



HAL
open science

Impact fonctionnel et métabolique d'une réduction de la fréquence cardiaque induite par un inhibiteur du courant If, l'ivabradine : approche expérimentale chez le porc et la souris

Fanny Vaillant

► To cite this version:

Fanny Vaillant. Impact fonctionnel et métabolique d'une réduction de la fréquence cardiaque induite par un inhibiteur du courant If, l'ivabradine : approche expérimentale chez le porc et la souris. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I; Institut de cardiologie (Montréal, Canada), 2010. Français. NNT : 2010LYO10225 . tel-00817208

HAL Id: tel-00817208

<https://theses.hal.science/tel-00817208>

Submitted on 24 Apr 2013

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES - SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 29 octobre 2010

par

Fanny VAILLANT

**Impact fonctionnel et métabolique d'une réduction de la fréquence cardiaque induite par un
inhibiteur du courant I_f , l'ivabradine :
approche expérimentale chez le porc et la souris.**

JURY

M. Jacques DESCOTES	Professeur	Président
M. Philippe CHEVALIER	Professeur	Examineur
M. Christophe BEAULOYE	Professeur	Rapporteur
Mme Anne GARNIER-FARGART	Maître de conférences	Rapporteur
Mme Florence MALBERG-GAUDIN	Docteur	Examineur
<u>Mme Christine DES ROSIERS</u>	Professeur titulaire	Co-Directeur
<u>M. Quadiri TIMOUR</u>	Maître de conférences	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur L. Collet

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

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

M. le Professeur D. Simon

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurance

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M R. Bernard

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce travail ont été réalisés en co-direction au laboratoire de Pharmacologie médicale à l'INSERM ERI22 à Lyon et au laboratoire du métabolisme intermédiaire à l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Je tiens à remercier en tout premier lieu, le Docteur Quadiri TIMOUR, mon directeur de thèse, pour avoir cru en cette jeune étudiante motivée le jour où elle s'est présentée pour son stage de MASTER il y a 5 ans. Recevez, Monsieur Timour, mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire. La confiance que vous m'avez accordée ainsi que nos nombreuses discussions m'ont permis de progresser et de mieux appréhender les différentes facettes de la recherche. Je tiens également à vous remercier de m'avoir donné l'opportunité de réaliser en partie à Montréal. Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier le Professeur Christine DES ROSIERS pour avoir co-dirigé cette thèse et m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je la remercie pour sa confiance, sa rigueur scientifique et son enthousiasme tant envié à l'Institut. En espérant que les travaux à venir ensemble ne soient que le début d'une collaboration Franco-Canadienne.

Je souhaite remercier le Professeur Jacques DESCOTES pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Je vous exprime ma reconnaissance pour votre aide à la rédaction en anglais.

Mes remerciements les plus respectueux vont aux Docteurs Anne GARNIER-FAGART et Christophe BEAULOYE de m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteurs. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier le Professeur Philippe CHEVALIER d'avoir accepté de participer à ce jury, ainsi que d'avoir passé du temps à relire mes articles.

Je souhaite également remercier le Docteur Bernard BUI-XUAN pour ses précieux conseils notamment statistiques mais également pour son sens critique quant aux expérimentations, qui m'ont guidés au cours de ces années de recherche.

J'adresse mes remerciements aux Docteur Alain TABIB pour son expertise anatomopathologique et toutes ces heures passées à analyser les cœurs.

A l'ensemble des amis et de la famille,

Un grand merci aux filles du labo de Lyon, Nicole, Leila, Dalila, Rajae, Sylviane, Émilie et à tous les étudiants de passage, pour m'avoir aidé à mener à bien toutes ces expérimentations. A tous les moments passés ensemble au travail et en dehors. A l'accueil chaleureux que vous m'avez fait lors de mon arrivée et au soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma thèse.

Je remercie également le labo de Montréal pour son accueil chaleureux, et tout particulièrement Ben pour avoir eu la patience de m'apprendre le cœur travaillant, de me corriger et de me coacher. Un grand merci pour ton soutien dans cette dernière ligne droite.

Un grand merci également à toute la gang de Montréal, au café chez M-Pi, au volley-ball, aux colocs...

Je remercie tous les amis de France qui malgré la distance m'ont soutenu durant ces années de thèse. En espérant pouvoir profiter enfin de vous tous bientôt.

Bien évidemment, un grand merci à mes plus fidèles sponsors, mes parents, sans oublier toute la famille et vous les amis de la famille.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas de vrais remerciements si j'oubliais ceux grâce à qui tous ce travail a été possible : mes amis les cochons et les souris.

Résumé

Résumé

Les cardiopathies ischémiques sont une cause majeure de mortalité cardiovasculaire pouvant aboutir à la mort subite par fibrillation ventriculaire (FV). Un des objectifs thérapeutiques chez les coronariens est de diminuer la demande en O₂ par réduction de la fréquence cardiaque (RFC). Plusieurs médicaments dont les bêta-bloquants et inhibiteurs calciques répondent à cet objectif, mais peuvent être responsable d'altération de la contractilité cardiaque et d'effets secondaires limitant leur utilisation. Nous nous sommes intéressés aux effets d'un inhibiteur sélectif du courant pacemaker I_f, l'ivabradine (IVA) dont l'administration induit une RFC sinusale. L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'impact de la RFC sur la propension à la FV et de comprendre les mécanismes fonctionnels et métaboliques impliqués. Un premier travail a été réalisé sur un modèle d'ischémie myocardique aigue. Dans un second travail l'impact de la RFC sur la sélection des substrats pour la production d'énergie a été évalué sur cœur isolé et perfusé en mode travaillant. Nos résultats démontrent que l'IVA dans les deux modèles a induit une RFC qui était associée in vivo à une amélioration de la perfusion coronaire, une préservation de la structure mitochondriale et du statut énergétique myocardique, réduisant la propension à la FV. *Ex vivo*, la RFC n'a pas modifié la sélection des substrats et le statut énergétique. En thérapeutique, il est important d'améliorer les conditions tissulaires et de réduire la perte de substrats lors d'ischémie myocardique, l'IVA semble répondre à cette attente. Son effet spécifique sur l'automaticité sinusale lui confère la possibilité d'agir en préventif et en curatif.

Mots clés

Fibrillation ventriculaire primaire, ischémie myocardique aigue, fréquence cardiaque, ivabradine, métabolisme énergétique myocardique, cardioprotection.

Intitulé et adresse du laboratoire

EA 4173, INSERM ERI22 Agressions vasculaires et réponses tissulaires

8 avenue Rockefeller

69373 Lyon cedex 08

Title

Functional and metabolic impact of heart rate reduction induced by a selective inhibitor of pacemaker current I_f , ivabradine: experimental approach in pig and mouse model.

Abstract

Ischemic cardiopathies are a major cause of cardiovascular mortality potentially leading to sudden death by ventricular fibrillation (VF). In patients with coronary disease, one therapeutic goal is to reduce oxygen requirements via slowing of heart rate (SHR). Several medicinal drugs, such as beta-blockers and calcium inhibitors can achieve this goal, but can result in altered cardiac contractility and various adverse effects, which restricts their use. We focused our interest on the effects of a selective inhibitor of the pacemaker current I_f , namely ivabradine (IVA), which can reduce sinus heart rate. The aim of the present work was to evaluate the impact of SHR on the propensity to VF and to better understand the physiological and metabolism mechanisms involved. The first study was performed on a pig model of acute myocardial ischemia leading to VF. In the second study, the impact of SHR was evaluated using a mouse model of isolated perfused working heart. Our results demonstrated that IVA induced SHR in both models and this was associated *in vivo* with enhanced coronary flow, conservation of mitochondrial structure and myocardial energetic status, thus reducing the risk of triggering ischemia-induced VF. Moreover, *ex vivo*, the observed SHR did not change the selection of substrates for energy production. From a therapeutic point of view, it is critical to improve the conditions within tissues and to reduce the loss of substrates during myocardial ischemia. IVA apparently met this goal. Indeed, via specific effects on sinus automaticity, it can act both preventively and curatively.

