de la formation de dityrosine comme le préconise Yasmin et al., (1996), permettrait d'évaluer de façon indirecte la synthèse de ONOO⁻ dans le myocarde. De plus, nous avons rapporté dans notre travail que la surproduction iNOS-dépendante de NO, certainement à l'origine de la formation de ONOO⁻, était certainement responsable de la surcharge calcique exacerbée au cours de l'IR chez la population de rats CO. Ainsi, il semblerait particulièrement pertinent, dans ce modèle, d'évaluer l'état de nitrosylation des protéines régulatrices de l'homéostasie calcique en condition basale mais aussi au cours de l'IR. Enfin, afin d'évaluer l'implication du ONOO⁻ dans l'aggravation des lésions de reperfusion chez notre modèle de rats exposés au CO, il apparaît essentiel de pouvoir inhiber les effets du peroxy-nitrite au cours de l'IR. L'acide urique était à ce jour décrit comme un des seuls inhibiteurs du ONOO⁻, néanmoins son action est rapporté comme étant peu efficace (Kuzkaya et al., 2005). Récemment, depuis les travaux de Jiao et al., (2009), l'INO-4885 apparaît comme un catalyseur efficace de la décomposition du ONOO⁻, notamment au cours de l'IR. Afin d'évaluer l'implication de la formation de ONOO⁻ dans la sensibilité accrue du myocarde au syndrome d'IR chez la population de rats CO, il semblerait intéressant de pouvoir réaliser ce même protocole d'IR en présence ou non d'INO-4885.

Dans ce travail de thèse nous avons également mis en évidence qu'un entraînement en endurance, préalable à la période d'exposition au CO, permettait de prévenir le

développement des altérations du statut enzymatique antioxydant et de la régulation du Ca^{2+} . Cependant, nous n'avons pas pu évaluer, dans ce travail de thèse, les effets de l'exercice sur l'expression myocardique de la iNOS. Etant donné l'impact de la surproduction iNOS-dépendante de NO sur la régulation de l'homéostasie calcique, une des hypothèses de ce travail serait que les effets cardioprotecteurs de l'exercice, dans notre modèle de rats exposés au CO, puissent être liés à une régulation/prévention de l'expression de la iNOS dans le tissu cardiaque. Il semblerait donc intéressant d'évaluer, chez la population de rats exposés au CO et préalablement entraînés, la production de NO par le tissu cardiaque et l'expression induite de cet isoforme de la NOS.

Enfin, dans notre 3^{ème} étude, les bénéfices d'un entraînement en endurance, conduit en environnement sain ont été mis en évidence. La pratique d'une activité physique régulière en environnement non pollué a permis de prévenir le développement du phénotype cellulaire pathologique et ainsi de prévenir l'exacerbation des lésions d'IR chez les rats exposés au CO. Cette étude semble donc favorable à la pratique sportive régulière dans un but de cardioprotection. Cependant, de nombreuses personnes pratiquent une activité physique en milieu pollué, notamment au CO. Il semblerait donc intéressant par la suite de conduire une étude s'intéressant aux effets d'une activité physique régulière, en milieu pollué au CO, sur le remodelage phénotypique cellulaire et la sensibilité du myocarde à l'IR.

Bibliographie

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schluter KD, Schafer M, Piper HM and Schafer C. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 346-353.

Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.

Amrani M, Chester AH, Jayakumar J, Schyns CJ and Yacoub MH. L-arginine reverses low coronary reflow and enhances postischaemic recovery of cardiac mechanical function. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 200-204.

Andre L, Boissiere J, Reboul C, Perrier R, Zalvidea S, Meyer G, Thireau J, Tanguy S, Bideaux P, Hayot M, Boucher F, Obert P, Cazorla O and Richard S. Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 587-595.

Antoons G and Sipido KR. Targeting calcium handling in arrhythmias. *Europace* 2008; 10: 1364-1369.

Arner ES, Zhong L and Holmgren A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1999; 300: 226-239.

Ascensao A, Magalhaes J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Oliveira PJ and Duarte JA. Endurance training limits the functional alterations of rat heart mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation. *Int J Cardiol* 2006; 109: 169-178.

Atalay M and Sen CK. Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 874: 169-177.

Avkiran M. Protection of the ischaemic myocardium by Na⁺/H⁺ exchange inhibitors: potential mechanisms of action. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 306-311.

Bagchi M, Prasad MR, Engelman RM and Das DK. Effects of free radicals on the fluidity of myocardial membranes. *Free Radic Res Commun* 1989; 7: 375-380.

Bak I, Papp G, Turoczi T, Varga E, Szendrei L, Vecsernyes M, Joo F and Tosaki A. The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 639-648.

Bak I, Szendrei L, Turoczi T, Papp G, Joo F, Das DK, de Leiris J, Der P, Juhasz B, Varga E, Bacskay I, Balla J, Kovacs P and Tosaki A. Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J* 2003; 17: 2133-2135.

Bak I, Varadi J, Nagy N, Vecsernyes M and Tosaki A. The role of exogenous carbon monoxide in the recovery of post-ischemic cardiac function in buffer perfused isolated rat hearts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2005; 51: 453-459.

Balligand JL, Feron O and Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* 2009; 89: 481-534.

Balzan MV, Cacciottolo JM and Mifsud S. Unstable angina and exposure to carbon monoxide. *Postgrad Med J* 1994; 70: 699-702.

Barbe C, Rochetaing A and Kreher P. Ischemic tolerance of the heart by adaptation to chronic hypoxia is suppressed by high subchronic carbon monoxide exposure. *Inhal Toxicol* 2001; 13: 219-232.

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA and Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 2005; 280: 18558-18561.

Becker LC and Ambrosio G. Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis* 1987; 30: 23-44.

Beckman JS and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-1437.

Beers RF, Jr. and Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952; 195: 133-140.

Bell ML, Peng RD, Dominici F and Samet JM. Emergency Hospital Admissions for Cardiovascular Diseases and Ambient Levels of Carbon Monoxide. Results for 126 United States Urban Counties, 1999-2005. *Circulation* 2009.