Keywords

Primary ventricular fibrillation, acute myocardial ischemia, heart rate, ivabradine, myocardial energetic metabolism, cardioprotection.

Sommaire

<i>Résumé</i>	6
ANNEXE DES FIGURES	11
ABBREVIATIONS	14
INTRODUCTION	16
1. La fibrillation ventriculaire	18
1.1 Définition	18
1.2 La fibrillation ventriculaire, une complication possible de l'ischémie myocardique ... 20	
1.2.1 L'ischémie.....	20
1.2.2 Conséquences métaboliques de l'ischémie	20
1.2.3 Altérations ioniques et cellulaires associées à l'ischémie	22
1.2.4 Les altérations de reperfusion.....	25
2. Rôle de la fréquence cardiaque	26
2.1 Genèse et contrôle physiologique de l'activité du nœud sinusal	29
2.1.1 Contrôle extrinsèque	31
2.1.2 Contrôle intrinsèque : les courants ioniques.....	32
2.2 Fréquence cardiaque et risque cardiovasculaire	40
2.2.1 Tachycardie et lésions athérosclérotiques	42
2.2.2 Tachycardie sinusale et ischémie myocardique.....	43
2.2.3 Impact sur le métabolisme énergétique cardiaque.....	46
3. Moyens pharmacologiques de lutte contre la tachycardie sinusale	64
3.1 Les bêta-bloquants	66
3.2 L'ivabradine	68
3.2.1 Efficacité clinique	69
3.2.2 Tolérance et effets indésirables	71
3.2.3 Indications.....	71
OBJECTIFS	72
PREMIERE PARTIE : Rôle de la fréquence cardiaque sur la propension à la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique	75
1. Méthodologie commune à l'ensemble des trois études	77
1.1 Préparation des animaux	77
1.1.1 Procédures d'anesthésie	77
1.1.2 Réalisation de l'ischémie	78
1.2 Détermination des paramètres électrophysiologiques	79
1.2.1 La fréquence cardiaque sinusale.....	79
1.2.2 La durée du potentiel d'action monophasique.....	79
1.2.3 Évaluation de la fibrillation ventriculaire.....	80
1.3 Détermination des paramètres hémodynamiques	82
1.3.1 Pressions artérielles.....	82
1.3.2 Contractilité myocardique	82
1.4 Détermination macroscopique de l'ischémie	83
1.4.1 Principe	83
1.4.2 Méthode	83

2. ÉTUDE 1 : Caractérisation des effets de l'ivabradine et de l'ischémie sur la propension à la fibrillation ventriculaire	84
2.1 Protocoles d'études	84
2.1.1 Effet dose de l'ivabradine : étude 1, protocole 1	84
2.1.2 Corrélation fréquence cardiaque et seuil électrique de fibrillation ventriculaire : étude 1, protocole 2.....	85
2.1.3 Rôle de l'ischémie sur le seuil électrique de fibrillation ventriculaire : étude 1, protocole 3.....	86
2.2 Analyse statistique	88
2.3 Résultats.....	89
2.3.1 Étude de l'effet dose de l'ivabradine : étude 1, protocole 1	89
2.3.2 Corrélation fréquence cardiaque - seuil électrique de fibrillation ventriculaire : étude 1, protocole 2.....	93
2.3.3 Impact de l'ischémie sur le seuil électrique de fibrillation ventriculaire : étude 1, protocole 3....	97
2.4 Discussion	103
3. ÉTUDE 2 : Propension à la fibrillation ventriculaire : structure cardiomyocytaire et perfusion myocardique.....	107
3.1 Objectifs et protocoles d'étude.....	107
3.1.1 Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur la morphologie myocardique : étude 2, protocole 1	108
3.1.2 Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur la perfusion myocardique : étude 2, protocole 2	109
3.2 Matériel et méthodes spécifiques de l'étude 2	110
3.2.1 Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur morphologie myocardique : Étude 2, Protocole 1	110
3.2.2 Détermination du flux sanguin myocardique régional : étude 2, protocole 2.....	115
3.2.3 Analyse statistique	118
3.3 Résultats.....	119
3.3.1 Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur la structure cardiomyocytaire : étude 2, protocole 1	119
3.3.2 Impact d'une baisse de la fréquence cardiaque sur la perfusion myocardique à la reperfusion : étude 2, protocole 2	126
3.4 Discussion	129
4. ÉTUDE 3 : Impact de la fréquence cardiaque sur la propension à la fibrillation ventriculaire : rôle du métabolisme énergétique.....	134
4.1 Objectifs.....	134
4.2 Protocoles d'études	136
4.2.1 Impact des traitements sur un cœur sain en normoxie : étude 3, protocole 1	136
4.2.2 Impact de l'administration des traitements à la reperfusion d'une ischémie/fibrillation ventriculaire : étude 3, protocole 2	137
4.2.3 Impact de l'administration des traitements à la reperfusion - rôle de la fréquence cardiaque : étude 3, protocole 3.....	138
4.3 Matériel et méthodes spécifiques de l'étude 3	141
4.3.1 Évaluation de temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique	141
4.3.2 Évaluation de l'activité enzymatique myocardique.....	141
4.3.3 Évaluation des concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie	146
4.3.4 Analyse statistique	149
4.4 Résultats.....	150
4.4.1 Impact de l'administration des traitements sur un cœur sain en normoxie : étude 3, protocole 1	150
4.4.2 Impact de l'administration des traitements à la reperfusion d'une ischémie / fibrillation ventriculaire : étude 3, protocole 2	155

4.4.3	Impact de l'administration des traitements à la reperfusion - rôle de la fréquence cardiaque : étude 3, protocole 3	159
4.5	Discussion	168
<i>DEUXIEME PARTIE : Rôle de la fréquence cardiaque sur le métabolisme énergétique d'un cœur sain en conditions normoxiques</i>		
1.	<i>Matériel et Méthodes.....</i>	177
1.1	Protocole	177
1.2	Animaux.....	177
1.3	Modèle de cœur isolé perfusé travaillant en mode semi-recirculant	180
1.4	Mesure des flux métaboliques : utilisation de traceurs isotopiques stables.....	183
1.4.1	La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM) : les aspects techniques	186
1.4.2	L'analyse du profil des isotopomères de masse	189
1.4.3	Calcul de la contribution relative des diverses voies métaboliques.....	190
1.4.4	Calcul de la production d'ATP cytosolique et mitochondriale	191
1.4.5	Métabolites myocardiques.....	191
1.5	Analyse statistique	192
2.	<i>Résultats.....</i>	193
2.1	Phénotypage fonctionnel	193
2.2	Résultats métaboliques	196
2.2.1	Flux métaboliques.....	196
2.2.2	Production énergétique.....	198
2.2.3	Statut énergétique.....	199
2.2.4	Impact métabolique du pacing seul.....	200
2.3	Le métoprolol	201
2.3.1	Phénotypage fonctionnel	201
2.3.2	Phénotypage métabolique	205
3.	<i>Discussion.....</i>	206
<i>Conclusion générale et perspectives</i>		213
<i>Bibliographie</i>		216
<i>Bibliographie de l'auteur</i>		241
<i>Annexe I : articles en relation avec ce manuscrit.....</i>		242
<i>Annexe II : Titre et travaux</i>		299

ANNEXE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma représentatif des mécanismes ioniques altérés lors de l'ischémie/reperfusion, menant à l'accumulation de Na^+ et Ca^{2+}	23
Figure 2 : Relation semi-logarithmique entre la fréquence cardiaque de repos et l'espérance de vie chez les mammifères.....	27
Figure 3 : Relation entre l'espérance de vie et le nombre de battements cardiaques total par durée de vie.....	27
Figure 4 : Relation entre la fréquence cardiaque et l'espérance de vie.....	28
Figure 5 : Représentation du système de conduction dans un cœur de mammifère.	30
Figure 6 : Schéma illustrant l'évolution en fonction du temps des principaux courants ioniques impliqués dans l'activité sinusale spontanée.	33
Figure 7 : Schéma représentatif des courants sodiques et potassiques impliqués des canaux pacemaker.....	35
Figure 8 : Représentation schématique des canaux HCN	36
Figure 9 : Schéma représentatif des principaux courants des cellules du nœud sinusal auriculaire.	39
Figure 10 : Relation entre la fréquence cardiaque de repos et le risque de mortalité.	41
Figure 11 : Rôle de la fréquence cardiaque dans l'apparition de pathologies cardiovasculaire.	45
Figure 12 : Voies et régulation des substrats métaboliques myocardiques.....	48
Figure 13 : Schéma représentatif du cycle de Krebs.....	49
Figure 14 : Schéma représentatif du système créatine kinase.....	51
Figure 15 : Schéma résumant les 3 principaux mécanismes de la machinerie métabolique cardiaque.....	52
Figure 16 : Régulation de l'oxydation du glucose et du lactate par la pyruvate déshydrogénase	54
Figure 17 : Représentation schématique du métabolisme des acides gras myocardique.	56
Figure 18 : Schéma représentatif du contrôle du métabolisme énergétique cardiaque en normoxie (A) et sous ischémie (B).....	58
Figure 19 : Schéma représentatif de la molécule d'ivabradine.	69
Figure 20 : Schéma représentatif de la région ventriculaire gauche soumise à l'ischémie.....	78
Figure 21 : Schéma du protocole 1 : étude de l'effet-dose de l'IVA sur la propension à la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique.	85
Figure 22 : Schéma du protocole 2 visant à étudier l'effet de l'administration d'IVA à la dose de 0,5 mg/kg sur le SEFV en condition ischémique.	86
Figure 23 : Schéma du protocole 3a visant à étudier l'effet de l'IVA à la dose de 0,5 mg/kg et l'effet de l'ischémie sur le SEFV.	87
Figure 24 : Schéma du protocole 3b visant à étudier l'effet de l'IVA à la dose de 0,5 mg/kg sur le SEFV en condition non ischémique à 2 périodes de stimulation (400 ms vs. 300 ms).	87
Figure 25 : Évolution dose-dépendante du SEFV (étude 1, protocole 1)	90
Figure 26 : Évolution dose-dépendante de la fréquence cardiaque (étude 1, protocole 1)	90
Figure 27 : Impact de l'administration d'ivabradine à différentes doses (0,25 ; 0,5 et 0,625 mg/kg) sur la dP/dt_{\max} (étude 1, protocole 1).....	91
Figure 28 : Évolution du SEFV (étude 1, protocole 2).	93
Figure 29 : Évolution de la fréquence cardiaque (étude 1, protocole 2).	94

Figure 30 : Évolution du dP/dt_{max} VG (étude 1, protocole 2).....	95
Figure 31 : Taille de la région hypoxique mesurée (étude 1, protocole 2).	96
Figure 32 : Impact de l'administration d'IVA sur le SEFV déterminé avant et pendant ischémie, à périodes de stimulation variables (étude 1, protocole 3a).	97
Figure 33 : Impact de l'administration d'IVA sur la fréquence cardiaque déterminée avant et pendant ischémie, à périodes de stimulation variables (étude 1, protocole 3a).....	98
Figure 34 : Impact de l'administration d'ivabradine à la dose de 0,5 mg/kg sur la contractilité myocardique, avant et pendant réalisation de l'ischémie (étude 1, protocole 3a).....	99
Figure 35 : SEFV après administration d'IVA en normoxie (étude 1, protocole 3b).....	101
Figure 36 : Réduction de la fréquence cardiaque par l'IVA en normoxie (étude 1, protocole 3b).....	101
Figure 37 : Impact de la fréquence cardiaque sur le SEFV (étude 2, protocole 1)	108
Figure 38 : Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur la perfusion myocardique régionale (étude 2, protocole2).....	109
Figure 39 : Tomogrammes illustrant le FSMR sans traitement à FC spontanée avant occlusion (A) et à la reperfusion (B).....	117
Figure 40 : SEFV en conditions ischémiques à périodes de stimulation ventriculaires variables (étude 2, protocole 1).....	119
Figure 41 : Fréquence cardiaque sinusale en conditions ischémiques (étude 2, protocole 1).	120
Figure 42 : Contractilité myocardique conditions ischémiques (étude 2, protocole 1).....	121
Figure 43 : Taille de la région myocardique hypoxique (étude 2, protocole 1).....	122
Figure 44 : Représentation de lésions mitochondriales dans le groupe contrôle (A) et IVA (B).	124
Figure 45 : Représentation de lésions nucléaires dans le groupe contrôle (A) et IVA (B)...	124
Figure 46 : Représentation de lésions des capillaires myocardiques dans le groupe contrôle (A) et IVA (B).	125
Figure 47 : Évolution relative de la fréquence cardiaque par rapport à la valeur basale dans chaque groupe (étude 2, protocole 2).	126
Figure 48 : Évolution du FSMR normalisé relatif dans la région myocardique soumise à l'ischémie rapporté à la région non soumise à l'ischémie (étude 2, protocole 2).	127
Figure 49 : Effet de la baisse de la fréquence cardiaque sur le FSMR normalisé (étude 2, protocole 2).....	128
Figure 50 : Tomogrammes représentant le FSMR à fréquence cardiaque spontanée (1) et à la reperfusion sans traitement (2) (étude 2, protocole 2).....	128
Figure 51 : Impact des traitements sur un cœur sain normoxique (étude 3, protocole 1).....	137
Figure 52 : Impact de l'administration des différents traitements après une séquence d'ischémie - fibrillation ventriculaire (étude 3, protocole 2).....	138
Figure 53 : Impact de l'administration des traitements sur la survenue de la fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque spontanée (étude 3, protocole 3a).....	139
Figure 54 : Impact de l'administration d'IVA sur la survenue de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique, à différentes fréquences cardiaques (étude 3, protocole 3b).....	140
Figure 55 : Activité phosphorylase appréciée par la condensation des granulations qui coiffent les mitochondries.....	144
Figure 56 : Activité SDH appréciée par la condensation des granulations bleues qui coiffent les mitochondries.....	145
Figure 57 : Activité ATPase myofibrillaire Ca^{2+} -dépendante appréciée par la condensation des granulations bleues qui coiffent les mitochondries.	146
Figure 58 : Impact de l'administration des traitements sur la fréquence cardiaque sur un cœur sain en normoxique.....	150