Benjamin IJ and McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998; 83: 117-132.

Berger A, Zareba W, Schneider A, Ruckerl R, Ibald-Mulli A, Cyrus J, Wichmann HE and Peters A. Runs of ventricular and supraventricular tachycardia triggered by air pollution in patients with coronary heart disease. *J Occup Environ Med* 2006; 48: 1149-1158.

Berges A, Van Nassauw L, Bosmans J, Timmermans JP and Vrints C. Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning. *Acta Cardiol* 2003; 58: 119-132.

Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem* 1992; 267: 8834-8839.

Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999; 79: 1127-1155.

Bernier M, Hearse DJ and Manning AS. Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res* 1986; 58: 331-340.

Berridge MJ, Bootman MD and Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 517-529.

Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Front Biosci* 2002; 7: d1697-1711.

Bers DM and Weber CR. Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 976: 500-512.

Bevan MA, Proctor, C. J., Baker-Rogers, J., and Warren, N. D. Exposure to carbon monoxide, respirable suspended particulates, and volatile organic compounds while commuting by bicycle. *Environ Sci Technol* 1991; 25: 788-779.

Billiar TR. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 1995; 221: 339-349.

Bindoli A, Callegaro MT, Barzon E, Benetti M and Rigobello MP. Influence of the redox state of pyridine nucleotides on mitochondrial sulfhydryl groups and permeability transition. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 22-28.

Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS and Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 2005; 511: 53-64.

Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK and McCay PB. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest* 1988; 82: 476-485.

Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990; 82: 723-738.

Bolli R and Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 609-634.

Borchi E, Parri M, Papucci L, Becatti M, Nassi N, Nassi P and Nediani C. Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischaemia-reperfusion. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2724-2735.

Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R and Brown GC. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 357-366.

Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977; 78: 67-82.

Braunwald E and Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146-1149.

Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951-965.

Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Jr. and Tager I. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 2004; 109: 2655-2671.

Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA and Moore RL. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol* 2005; 569: 913-924.

Brown MD. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp Physiol* 2003; 88: 645-658.

Brown SD and Piantadosi CA. In vivo binding of carbon monoxide to cytochrome c oxidase in rat brain. *J Appl Physiol* 1990; 68: 604-610.

Burnett RT, Cakmak S, Brook JR and Krewski D. The role of particulate size and chemistry in the association between summertime ambient air pollution and hospitalization for cardiorespiratory diseases. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 614-620.

Bye A, Sorhaug S, Ceci M, Hoydal MA, Stolen T, Heinrich G, Tjonna AE, Najjar SM, Nilsen OG, Catalucci D, Grimaldi S, Contu R, Steinshamn S, Condorelli G, Smith GL, Ellingsen O, Waldum H and Wisloff U. Carbon monoxide levels experienced by heavy smokers impair aerobic capacity and cardiac contractility and induce pathological hypertrophy. *Inhal Toxicol* 2008; 20: 635-646.

Carafoli E, Santella L, Branca D and Brini M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2001; 36: 107-260.

Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF and Downey JM. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 145-152.

Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC and Gottlieb RA. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 2001; 276: 30724-30728.

Chen W, Druhan LJ, Chen CA, Hemann C, Chen YR, Berka V, Tsai AL and Zweier JL. Peroxynitrite induces destruction of the tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric

oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition. *Biochemistry* 2010; 49: 3129-3137.

Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD and Nathan C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992; 176: 599-604.

Coassin M, Ursini F and Bindoli A. Antioxidant effect of manganese. *Arch Biochem Biophys* 1992; 299: 330-333.

Cobb N and Etzel RA. Unintentional carbon monoxide-related deaths in the United States, 1979 through 1988. *JAMA* 1991; 266: 659-663.

Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 91: 23S-30S.

Cour M and Argaud L. Ischémie-reperfusion et protection cellulaire. *Réanimation* 2010; 19: 185-190.

Crompton M and Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur J Biochem* 1988; 178: 489-501.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341 (Pt 2): 233-249.

Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N and Ward JM. The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp* 1999; 66: 167-179.

D'Amico G, Lam F, Hagen T and Moncada S. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *J Cell Sci* 2006; 119: 2291-2298.

Darblade B, Privat C, Caillaud D, Rami J and Arnal JF. [Clinical and biological investigation of NO]. *J Soc Biol* 2000; 194: 151-157.

de Leiris J and Opie LH. Effect of substrates and of coronary artery ligation on mechanical performance and on release of lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 1978; 12: 585-596.

de Waard MC, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, Dekkers DH, Schoonderwoerd K, Schuurbiers HC, de Crom R, Stienen GJ, Sipido KR, Lamers JM and Duncker DJ. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res* 2007; 100: 1079-1088.

Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J and Naito H. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol* 2001; 91: 2205-2212.

Dhalla NS, Golfman L, Takeda S, Takeda N and Nagano M. Evidence for the role of oxidative stress in acute ischemic heart disease: a brief review. *Can J Cardiol* 1999; 15: 587-593.

Dhalla NS, Temsah RM and Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000; 18: 655-673.

Diffie GM, Seversen EA and Titus MM. Exercise training increases the Ca²⁺ sensitivity of tension in rat cardiac myocytes. *J Appl Physiol* 2001; 91: 309-315.

Diltoer MW, Colle IO, Hubloue I, Ramet J, Spapen HD, Nguyen N and Huyghens LP. Reversible cardiac failure in an adolescent after prolonged exposure to carbon monoxide. *Eur J Emerg Med* 1995; 2: 231-235.

Dizon J, Burkhoff D, Tauskela J, Whang J, Cannon P and Katz J. Metabolic inhibition in the perfused rat heart: evidence for glycolytic requirement for normal sodium homeostasis. *Am J Physiol* 1998; 274: H1082-1089.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM and Venkatachalam MA. Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 405-434.

Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G and Zweier JL. Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH₄) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH₄. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15081-15086.

Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ and Doevendans PA. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 414-426.

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 245: C1-14.