Figure 59 : Impact de l'administration des traitements sur la contractilité myocardique sur un cœur sain en normoxie.....	151
Figure 60 : Impact de l'administration des traitements sur les concentrations en PCr (A), les rapports ATP (B), PCr/ATP (C) et ATP/ADP (D) d'un cœur sain, en conditions normoxiques.	154
Figure 61 : Impact de l'administration des traitements sur la fréquence cardiaque après une séquence d'ischémie/fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque rapide.	155
Figure 62 : Impact de l'administration des traitements sur la contractilité myocardique après une séquence d'ischémie/fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque rapide.....	157
Figure 63 : Impact des différents traitements sur le temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique, exprimé en sec (A) ou en pourcentage (B).	160
Figure 64 : Impact des différents traitements sur la fréquence cardiaque en conditions ischémiques.	160
Figure 65 : Impact des différents traitements sur la contractilité myocardique en conditions ischémiques.	161
Figure 66 : Représentation des concentrations myocardiques en ADP et du rapport PCr/ATP.	163
Figure 67 : Impact de la réduction de la fréquence cardiaque induite par l'ivabradine sur le TDFV.....	165
Figure 68 : Schéma anatomique pour le cœur isolé et perfusé.....	179
Figure 69 : Photographie représentant un cœur isolé et perfusé <i>in situ</i>	179
Figure 70 : Schéma représentant le système de cœur isolé perfusé en mode travaillant semi-recirculant.....	182
Figure 71 : Schéma représentatif du métabolisme cardiaque en présence de glucose marqué au ¹³ C.	185
Figure 72 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse couplé à une chromatographie en phase gazeuse	189
Figure 73 : Impact de l'IVA (3μM) sur la fréquence cardiaque.	193
Figure 74 : Impact de l'IVA (3μM) sur le volume d'éjection systolique.	194
Figure 75 : Impact de l'IVA sur le débit coronaire exprimé en ml/min (A) ou en ml/batt (B).	194
Figure 76 : Contribution relative du glucose et de l'oléate à la production d'acétyl-CoA mitochondriale pour la synthèse de citrate et flux de la glycolyse.....	197
Figure 77 : Production d'ATP cytosolique (A) et mitochondriale (B) exprimée par minute.	198
Figure 78 : Production d'ATP cytosolique (A) et mitochondriale (B) exprimée par battement cardiaque.....	199
Figure 79 : Impact du METO 4 μM sur la fréquence cardiaque.	201
Figure 80 : Impact du METO 4 μM sur le volume d'éjection systolique.	202
Figure 81 : Impact du METO 40 μM sur la fréquence cardiaque de cœurs isolés et perfusés en mode travaillant.	203
Figure 82 : Impact du METO 40 μM sur le débit cardiaque (A) et le volume d'éjection systolique (B) de cœurs isolés et perfusés en mode travaillant.	203
Figure 83 : Impact du METO 40 μM sur la contractilité et la relaxation myocardique de cœurs isolés et perfusés en mode travaillant.	204

ABBREVIATIONS

^{31}P :	phosphore 31
ADP :	adénosine diphosphate
AMP :	adénosine monophosphate
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
AMPk :	protéine kinase activée par l'AMP
ARN :	acide ribonucléique
ATP :	adénosine triphosphate
bpm :	battement par minute
Ca^{2+} :	ion calcium
CPT :	carnitine palmitoyltransférase-1
CO_2 :	dioxyde de carbone
CoA :	coenzyme A
Cr :	créatine
dMAPc :	durée du potentiel d'action monophasique corrigée
$\text{dP/dt}_{\text{max}}$ VG :	valeur maximale de la dérivée première de la pression ventriculaire gauche
$\text{dP/dt}_{\text{min}}$ VG :	valeur minimale de la dérivée première de la pression ventriculaire gauche
FADH_2 :	flavine adénine dinucléotide réduite
FAT :	transporteur d'acides gras/CD36
FCs :	fréquence cardiaque sinusale
FV :	fibrillation ventriculaire
G6-P :	glucose 6-phosphate
GLUT :	transporteur de glucose
HCN :	canal active par l'hyperpolarisation sensible aux nucléotides cycliques
<i>i.m.</i> :	intramusculaire
<i>i.p.</i> :	intrapéritonéale
<i>i.v.</i> :	intraveineux
IVA :	ivabradine
K^+ :	ion potassium
LDH :	lactate déshydrogénase
MCT :	transporteur d'acide mono-carboxylique
Mg^{2+} :	ion magnésium

min :	minute
mmHg :	millimètre de mercure
ms :	milliseconde
MVO ₂ :	consommation d'oxygène
Na ⁺ :	ion sodium
NAD ⁺ :	nicotiamide adenine dinucléotide oxydé
NADH :	nicotiamide adenine dinucléotide réduit
NO :	monoxide d'azote
OAA :	oxaloacétate
P-min :	pression minimale
PAd :	pression artérielle diastolique
PAm :	pression artérielle moyenne
PAs :	pression artérielle systolique
PCr :	phosphocréatine
PDH :	pyruvate déshydrogénase
PFK1 :	phospho-fructo-kinase 1
Pi :	phosphate inorganique
PDVG :	pression développée ventriculaire gauche
PROPRA :	propranolol
PSVG :	pression systolique ventriculaire gauche
qRT-PCR :	quantitative real time-polymerase chain reaction
RMN :	résonance magnétique nucléaire
<i>s.c.</i> :	sous-cutané
sec :	seconde
SEFV :	seuil électrique de fibrillation ventriculaire
SR :	réticulum sarcoplasmique
TDFV :	temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire
VG :	ventricule gauche

INTRODUCTION

Les cardiopathies ischémiques représentent aujourd'hui une cause majeure de morbi-mortalité cardiovasculaire, en particulier dans les pays industrialisés. Le vieillissement de la population laisse prévoir une augmentation de la prévalence de ces cardiopathies ischémiques dont le risque majeur est la mort subite par déclenchement de la fibrillation ventriculaire [Boengler, Schulz *et al.*, 2009]

L'arrêt cardiaque inopiné ou mort subite est un problème majeur de santé publique. Il correspond à plus de la moitié des décès de cause cardiovasculaire et plus de 15% des décès de toute causes confondues aux États-Unis [Zheng, Croft *et al.*, 2001; Saxon, 2005]. De plus, en France plus de 40 000 personnes décèdent d'un arrêt cardiaque dans leur environnement familial, faute d'une intervention immédiate et efficace.

La mort subite est définie comme une mort inattendue survenant immédiatement ou dans l'heure suivant un changement abrupt de l'état clinique stable [Koplan and Stevenson, 2009]. Souvent considérée comme le terme ultime de complications d'une tachycardie ventriculaire, elle peut survenir *de novo*, en dehors de toute tachycardie ventriculaire préalable. La mort subite peut alors être initiée par exemple, par une extrasystole ventriculaire ou une fibrillation auriculaire rapide. Par ailleurs, une hypertonie sympathique qui abaisse le seuil de fibrillation, favorise son déclenchement. Elle est souvent le fait d'une ischémie myocardique, que celle-ci soit due à une insuffisance coronarienne connue ou aux conséquences de la tachycardie ventriculaire, et représente depuis longtemps la cause majeure de mort subite notamment en milieu extrahospitalier [Roelandt, Klootwijk *et al.*, 1984; Janse and Wit, 1989; Koplan and Stevenson, 2009].

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés dans le cadre de cette thèse, à l'évaluation de la propension à la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique (par exemple, lors de la phase aiguë d'infarctus du myocarde) et avons tenté de comprendre les mécanismes tant fonctionnels que métaboliques qui pourraient être impliqués. Par conséquent, les notions de base sous-jacentes à tous l'ensemble de ces mécanismes seront présentées dans les prochaines sections.

1. La fibrillation ventriculaire

1.1 Définition

Décrite pour la première fois par Hoffa et Ludwig en 1849, la fibrillation ventriculaire est caractérisée par une activité électrique asynchrone, conduisant à une contraction myocardique non coordonnée. Sa survenue peut être mise en évidence, soit cliniquement (symptomatologie de l'arrêt circulatoire aigu) soit par une surveillance électrocardiographique dans un service de réanimation, ou encore par un enregistrement électrocardiographique continu (Holter) [Roelandt, Klootwijk *et al.*, 1984; Janse and Wit, 1989; Aramendi, de Gauna *et al.*, 2007]. Expérimentalement, la genèse de la fibrillation ventriculaire peut être appréciée par la détermination du seuil électrique de fibrillation ventriculaire (SEFV) ou du temps nécessaire à son déclenchement (temps du déclenchement de la fibrillation ventriculaire : TDFV). La fibrillation ventriculaire résulte en une perte du débit cardiaque et du débit coronaire menant à une ischémie globale cardiaque ce qui entraîne une chute de l'apport en substrats et une accumulation de métabolites toxiques [Angelos, Griffith *et al.*, 1995].