Falk JA, Aune SE, Kutala VK, Kuppusamy P and Angelos MG. Inhibition of peroxynitrite precursors, NO and O₂, at the onset of reperfusion improves myocardial recovery. *Resuscitation* 2007; 74: 508-515.

Favory R, Lancel S, Tissier S, Mathieu D, Decoster B and Neviere R. Myocardial dysfunction and potential cardiac hypoxia in rats induced by carbon monoxide inhalation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 320-325.

Ferdinandy P, Schulz R and Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007; 59: 418-458.

Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, Ceconi C, Curello S and Visioli O. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J* 1998; 19 Suppl B: B2-11.

Finkelstein MM, Jerrett M and Sears MR. Environmental inequality and circulatory disease mortality gradients. *J Epidemiol Community Health* 2005; 59: 481-487.

Flohe L and Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121.

Freeman BA and Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.

French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK and Powers SK. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H128-136.

French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA and Powers SK. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *Faseb J* 2008; 22: 2862-2871.

Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.

Furchgott RF and Jothianandan D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 1991; 28: 52-61.

Gandini C, Castoldi AF, Candura SM, Locatelli C, Butera R, Priori S and Manzo L. Carbon monoxide cardiotoxicity. *J Toxicol Clin Toxicol* 2001; 39: 35-44.

Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 1983; 15: 67-73.

Gao WD, Liu Y and Marban E. Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation* 1996; 94: 2597-2604.

Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ and Slater TF. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res* 1987; 61: 757-760.

Gautier M, Antier D, Bonnet P, Le Net JL, Hanton G and Eder V. Continuous inhalation of carbon monoxide induces right ventricle ischemia and dysfunction in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H1046-1052.

Gealekman O, Abassi Z, Rubinstein I, Winaver J and Binah O. Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure. *Circulation* 2002; 105: 236-243.

Govers R and Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F193-206.

Groves JT and Wang CC. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 2000; 4: 687-695.

Gulati M, Pandey DK, Arnsdorf MF, Lauderdale DS, Thisted RA, Wicklund RH, Al-Hani AJ and Black HR. Exercise capacity and the risk of death in women: the St James Women Take Heart Project. *Circulation* 2003; 108: 1554-1559.

Gyorke S and Carnes C. Dysregulated sarcoplasmic reticulum calcium release: potential pharmacological target in cardiac disease. *Pharmacol Ther* 2008; 119: 340-354.

Halliwell B and Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.

Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL and Powers SK. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 800-809.

Hamilton KL, Quindry JC, French JP, Staib J, Hughes J, Mehta JL and Powers SK. MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1360-1368.

Haworth RA and Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys* 1979; 195: 460-467.

Hearse DJ. Oxygen deprivation and early myocardial contractile failure: a reassessment of the possible role of adenosine triphosphate. *Am J Cardiol* 1979; 44: 1115-1121.

Hearse DJ and Tosaki A. Reperfusion-induced arrhythmias and free radicals: studies in the rat heart with DMPO. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 9: 641-650.

Hearse DJ. Ischemia at the crossroads? *Cardiovasc Drugs Ther* 1988; 2: 9-15.

Hearse DJ and Tosaki A. Free radicals and calcium: simultaneous interacting triggers as determinants of vulnerability to reperfusion-induced arrhythmias in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 213-223.

Heinzel FR, Gres P, Boengler K, Duschin A, Konietzka I, Rassaf T, Snedovskaya J, Meyer S, Skyschally A, Kelm M, Heusch G and Schulz R. Inducible nitric oxide synthase expression and cardiomyocyte dysfunction during sustained moderate ischemia in pigs. *Circ Res* 2008; 103: 1120-1127.

Henry CR, Satran D, Lindgren B, Adkinson C, Nicholson CI and Henry TD. Myocardial injury and long-term mortality following moderate to severe carbon monoxide poisoning. *JAMA* 2006; 295: 398-402.

Herdson PB, Sommers HM and Jennings RB. A Comparative Study of the Fine Structure of Normal and Ischemic Dog Myocardium with Special Reference to Early Changes Following Temporary Occlusion of a Coronary Artery. *Am J Pathol* 1965; 46: 367-386.

Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR and Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975; 56: 978-985.

Hinderliter AL, Adams KF, Jr., Price CJ, Herbst MC, Koch G and Sheps DS. Effects of low-level carbon monoxide exposure on resting and exercise-induced ventricular arrhythmias in patients with coronary artery disease and no baseline ectopy. *Arch Environ Health* 1989; 44: 89-93.

Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS and Jaattela M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* 2007; 25: 193-205.

Hu A, Jiao X, Gao E, Koch WJ, Sharifi-Azad S, Grunwald Z, Ma XL and Sun JZ. Chronic beta-adrenergic receptor stimulation induces cardiac apoptosis and aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury by provoking inducible nitric-oxide synthase-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 469-475.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 9265-9269.

Ignarro LJ, Balestrieri ML and Napoli C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 326-340.

Imagawa J, Yellon DM and Baxter GF. Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 701-708.

Imahashi K, Pott C, Goldhaber JI, Steenbergen C, Philipson KD and Murphy E. Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2005; 97: 916-921.

Irshad M and Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J Exp Biol* 2002; 40: 1233-1239.

Ito Y, Imai S, Ui G, Nakano M, Imai K, Kamiyama H, Naganuma F, Matsui K, Ohashi N and Nagai R. A Na⁺-H⁺ exchange inhibitor (SM-20550) protects from microvascular deterioration and myocardial injury after reperfusion. *Eur J Pharmacol* 1999; 374: 355-366.

Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-170.

Jennings RB and Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* 1983; 68: 125-36.

Ji L, Fu F, Zhang L, Liu W, Cai X, Zheng Q, Zhang H and Gao F. Insulin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via reducing oxidative/nitrative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E871-880.

Ji LL. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev* 1995; 23: 135-166.

Ji LL. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *Am J Sports Med* 1996; 24: S20-24.

Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 283-292.