On définit deux types de fibrillation ventriculaire responsable de mort subite : la fibrillation ventriculaire primaire et la fibrillation ventriculaire secondaire. La fibrillation ventriculaire dite primaire est consécutive à l'occlusion partielle d'une artère coronaire et survient à la suite d'un déséquilibre entre les dépenses énergétiques myocardiques exagérées et l'apport énergétique insuffisant à la suite par exemple d'un spasme coronaire ou d'une angine de poitrine [Kochs, Eggeling *et al.*, 1993; de Jong, Marsman *et al.*, 2009]. Cette fibrillation ventriculaire primaire n'induit pas de dommages cellulaires irréversibles et est ainsi plus facilement maîtrisable que la fibrillation ventriculaire dite secondaire. En effet, cette dernière fait suite à l'obstruction totale d'une artère coronaire ayant pour conséquence l'apparition d'une nécrose tissulaire ventriculaire et des dommages cellulaires irréversibles en aval de l'occlusion [Kochs, Eggeling *et al.*, 1993].

De nombreux facteurs de risque de la mort subite (sexe, altérations structurelles...) ont été identifiés. Ainsi, son incidence est deux fois plus élevée chez l'homme que chez la femme, et de 3 à 5 fois plus importante dans le cas de cardiopathie structurelle, en particulier les pathologies coronariennes [Koplan and Stevenson, 2009].

Actuellement, un seul traitement existe, il consiste en l'application immédiate d'un choc électrique externe afin de rétablir l'activité électrique cardiaque. Il n'y a pas de molécule permettant d'augmenter le taux de survie après arrêt cardiaque chez l'homme [Stiell, Wells *et al.*, 2004]. Ce qui est surprenant étant donné les preuves expérimentales existantes qui rapportent un effet bénéfique de plusieurs traitements vasoactifs sur la survie dans ces conditions [Niemann, Cairns *et al.*, 1992; Krismer, Wenzel *et al.*, 2004]. Toutefois il est important de noter que la première médication pour les patients à lieu en moyenne 18 min après l'appel des services médicaux d'urgence lors d'un arrêt cardiaque extra-hôpital

[Rittenberger, Bost *et al.*, 2006]. Il apparaît donc important de développer de nouvelles approches thérapeutiques afin de réduire les risques de déclenchement de la fibrillation ventriculaire.

1.2 La fibrillation ventriculaire, une complication possible de l'ischémie myocardique

1.2.1 L'ischémie

L'ischémie myocardique est définie comme un déséquilibre entre l'apport et les besoins en oxygène et substrats [Rosano, Vitale *et al.*]. Au cours de l'ischémie myocardique, de nombreuses altérations apparaissent tant d'un point de vue ionique, métabolique que fonctionnel, pouvant conduire à l'apparition de fibrillation ventriculaire.

1.2.2 Conséquences métaboliques de l'ischémie

Le myocarde requiert pour son activité contractile un apport énergétique, ou plus exactement, un flux d'énergie, élevée. Ce flux élevé et permanent d'énergie assuré par la synthèse de molécules d'ATP est entretenu essentiellement par un métabolisme oxydatif, nécessitant un apport important en oxygène. Ainsi, en conditions ischémiques, l'équilibre énergétique entre besoins et apports en oxygène et substrats est altéré. Ce déséquilibre énergétique est responsable de modification des concentrations de phosphates à haute énergie, dont une chute des concentrations d'ATP et phosphocréatine (PCr) myocardiques [Carvajal and Moreno-Sanchez, 2003; Fragasso, Salerno *et al.*, 2008; Lindbom, Ramunddal *et al.*, 2008]. L'impact de l'ischémie myocardique sur le statut énergétique cardiaque sera développé plus précisément dans la suite de l'introduction de cette thèse (paragraphe 2.2.3).

De plus, l'ischémie myocardique partielle ou totale est responsable d'une altération de la capacité des cardiomyocytes à produire du monoxyde d'azote (NO) réduisant ainsi la vasodilatation adaptative [Rassaf and Luedike, 2010]. Il est proposé que ce phénomène explique la baisse des capacités d'adaptation du réseau coronarien en cas de majoration des demandes en oxygène particulièrement lors de l'effort [Linke, Erbs *et al.*, 2006]. D'ailleurs, la fibrillation ventriculaire survient très souvent lors d'un effort physique qui est responsable d'une tachycardie et d'une augmentation des résistances vasculaires périphériques ou postcharge. Dans ces conditions, où le débit sanguin coronaire est réduit, le cœur ne peut répondre à l'accroissement des demandes en oxygène. Ce phénomène justifie l'emploi de substances capables de réduire la consommation myocardique en oxygène (MVO_2) (bêta-bloquants, inhibiteurs calciques, ivabradine...).

En outre, de récentes études tendent à prouver qu'une altération des fonctions mitochondriales en rapport avec l'ischémie est probablement en cause dans les mécanismes initiaux aboutissant au déclenchement de la fibrillation ventriculaire [Wang, Radhakrishnan *et al.*, 2007]. En effet, une ischémie transitoire provoquerait au niveau mitochondrial : i) une baisse de l'apport en O_2 ; ii) une perte des capacités d'absorption du Ca^{2+} par la paroi mitochondriale ; iii) l'ouverture de pores de transition des membranes avec libération de facteurs pro-apoptotiques et de cytochrome c dans le cytoplasme et iv) une augmentation de la production d'espèces réactives oxygénées communément appelées radicaux libres laquelle induit une peroxydation lipidique des membranes mitochondriales.

1.2.3 Altérations ioniques et cellulaires associées à l'ischémie

Les conséquences néfastes de l'ischémie myocardique aigue sur le métabolisme énergétique ne se limitent pas à la baisse de production des composés phosphorés riches en énergie. En effet, diverses réactions liées au métabolisme énergétique produisent ou utilisent des protons (H^+) [Dennis, Gevers *et al.*, 1991; Avkiran, 2003], lesquels sont réutilisés en conditions normoxiques. Lors d'une ischémie myocardique, le pH intracellulaire diminue indiquant une accumulation d'ions H^+ intracellulaires. Cette accumulation est responsable d'une stimulation de l'échangeur Na^+/H^+ associée à un flux entrant d'ions Na^+ .

A la suite d'une ischémie s'ajoute l'absence d'un fonctionnement normal de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, entraînant un défaut d'entrée d'ions K^+ [Shaw and Rudy, 1997; Rubart and Zipes, 2005]. Ce phénomène s'aggrave avec la durée et l'importance de l'ischémie et une augmentation de la concentration intracellulaire d'ions Na^+ couplée à une diminution du gradient transmembranaire Na^+ . Ce défaut d'entrée d'ions K^+ est à la base des modifications de la repolarisation ventriculaire pendant l'ischémie. Par ailleurs, la surcharge sodique pourrait expliquer la réduction de l'entrée de Na^+ et de ce fait la durée, la vitesse de dépolarisation et l'amplitude des potentiels d'action monophasiques [Schamroth and Schamroth, 1984; Overholser, Zheng *et al.*, 2008] et explique en partie la genèse des arythmies [Yoshiyama, Takeuchi *et al.*, 1997; Gomez, Schwaller *et al.*, 2002; Quinn, Currie *et al.*, 2003].

De plus, la diminution du gradient transmembranaire sodique conduit à une diminution de l'activité de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} favorisant la sortie d'ions Ca^{2+} , voire un fonctionnement

en sens inverse, c'est-à-dire une entrée d'ions Ca^{2+} dans la cellule et une augmentation excessive d'ions Ca^{2+} lors de la diastole [Rubart and Zipes, 2005].

La Figure 1 illustre l'ensemble de ces changements ioniques qui font suite à une ischémie myocardique.

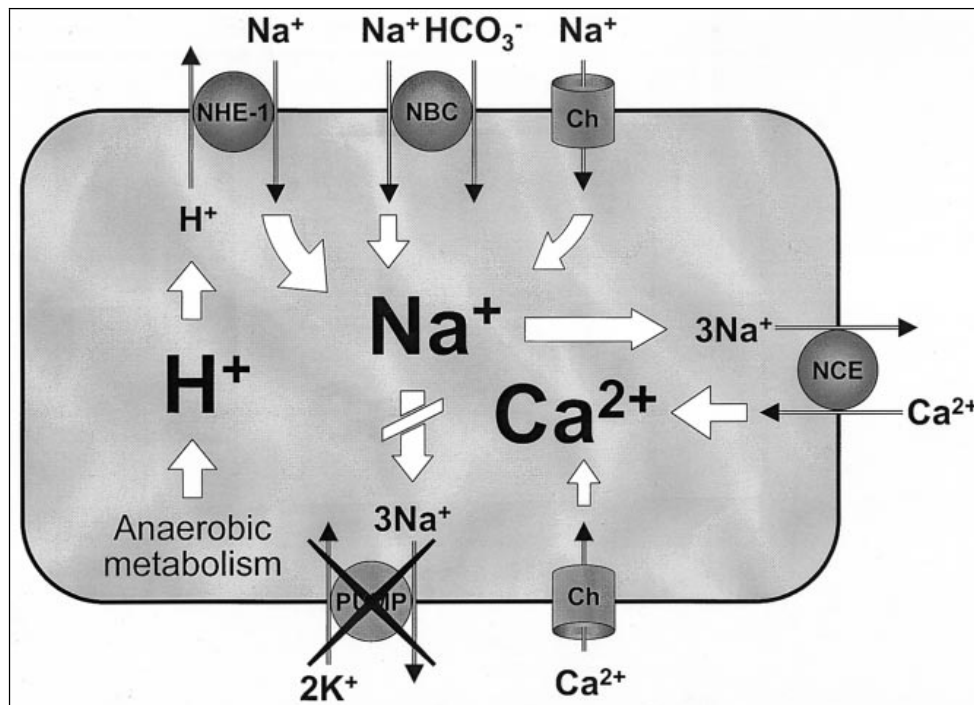


Figure 1 : Schéma représentatif des mécanismes ioniques altérés lors de l'ischémie/reperfusion, menant à l'accumulation de Na^+ et Ca^{2+} .

NHE-1, échangeur Na^+/H^+ ; NBC, co-transporteur $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$; Ch, canal Na^+ voltage-dépendant ; PUMP, pompe Na^+-K^+ ; NCE, échangeur $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$. Figure issue de Gazmuri *et al.* [Gazmuri, Ayoub *et al.*, 2002].

Par ailleurs, l'ischémie myocardique est responsable du développement d'une différence de polarité entre les cellules ischémiques et les cellules saines ce qui induit des courants de lésions expliquant le sus-décalage plus ou moins important du segment ST [Fischell, Fischell *et al.*, 2005; Verrier and Nieminen]. Il est à noter que des arythmies précoces (tachycardie ventriculaire, fibrillation ventriculaire...) apparaissent dans les toutes

premières minutes de l'ischémie myocardique et leur gravité est étroitement corrélée à la survenue d'une tachycardie sinusale. A la phase tardive s'observent à nouveau plus fréquemment des fibrillations ventriculaires dues à des macro-réentrées. Ces troubles du rythme tardifs sont eux également dépendants de la fréquence cardiaque.

D'un point de vue fonctionnel, l'ischémie myocardique se traduit par une diminution du débit coronaire en aval de l'occlusion créant une anomalie majeure de la cinétique segmentaire du myocarde ventriculaire pouvant aller jusqu'à l'akinésie [Cupo, Figueiredo *et al.*, 2007]. De plus, après 4 à 5 battements il apparaît une altération rapide de la fonction lusitrope ventriculaire gauche [Ootaki, Kamohara *et al.*, 2006]. Ces anomalies atteignent leur maximum vers la 10^{ème} seconde avant même que des troubles de la contraction ne se soient installés.

Enfin, lors d'une ischémie-hypoxie la production de radicaux libres peut débiter malgré un apport en oxygène réduit pouvant aboutir à des dommages cellulaires [Bertuglia and Giusti, 2003; Bertuglia and Giusti, 2005; Nishino, Okamoto *et al.*, 2008].

1.2.4 Les altérations de reperfusion

La reperfusion est l'étape nécessaire à la préservation du myocarde et elle permet de limiter les lésions que l'ischémie engendre. Toutefois, la reperfusion elle-même s'accompagne de lésions et d'événements délétères qui lui sont propres dont i) une dégradation des propriétés mécaniques du muscle cardiaque tant pour la contraction que pour la relaxation [Ferrari, 2000] qui peut toucher à la fois les régions ischémiques et les régions saines ; ii) une baisse de l'excitabilité cellulaire avec l'apparition de blocs de conduction auriculoventriculaires et intraventriculaires (élargissement des complexes QRS) pouvant être à l'origine d'arythmies de réentrées [Friedman, 2007] ; iii) des altérations du tissu myocardique (myofibrilles, sarcolemmes, œdème, accumulation de Ca^{2+} intracellulaires et foyers hémorragiques) apparaissent dès les premières minutes de la reperfusion [Ojha, Roy *et al.*, 2008]. Ces altérations physiopathologiques associées à la reperfusion sont désignées sous le terme de lésions de reperfusion. Ces lésions, en s'ajoutant aux dégâts qui se sont installés durant l'ischémie, présentent des degrés d'intensité qui dépendent de la sévérité et de la durée de l'ischémie. Par ailleurs, les arythmies de reperfusion sont d'autant plus graves que la reperfusion est plus précoce du fait de l'apparition de macro-réentrées [Das, Scott *et al.*] et conduisent bien souvent au déclenchement de la fibrillation ventriculaire. Les fibrillations ventriculaires consécutives à la reperfusion ne sont pas précédées d'extrasystolie alors que celles qui apparaissent lors de l'ischémie myocardique le sont.

2. Rôle de la fréquence cardiaque

Il est reconnu depuis longtemps que plus un animal est petit plus sa fréquence cardiaque de repos est élevée et que son espérance de vie est plus courte qu'un animal plus gros de la même classe. Ceci s'explique par le ratio perte de chaleur (qui est fonction de la surface corporelle) sur production de la chaleur (qui est fonction de la masse corporelle) qui augmente lorsque la taille corporelle diminue. Aussi, la prévention d'une chute de la température corporelle nécessite une augmentation du métabolisme corrélée à une augmentation de la fréquence cardiaque [Levine, 1997].

Chez les mammifères, à l'exception de l'Homme, il existe une relation linéaire inverse entre la fréquence cardiaque et l'espérance de vie : la durée de vie augmente graduellement avec la réduction de la fréquence cardiaque (Figure 2) [Levine, 1997]. Ainsi, comme illustré dans la Figure 3, il semble que le nombre de battements cardiaques par durée de vie soit prédéterminé chez les mammifères et la relation entre le nombre de battements cardiaques dans une vie rapporté à la masse corporelle est encore plus étroite. Ces observations suggèrent que malgré de grandes variations de masse corporelle et de fréquence cardiaque, le nombre total de battements cardiaques dans une vie chez les mammifères est remarquablement constant.

L'équipe de Azbel rapporte que la consommation d'énergie par atome corporel par battement cardiaque est identique chez tous les mammifères, suggérant que la durée de vie est prédéterminée par l'énergétique de base des cellules vivantes [Azbel, 1994]. Il rapporte ainsi que chaque atome consomme en moyenne 10 molécules d'oxygène par durée de vie et environ 10^{-8} molécule d'oxygène par battement cardiaque.