Jiao XY, Gao E, Yuan Y, Wang Y, Lau WB, Koch W, Ma XL and Tao L. INO-4885 [5,10,15,20-tetra[N-(benzyl-4'-carboxylate)-2-pyridinium]-21H,23H-porphine iron(III) chloride], a peroxynitrite decomposition catalyst, protects the heart against reperfusion injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328: 777-784.

Joe EK, Schusseim AE, Longrois D, Maki T, Kelly RA, Smith TW and Balligand JL. Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 303-315.

Jolliffe JA, Rees K, Taylor RS, Thompson D, Oldridge N and Ebrahim S. Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2001: CD001800.

Jones SP and Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40: 16-23.

Kaeffer N, Richard V and Thuillez C. Delayed coronary endothelial protection 24 hours after preconditioning: role of free radicals. *Circulation* 1997; 96: 2311-2316.

Kako KJ. Free radical effects on membrane protein in myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 209-211.

Katori T, Donzelli S, Tocchetti CG, Miranda KM, Cormaci G, Thomas DD, Ketner EA, Lee MJ, Mancardi D, Wink DA, Kass DA and Paolocci N. Peroxynitrite and myocardial contractility: in vivo versus in vitro effects. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 1606-1618.

Kavazis AN, McClung JM, Hood DA and Powers SK. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H928-935.

Kavazis AN. Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med* 2009; 39: 923-935.

Kemi OJ and Wisloff U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. *Acta Physiol (Oxf)*; 199: 425-439.

Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U and Ellingsen O.

Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 161-172.

Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G and Wisloff U.

Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43: 354-361.

Kemi OJ, Ellingsen O, Smith GL and Wisloff U.

Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes. *Front Biosci* 2008; 13: 356-368.

Kevin LG, Novalija E and Stowe DF.

Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg* 2005; 101: 1275-1287.

Khan SA and Hare JM.

The role of nitric oxide in the physiological regulation of Ca²⁺ cycling. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003; 6: 658-666.

Kharitonov VG, Sharma VS, Pilz RB, Magde D and Koesling D.

Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2568-2571.

Kimmel EC, Carpenter RL, Reboulet JE and Still KR.

A physiological model for predicting carboxyhemoglobin formation from exposure to carbon monoxide in rats. *J Appl Physiol* 1999; 86: 1977-1983.

King LM and Opie LH. Glucose and glycogen utilisation in myocardial ischemia--changes in metabolism and consequences for the myocyte. *Mol Cell Biochem* 1998; 180: 3-26.

King LM and Opie LH. Glucose delivery is a major determinant of glucose utilisation in the ischemic myocardium with a residual coronary flow. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 381-392.

Kirkman HN and Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 44-50.

Kloner RA, Ganote CE and Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; 54: 1496-1508.

Knowlton AA. Heat-shock proteins, stress, and the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723: 128-137.

Kobara M, Tatsumi T, Takeda M, Mano A, Yamanaka S, Shiraishi J, Keira N, Matoba S, Asayama J and Nakagawa M. The dual effects of nitric oxide synthase inhibitors on ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol* 2003; 98: 319-328.

Kobayashi T, Taguchi K, Takenouchi Y, Matsumoto T and Kamata K. Insulin-induced impairment via peroxynitrite production of endothelium-dependent relaxation and sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function in aortas from diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 431-443.

Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schluter KD, Piper HM and Noack E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1996; 78: 91-101.

Kojda G and Kottenberg K. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 514-523.

Kong X, Tweddell JS, Gross GJ and Baker JE. Sarcolemmal and mitochondrial K(atp)channels mediate cardioprotection in chronically hypoxic hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1041-1045.

Koretsune Y and Marban E. Cell calcium in the pathophysiology of ventricular fibrillation and in the pathogenesis of postarrhythmic contractile dysfunction. *Circulation* 1989; 80: 369-379.

Kuster GM, Lancel S, Zhang J, Communal C, Trucillo MP, Lim CC, Pfister O, Weinberg EO, Cohen RA, Liao R, Siwik DA and Colucci WS. Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 1182-1187.

Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML and Marban E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca²⁺ activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest* 1987; 79: 950-961.

Kusuoka H, Koretsune Y, Chacko VP, Weisfeldt ML and Marban E. Excitation-contraction coupling in postischemic myocardium. Does failure of activator Ca²⁺ transients underlie stunning? *Circ Res* 1990; 66: 1268-1276.

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG and Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; 278: 22546-22554.

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG and Dikalov S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 343-354.

Laude K, Thuillez C and Richard V. Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion: a new therapeutic target? *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 1-7.

Laughlin MH, Oltman CL and Bowles DK. Exercise training-induced adaptations in the coronary circulation. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30: 352-360.

Lefer AM and Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 743-751.

Lemasters JJ, Qian T, Elmore SP, Trost LC, Nishimura Y, Herman B, Bradham CA, Brenner DA and Nieminen AL. Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. *Biofactors* 1998; 8: 283-285.

Lew H and Quintanilha A. Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidative capacity and acetaminophen detoxification. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991; 16: 59-68.

Li Volti G, Rodella LF, Di Giacomo C, Rezzani R, Bianchi R, Borsani E, Gazzolo D and Motterlini R. Role of carbon monoxide and biliverdin in renal ischemia/reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 104: e135-139.

Linz W, Wiemer G and Scholkens BA. ACE-inhibition induces NO-formation in cultured bovine endothelial cells and protects isolated ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 909-919.

Liu P, Hock CE, Nagele R and Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 1997; 272: H2327-2336.

Liu X, Van Vleet T and Schnellmann RG. The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 349-370.

Liu Z and Lenardo MJ. Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases. *Dev Cell* 2007; 12: 484-485.

Loennechen JP, Beisvag V, Arbo I, Waldum HL, Sandvik AK, Knardahl S and Ellingsen O.

Chronic carbon monoxide exposure in vivo induces myocardial endothelin-1 expression and hypertrophy in rat. *Pharmacol Toxicol* 1999; 85: 192-197.

Lokuta AJ, Maertz NA, Meethal SV, Potter KT, Kamp TJ, Valdivia HH and Haworth RA.

Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure. *Circulation* 2005; 111: 988-995.

Loscalzo J. What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation* 2000; 101:

2126-2129.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the Folin

phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

Lu L, Mei DF, Gu AG, Wang S, Lentzner B, Gutstein DE, Zwas D, Homma S, Yi GH and Wang

J. Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure. *J Appl Physiol* 2002; 92: 1524-1530.

MacFarlane NG and Miller DJ. Depression of peak force without altering calcium sensitivity

by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circ Res* 1992; 70: 1217-1224.

Marban E. Pathogenetic role for calcium in stunning? *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5: 891-

893.

Marban E, Koretsune Y and Kusuoka H. Disruption of intracellular Ca²⁺ homeostasis in hearts reperfused after prolonged episodes of ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723: 38-50.

Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE and Yacoub M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2003; 420: 222-236.

Marfella R, Di Filippo C, Esposito K, Nappo F, Piegari E, Cuzzocrea S, Berrino L, Rossi F, Giugliano D and D'Amico M. Absence of inducible nitric oxide synthase reduces myocardial damage during ischemia reperfusion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. *Diabetes* 2004; 53: 454-462.

Marklund S. Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1976; 251: 7504-7507.

Marks GS, Brien JF, Nakatsu K and McLaughlin BE. Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 185-188.

Massion PB and Balligand JL. Relevance of nitric oxide for myocardial remodeling. *Curr Heart Fail Rep* 2007; 4: 18-25.

Maxwell SR and Lip GY. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 44: 307-317.

Meredith T and Vale A. Carbon monoxide poisoning. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988; 296: 77-79.

Mickelson J, Simpson P and BR L. Ischemic heart disease: pathophysiology and pharmacology management. *Cardiovascular pharmacology* 1990: 293-340.

Milbourne EA and Bygrave FL. Do nitric oxide and cGMP play a role in calcium cycling? *Cell Calcium* 1995; 18: 207-213.

Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, Shepherd K, Sullivan JH, Anderson GL and Kaufman JD. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med* 2007; 356: 447-458.

Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R and Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 2009; 15: RA209-219.

Mocanu MM, Baxter GF and Yellon DM. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 197-200.

Momas I, Pirard P, Quenel P, Medina S, Le Moullec Y, Ferry R, Dab W and Festy B. [Urban atmospheric pollution and mortality: analysis of epidemiological studies published between 1980 and 1991]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1993; 41: 30-43.

Moncada S and Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 214-220.

Moolgavkar SH. Air pollution and hospital admissions for diseases of the circulatory system in three U.S. metropolitan areas. *J Air Waste Manag Assoc* 2000; 50: 1199-1206.

Mosser DD, Duchaine J, Bourget L and Martin LH. Changes in heat shock protein synthesis and heat sensitivity during mouse thymocyte development. *Dev Genet* 1993; 14: 148-158.

Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, Schulz R, Butany J, Stewart DJ and Husain M. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest* 2002; 109: 735-743.

Murphy E, Perlman M, London RE and Steenbergen C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 1991; 68: 1250-1258.

Murphy E, Cross H and Steenbergen C. Sodium regulation during ischemia versus reperfusion and its role in injury. *Circ Res* 1999; 84: 1469-1470.

Murphy E and Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 2008; 88: 581-609.

Murphy JG, Marsh JD and Smith TW. The role of calcium in ischemic myocardial injury. *Circulation* 1987; 75: V15-24.

Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ and Roberts R. Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 1985; 72: 915-921.

Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Neto JS, Kaizu T, Choi AM, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Nalesnik MA, Otterbein LE and Murase N. Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003; 163: 1587-1598.

Nakao A, Neto JS, Kanno S, Stolz DB, Kimizuka K, Liu F, Bach FH, Billiar TR, Choi AM, Otterbein LE and Murase N. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 2005; 5: 282-291.

Naseem SA, Kontos MC, Rao PS, Jesse RL, Hess ML and Kukreja RC. Sustained inhibition of nitric oxide by NG-nitro-L-arginine improves myocardial function following ischemia/reperfusion in isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 419-426.

Netticadan T, Temsah R, Osada M and Dhalla NS. Status of Ca²⁺/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277: C384-391.

O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 2004; 94: 420-432.

Okabe E, Tsujimoto Y and Kobayashi Y. Calmodulin and cyclic ADP-ribose interaction in Ca²⁺ signaling related to cardiac sarcoplasmic reticulum: superoxide anion radical-triggered Ca²⁺ release. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2: 47-54.

OMS and FIMS. Committee on Physical Activity for Health. Exercise for Health. *of the World Health Organisation* 1995; 73: 135-136.

Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 1989; 80: 1049-1062.

Opie LH. Myocardial ischemia--metabolic pathways and implications of increased glycolysis. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4 Suppl 4: 777-790.

Opie LH. What is new in myocardial ischemia? *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4 Suppl 4: 765-766.

Opie LH. Myocardial stunning--we do not know the mechanism nor is there "overwhelming evidence" for a major role of free radicals. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 152-155.

Pabla R and Curtis MJ. Effects of NO modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart. *Circ Res* 1995; 77: 984-992.

Pacher P, Beckman JS and Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424.

Paffenbarger RS, Jr., Wing AL and Hyde RT. Physical activity as an index of heart attack risk in college alumni. *Am J Epidemiol* 1978; 108: 161-175.

Paffenbarger RS, Jr., Hyde RT, Hsieh CC and Wing AL. Physical activity, other life-style patterns, cardiovascular disease and longevity. *Acta Med Scand Suppl* 1986; 711: 85-91.

Paffenbarger RS, Jr., Hyde RT, Wing AL and Hsieh CC. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med* 1986; 314: 605-613.

Palmer BM, Thayer AM, Snyder SM and Moore RL. Shortening and [Ca²⁺] dynamics of left ventricular myocytes isolated from exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1998; 85: 2159-2168.

Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.

Patel VC, Yellon DM, Singh KJ, Neild GH and Woolfson RG. Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 234-238.