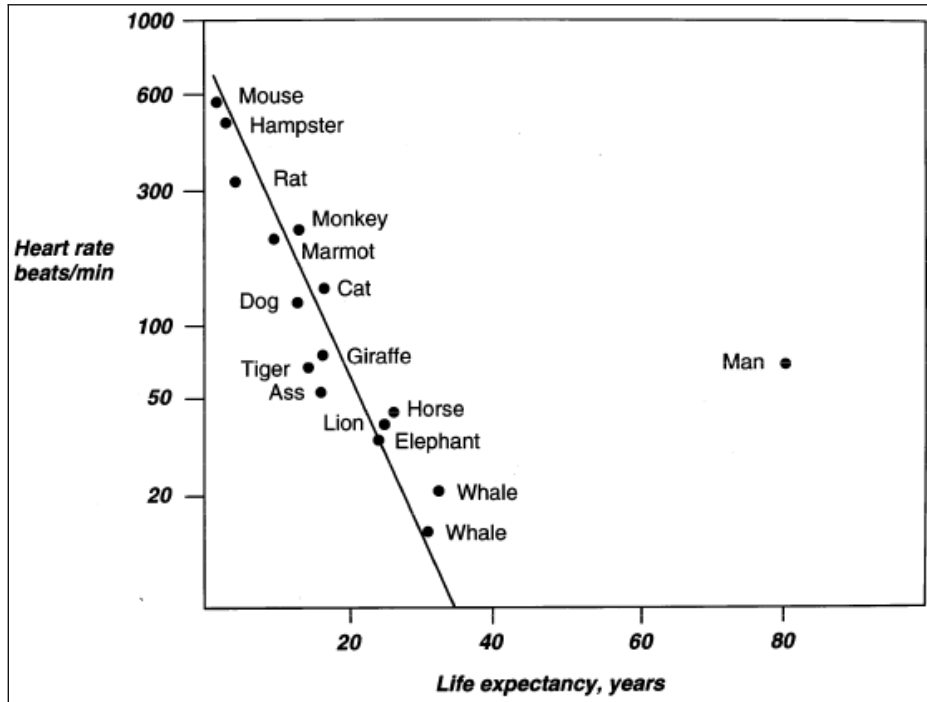


Figure 2 : Relation semi-logarithmique entre la fréquence cardiaque de repos et l'espérance de vie chez les mammifères.

Figure issue de Levine [Levine, 1997].

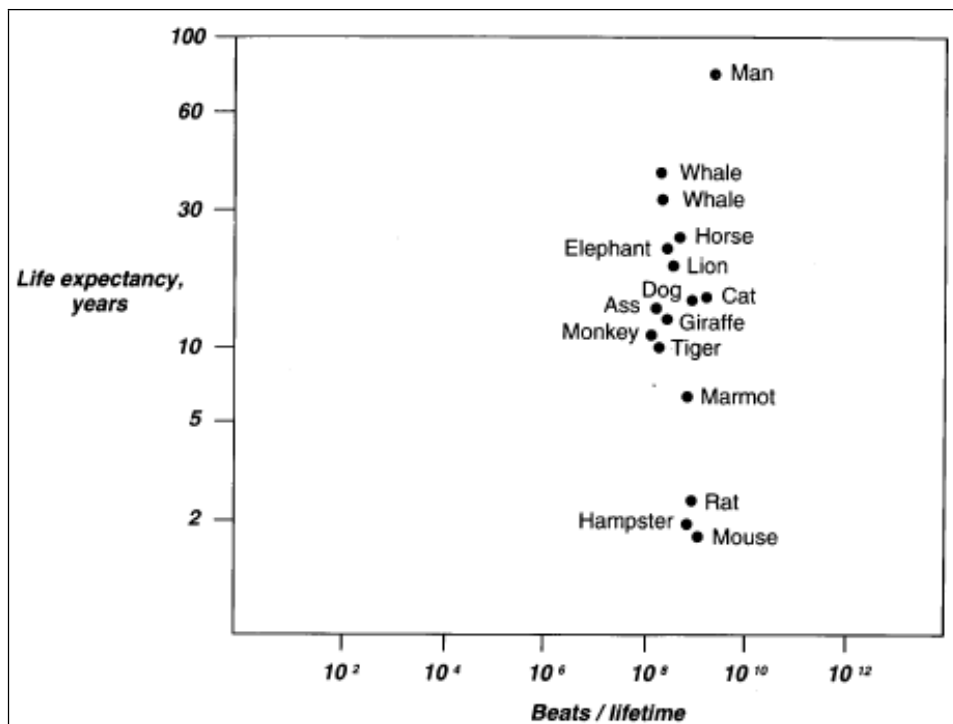


Figure 3 : Relation entre l'espérance de vie et le nombre de battements cardiaques total par durée de vie

Figure issue de Levine [Levine, 1997].

Ainsi, une des possibilités pour rallonger son espérance de vie pourrait être de diminuer la consommation d'énergie via une réduction du nombre de battements cardiaques. Chez l'Homme, par exemple, on compte 3 milliards de battements cardiaques en une vie. Ainsi, une réduction de la fréquence cardiaque de 80 à 60 battements par minute (bpm) résulterait, *de manière théorique*, en une augmentation de 25% de l'espérance de vie (Figure 4).

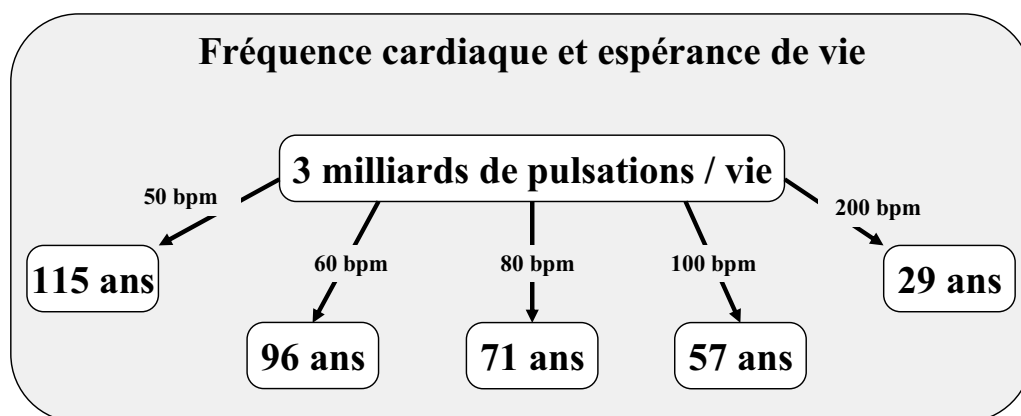


Figure 4 : Relation entre la fréquence cardiaque et l'espérance de vie.
Adapté de Cook et al. [Cook, Togni *et al.*, 2006].

Pour une meilleure compréhension des effets de la baisse de la fréquence cardiaque sur le système cardiovasculaire, il est important de considérer les mécanismes pathologiques liés à une augmentation de celle-ci dans les maladies cardiovasculaires. En effet, plusieurs travaux rapportent l'existence d'un lien entre une fréquence cardiaque élevée et diverses pathologies cardiovasculaires ainsi qu'une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire [Palatini and Julius, 1997a; Palatini and Julius, 1997b; Palatini, 2009]. Cependant, la relation entre la tachycardie et la mortalité cardiovasculaire est encore assez complexe et beaucoup de mécanismes sous-jacents semblent être impliqués [Palatini and Julius, 1997b; Fox, Borer *et al.*, 2007; Reil and Bohm, 2007].