Peel JL, Metzger KB, Klein M, Flanders WD, Mulholland JA and Tolbert PE. Ambient air pollution and cardiovascular emergency department visits in potentially sensitive groups. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 625-633.

Piantadosi CA. Carbon monoxide poisoning. *Undersea Hyperb Med* 2004; 31: 167-177.

Piantadosi CA. Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 562-569.

Piper HM, Garcia-Dorado D and Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 291-300.

Piper HM, Meuter K and Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: S644-648.

Polla BS and Cossarizza A. Stress proteins in inflammation. *EXS* 1996; 77: 375-391.

Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA and Jessup J. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol* 1998; 275: R1468-1477.

Powers SK, Locke and Demirel HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 386-392.

Powers SK, Lennon SL, Quindry J and Mehta JL. Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol* 2002; 17: 495-502.

Powers SK, Quindry JC and Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 193-201.

Reimer KA and Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979; 40: 633-644.

Rochetaing A, Barbe C and Kreher P. Acute ischemic preconditioning and high subchronic CO exposure independently increase myocardial tolerance to ischemia. *Inhal Toxicol* 2001; 13: 1015-1032.

Rovetto MJ, Lamberton WF and Neely JR. Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ Res* 1975; 37: 742-751.

Ruiz-Meana M and Garcia-Dorado D. Translational cardiovascular medicine (II). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2009; 62: 199-209.

Ryter SW and Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 2004; 26: 270-280.

Said M, Becerra R, Palomeque J, Rinaldi G, Kaetzel MA, Diaz-Sylvester PL, Copello JA, Dedman JR, Mundina-Weilenmann C, Vittone L and Mattiazzi A. Increased intracellular Ca²⁺ and SR Ca²⁺ load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: H1669-1683.

Samoli E, Touloumi G, Schwartz J, Anderson HR, Schindler C, Forsberg B, Vigotti MA, Vonk J, Kosnik M, Skorkovsky J and Katsouyanni K. Short-term effects of carbon monoxide on mortality: an analysis within the APHEA project. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1578-1583.

Schluter KD, Weber M, Schraven E and Piper HM. NO donor SIN-1 protects against reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by a dual action. *Am J Physiol* 1994; 267: H1461-1466.

Schwartz J. Total suspended particulate matter and daily mortality in Cincinnati, Ohio. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 186-189.

Schwela D. Air pollution and health in urban areas. *Rev Environ Health* 2000; 15: 13-42.

Shah AM and MacCarthy PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther* 2000; 86: 49-86.

Sharikabad MN, Ostbye KM, Lyberg T and Brors O. Effect of extracellular Mg(2+) on ROS and Ca(2+) accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H344-353.

Sheps DS, Herbst MC, Hinderliter AL, Adams KF, Ekelund LG, O'Neil JJ, Goldstein GM, Bromberg PA, Dalton JL, Ballenger MN and et al. Production of arrhythmias by elevated carboxyhemoglobin in patients with coronary artery disease. *Ann Intern Med* 1990; 113: 343-351.

Sorhaug S, Steinshamn S, Nilsen OG and Waldum HL. Chronic inhalation of carbon monoxide: effects on the respiratory and cardiovascular system at doses corresponding to tobacco smoking. *Toxicology* 2006; 228: 280-290.

Steenbergen C, Murphy E, Levy L and London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 1987; 60: 700-707.

Steenbergen C, Murphy E, Watts JA and London RE. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 1990; 66: 135-146.

Steenbergen C, Fralix TA and Murphy E. Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol* 1993; 88: 456-470.

Stein AB, Guo Y, Tan W, Wu WJ, Zhu X, Li Q, Luo C, Dawn B, Johnson TR, Motterlini R and Bolli R. Administration of a CO-releasing molecule induces late preconditioning against myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 127-134.

Stern FB, Halperin WE, Hornung RW, Ringenburt VL and McCammon CS. Heart disease mortality among bridge and tunnel officers exposed to carbon monoxide. *Am J Epidemiol* 1988; 128: 1276-1288.

Stieb DM, Szyszkowicz M, Rowe BH and Leech JA. Air pollution and emergency department visits for cardiac and respiratory conditions: a multi-city time-series analysis. *Environ Health* 2009; 8: 25.

Stoyanovsky D, Murphy T, Anno PR, Kim YM and Salama G. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 1997; 21: 19-29.

Sun J, Yamaguchi N, Xu L, Eu JP, Stamler JS and Meissner G. Regulation of the cardiac muscle ryanodine receptor by O₂ tension and S-nitrosoglutathione. *Biochemistry* 2008; 47: 13985-13990.

Suzuki S, Yoshioka N, Isshiki N, Hamanaka H and Miyachi Y. Involvement of reactive oxygen species in post-ischaemic flap necrosis and its prevention by antioxidants. *Br J Plast Surg* 1991; 44: 130-134.

Szabo C, Ischiropoulos H and Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 662-680.

Szabo ME, Gallyas E, Bak I, Rakotovo A, Boucher F, de Leiris J, Nagy N, Varga E and Tosaki A. Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 3727-3732.

Takagi H, Matsui Y and Sadoshima J. The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1373-1381.

Temsah RM, Netticadan T, Chapman D, Takeda S, Mochizuki S and Dhalla NS. Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am J Physiol* 1999; 277: H584-594.

Tenhunen R, Marver HS and Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969; 244: 6388-6394.

Tennant R and Wiggers C. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *AM J Physiol* 1935; 112: 351-361.

Ter Keurs HE and Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol Rev* 2007; 87: 457-506.

Thom SR and Ischiropoulos H. Mechanism of oxidative stress from low levels of carbon monoxide. *Res Rep Health Eff Inst* 1997; 1-19; discussion 21-17.

Thom SR, Fisher D, Xu YA, Garner S and Ischiropoulos H. Role of nitric oxide-derived oxidants in vascular injury from carbon monoxide in the rat. *Am J Physiol* 1999; 276: H984-992.

Thom SR, Fisher D, Xu YA, Notarfrancesco K and Ischiropoulos H. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1305-1310.

Tiefenbacher CP, Chilian WM, Mitchell M and DeFily DV. Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation* 1996; 94: 1423-1429.

Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, Kelly RA and Smith TW. Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 155-167.

Valverde CA, Kornyejev D, Ferreiro M, Petrosky AD, Mattiazzi A and Escobar AL. Transient Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovasc Res*; 85: 671-680.

Van Remmen H, Qi W, Sabia M, Freeman G, Estlack L, Yang H, Mao Guo Z, Huang TT, Strong R, Lee S, Epstein CJ and Richardson A. Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1625-1634.

Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, Zak R, Schumacker PT and Becker LB. Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia. *Am J Physiol* 1996; 270: H1334-1341.

Vanderklisch PW and Bahr BA. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 323-339.

Varadi J, Lekli I, Juhasz B, Bacskay I, Szabo G, Gesztelyi R, Szendrei L, Varga E, Bak I, Foresti R, Motterlini R and Tosaki A. Beneficial effects of carbon monoxide-releasing molecules on post-ischemic myocardial recovery. *Life Sci* 2007; 80: 1619-1626.

Varon J, Marik PE, Fromm RE, Jr. and Gueler A. Carbon monoxide poisoning: a review for clinicians. *J Emerg Med* 1999; 17: 87-93.

Venetucci LA, Trafford AW, O'Neill SC and Eisner DA. The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovasc Res* 2008; 77: 285-292.

Virdis A, Colucci R, Fornai M, Polini A, Daghini E, Duranti E, Ghisu N, Versari D, Dardano A, Blandizzi C, Taddei S, Del Tacca M and Monzani F. Inducible nitric oxide synthase is involved

in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from hypothyroid rats. *Endocrinology* 2009; 150: 1033-1042.

von Klot S, Peters A, Aalto P, Bellander T, Berglind N, D'Ippoliti D, Elosua R, Hormann A, Kulmala M, Lanki T, Lowel H, Pekkanen J, Picciotto S, Sunyer J and Forastiere F. Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation* 2005; 112: 3073-3079.

Vrints CJ. Pathophysiology of the no-reflow phenomenon. *Acute Card Care* 2009; 11: 69-76.

Wakabayashi S, Shigekawa M and Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev* 1997; 77: 51-74.

Wakatsuki T, Oki T, Sakabe K, Shinohara H, Ikata J, Tabata T, Nishikado A, Ito S and Yamaguchi T. Coronary flow velocity immediately after reperfusion reflects myocardial microcirculation in canine models of acute myocardial infarction. *Angiology* 1999; 50: 919-928.

Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW and et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 447-455.

Wang P and Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 1996; 271: 29223-29230.

Wang XL, Liu HR, Tao L, Liang F, Yan L, Zhao RR, Lopez BL, Christopher TA and Ma XL. Role of iNOS-derived reactive nitrogen species and resultant nitrative stress in leukocytes-induced cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion. *Apoptosis* 2007; 12: 1209-1217.

Weiss JN, Korge P, Honda HM and Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* 2003; 93: 292-301.

Wellenius GA, Coull BA, Godleski JJ, Koutrakis P, Okabe K, Savage ST, Lawrence JE, Murthy GG and Verrier RL. Inhalation of concentrated ambient air particles exacerbates myocardial ischemia in conscious dogs. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 402-408.

Wichmann HE, Spix C, Tuch T, Wolke G, Peters A, Heinrich J, Kreyling WG and Heyder J. Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany part I: role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst* 2000: 5-86; discussion 87-94.

Wildhirt SM, Suzuki H, Horstman D, Weismuller S, Dudek RR, Akiyama K and Reichart B. Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96: 1616-1623.

Wildhirt SM, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, Horstman D and Reichart B. Aminoguanidine inhibits inducible NOS and reverses cardiac dysfunction late after ischemia and reperfusion-- implications for iNOS-mediated myocardial stunning. *Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 47: 137-143.

Wink DA and Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.

Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G and Ellingsen O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res* 2001; 50: 495-508.

Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL and Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 162-174.

Wright GR, Jewczyk S, Onrot J, Tomlinson P and Shephard RJ. Carbon monoxide in the urban atmosphere: hazards to the pedestrian and the street-worker. *Arch Environ Health* 1975; 30: 123-129.

Xia Y. Superoxide generation from nitric oxide synthases. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1773-1778.

Xie QW, Kashiwabara Y and Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269: 4705-4708.

Xu L, Eu JP, Meissner G and Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 1998; 279: 234-237.

Yamashiro S, Noguchi K, Kuniyoshi Y, Koja K and Sakanashi M. Role of tetrahydrobiopterin on ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat hearts. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2003; 44: 37-49.

Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T and Hori M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 1999; 189: 1699-1706.

Yang L, Zhang W, He HZ and Zhang GG. Experimental studies on combined effects of high temperature and carbon monoxide. *J Tongji Med Univ* 1988; 8: 60-65.

Yaoita H, Ogawa K, Maehara K and Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998; 97: 276-281.

Yasmin W, Strynadka KD and Schulz R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res* 1997; 33: 422-432.

Yellon DM and Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357: 1121-1135.

Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, Ho YS and Das DK. Targeted disruption of the mouse Sod I gene makes the hearts vulnerable to ischemic reperfusion injury. *Circ Res* 2000; 86: 264-269.

Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV and Downey JM. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol* 1994; 267: H2383-2390.

Zhao X, Chen YR, He G, Zhang A, Druhan LJ, Strauch AR and Zweier JL. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) knockout decreases NOS2 induction, limiting hyperoxygenation and conferring protection in the postischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1541-1550.

Zhen J, Lu H, Wang XQ, Vaziri ND and Zhou XJ. Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. *Am J Hypertens* 2008; 21: 28-34.

Zima AV and Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 310-321.

Zuckerbraun BS, Chin BY, Bilban M, d'Avila JC, Rao J, Billiar TR and Otterbein LE. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Faseb J* 2007; 21: 1099-1106.

Zweier JL, Flaherty JT and Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1404-1407.

Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* 1988; 263: 1353-1357.

Liste des figures, tableaux et images

I. Figures

Figure 1 : Séquence des altérations cellulaires induites par l'ischémie myocardique, adapté de Mickelson et al., (1990). ATP : Adénosine triphosphate ; ADP : Adénosine diphosphate ; CP : Phosphocréatine. 24

Figure 2 : Cinétique d'extension temporelle de la mort cellulaire au cours d'un syndrome d'IR, adapté de Cour et Argaud, (2010). 26

Figure 3 : Mécanismes d'action des principales enzymes antioxydantes en réponse à une production d'anion superoxyde. 32

Figure 4 : Effets cardiovasculaires du NO, d'après Shah et MacCarthy, (2000). 39

Figure 5 : Flux calciques au cours du couplage excitation-contraction et de la relaxation dans les cardiomyocytes. I_{cal} : courant calcique entrant lent ; RyR-2 : Récepteurs à la ryanodine ; PLB : Phospholamban ; SERCA-2a : sarco/endoplasmique réticulum Ca²⁺-ATPase ; SR : réticulum. 41

Figure 6 : Altérations de l'homéostasie calcique du cardiomyocyte au cours de l'ischémie. NCX : échangeur Na⁺/Ca²⁺. 43

Figure 7 : Mécanismes délétères d'une production accrue de RLO sur l'homéostasie calcique, adapté de Bolli, (1990). 45

Figure 8 : Mécanismes responsables de l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} au cours de la reperfusion post-ischémique. RLO : radicaux libres oxygénés ; RyR-2 : Récepteurs à la ryanodine ; PLB : Phospholamban ; SERCA-2a : sarco/endoplasmique réticulum Ca^{2+} -ATPase ; SR : réticulum sarcoplasmique ; NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale..... 45

Figure 9 : Mécanismes de mort cellulaire apoptotique au cours de la reperfusion post-ischémique. RLO : radicaux libres oxygénés ; mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale ; AIF : Apoptosis Inducing Factor ; Cyt : cytochrome C..... 47

Figure 10 : Mécanismes de mort cellulaire nécrotique au cours de la reperfusion post-ischémique, adapté de Murphy et al., (2008). RLO : radicaux libres oxygénés ; mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale..... 48

Figure 11 : Mécanismes responsables du phénomène de "no-reflow" au cours de la reperfusion post-ischémique..... 51

Figure 12 : Formule de Lewis du CO..... 52

Figure 13 : Relation temps-concentration des effets physiologiques, adaptatifs et toxiques du CO dans les cellules et tissus. Adapté de Piantadosi, (2008)...... 54

Figure 14 : Cinétique de la formation de HbCO chez le rat, adapté de Kimmel et al., (1999). HbCO : Carboxyhémoglobine..... 55

Figure 15 : Effets du CO sur la relaxation NO-dépendante des cellules musculaires lisses. eNOS : oxyde nitrique synthétase endothéliale ; CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire ; GCs : guanylate cyclase soluble ; GTP : guanosine triphosphate ; GMPc : guanylate monophosphate cyclique ; PKG : protéine kinase G..... 61

Figure 16 : Biosynthèse du CO par dégradation hémique 62

Figure 17 : Effets potentiellement cardioprotecteurs de l'activité physique, adapté de Powers et al., (2008). HSPs : protéines de choc thermique. 66

Figure 18 : Transitoire calcique de cardiomyocytes isolés chez des rats sédentaires et entraînés, adapté de Kemi et al., (2008). 69

Figure 19 : Sensibilité au calcium de cardiomyocytes isolés chez des rats sédentaires et entraînés, adapté de Kemi et al., (2008). 69

Figure 20 : Mécanismes de cardioprotection liés à l'expression de SOD suite à un entraînement en endurance. RLO : radicaux libres de l'oxygène ; SOD : superoxyde dismutase. 71

Figure 21 : Pattern type d'exposition au CO (24 heures). 77

Figure 22 : Evolution des taux d'HbCO sanguine suite au protocole d'exposition au CO, * p<0,05 ; rats CO vs. Ctrl. 78

Figure 23 : Organisation du protocole d'entraînement et d'exposition au CO. 80

Figure 24 : Paramètres de pression au cours du protocole d'IR sur cœur isolé perfusé..... 84

Figure 25 : Evaluation planimétrique de la zone à risque et de la zone infarctée. En bleu : zone saine ; en rouge et blanc : zone à risque ; en blanc : zone infarctée..... 85

Figure 26 : Rythme sinusal et évènements arythmiques identifiés au cours de la reperfusion post-ischémique..... 86

Figure 27 : Paramètres calculés : A. Raccourcissement cellulaire B. Transitoire calcique. ... 89

Figure 28 : Effets de l'anoxie-réoxygénation cellulaire sur A, le raccourcissement cellulaire ; B, le Ca^{2+} cytosolique diastolique ; C, L'amplitude du transitoire calcique ; et effets de l'incubation de N-Acetylcysteine (NAC, 20 μ M) au cours de l'anoxie-réoxygénation cellulaire sur D, le raccourcissement cellulaire ; E, le Ca^{2+} cytosolique diastolique ; F, L'amplitude du transitoire calcique. Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ 90

Figure 29 : Production myocardique de NO après une séquence d'ischémie (30 min) et de reperfusion (5 min), évaluée par quantification des nitrites et nitrates dans les effluents coronaires. * $p < 0,05$ rats CO vs. rats Ctrl. 114

Figure 30 : Expression myocardique de eNOS évaluée par western blot. 115

Figure 31 : Mécanismes délétères du CO entraînant le développement d'un phénotype cellulaire pathologique et à l'origine d'une plus grande sensibilité à l'IR. 177

II. Tableaux

Tableau 1 : Propriétés physiques du CO..... 52

Tableau 2 : Système de scorage de la sévérité des arythmies de reperfusion post-ischémique, adapté de Walker et al., (1988)..... 86

III. Images

Image 1 : Entraînement de rats sur tapis roulant 80

Image 2 : Système de cœur isolé perfusé de Langendorff. 82