2.1 Genèse et contrôle physiologique de l'activité du nœud sinusal

Chez l'Homme, et les mammifères en général, l'activité cardiaque spontanée est initiée par une région spécifique du cœur : le nœud sinusal. En effet, bien que d'autres régions cardiaques soient douées d'une activité électrique, comme le nœud auriculo-ventriculaire et les fibres de Purkinje, le rythme cardiaque en conditions physiologiques est imposé par l'activité du nœud sinusal (activité pacemaker). Cette région est localisée dans l'oreillette droite, à la jonction du *crista terminalis* auriculaire et du tissu nerveux. Le nœud sinusal a été découvert il y a plus d'un siècle par Keith et Flack [Keith and Flack, 1907] juste après la découverte de la jonction auriculo-ventriculaire par Tawara [Tawara, 1906; Silverman, Grove *et al.*, 2006]. Le rôle pacemaker dominant du nœud sinusal par rapport au nœud auriculo-ventriculaire et aux fibres de Purkinje a été découvert par l'équipe Gaskell chez la tortue à la fin des années 1800 [Gaskell, 1882; Gaskell, 1883]. De plus, le rythme intrinsèque du nœud sinusal est plus élevé que celui du nœud auriculo-ventriculaire et des fibres de Purkinje masquant ces deux derniers (Figure 5).

La fréquence cardiaque est donc principalement le reflet de l'activité du nœud sinusal mais ne fournit pas d'information sur le reste du système de conduction cardiaque et sur le myocarde ventriculaire qui peuvent être dans certaines pathologies responsables d'arythmies pouvant entraîner la mort subite [Verrier and Tan, 2009].

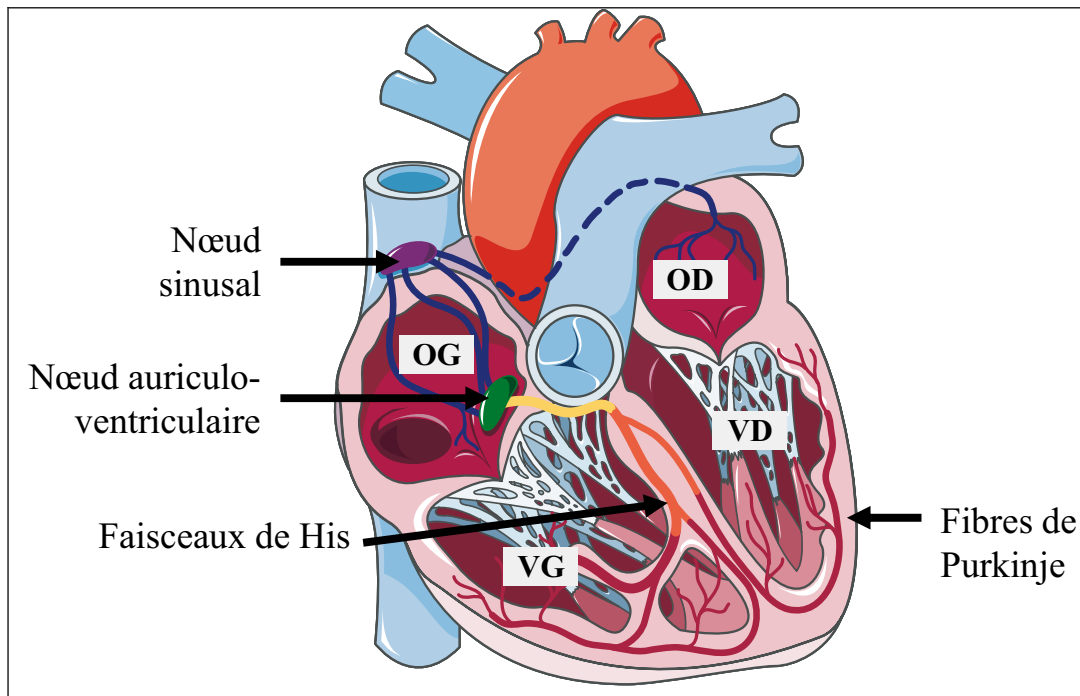


Figure 5 : Représentation du système de conduction dans un cœur de mammifère.
OG, oreillette gauche ; OD, oreillette droite ; VG, ventricule gauche ; VD, ventricule droit.

L'activité du nœud sinusal est régulé via deux mécanismes : extrinsèque et intrinsèque. Sa régulation extrinsèque en réponse à une activité physique, mentale et aux états de veille [Verrier and Josephson, 2009] est réalisée par l'activité des deux voies du système nerveux autonome, la circulation hormonale et l'activité baroréflexe (système cardiorespiratoire et barorécepteurs). Sa régulation intrinsèque est, quant à elle, déterminée par les courants dit pacemaker, dont le courant I_f est le courant majeur [Mangoni and Nargeot, 2008; Verrier and Tan, 2009].

2.1.1 Contrôle extrinsèque

Cette régulation du nœud sinusal est définie par l'activité des deux voies du système nerveux autonome, la circulation hormonale et l'activité baroréflexe. Les principaux mécanismes d'augmentation de la fréquence cardiaque par le système nerveux autonome sont l'accroissement de la pente de dépolarisation diastolique lente et la dépolarisation du potentiel de repos en réponse à une libération de noradrénaline ou d'adrénaline. En revanche, l'influence du système parasympathique, via l'activité du nerf vague, induit une réduction de la fréquence cardiaque. En effet, une libération d'acétylcholine augmente la perméabilité membranaire aux ions potassium ce qui induit une hyperpolarisation des cellules du nœud sinusal et finalement une diminution de la pente de dépolarisation diastolique lente [Verrier and Josephson, 2009].

En dehors de la l'activité du système nerveux autonome, la régulation extrinsèque de l'activité du nœud sinusal se fait également via l'hypoxie, l'exercice ou la température.

2.1.2 Contrôle intrinsèque : les courants ioniques

Le contrôle de l'activité intrinsèque n'a été décrit que plus récemment avec l'apparition des techniques électrophysiologiques de microélectrodes sur des préparations des cellules isolées (techniques de « patch-clamp »). Ainsi, il a été démontré que l'activité électrique spontanée du nœud sinusal auriculaire est douée de propriétés particulières [Mangoni and Nargeot, 2008]. Contrairement aux cellules auriculaires ou ventriculaires, les cellules du nœud sinusal ne possèdent pas de potentiel de repos. A partir de la valeur la plus négative du potentiel membranaire, appelée potentiel diastolique maximal, la membrane de ces cellules se dépolarise lentement jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement du potentiel d'action, donnant naissance à un nouveau potentiel. Cette phase (phase 4 du potentiel d'action membranaire des cellules) est appelée *dépolarisation diastolique lente* et est à la base de l'automatisme de l'activité électrique du tissu nodal, transmise à l'ensemble de cœur via le tissu de conduction. Cette activité rythmique des cellules du nœud sinusal auriculaire est la conséquence d'un effet coopératif de plusieurs types de canaux ioniques (Figure 6) [Mangoni and Nargeot, 2008].

La première description en 1979 [Brown, DiFrancesco *et al.*, 1979] d'un courant entrant activé par une hyperpolarisation membranaire dans une préparation de cellules pacemaker du nœud sinusal auriculaire démontraient l'existence d'un mécanisme capable de générer une activité électrique spontanée et de modifier sa fréquence en présence d'une stimulation bêta-adrénergique.

Dans les cellules sinusales auriculaires, la dépolarisation diastolique lente via le potentiel diastolique maximal implique l'activation d'un flux ionique net entrant, capable de générer et de maintenir cette phase. Il est admis que plusieurs mécanismes ioniques sont responsables de la dépolarisation diastolique lente : (i) un courant de fond net entrant, I_{bg} (bg = background) démasqué rapidement par la désactivation du courant potassique retardé ; (ii) un courant entrant calcique de type transitoire, $I_{Ca,T}$ (T = Transitoire) ; (iii) enfin, un courant entrant activé par une hyperpolarisation, I_f (f = funny), appelé courant pacemaker [Mangoni and Nargeot, 2008].

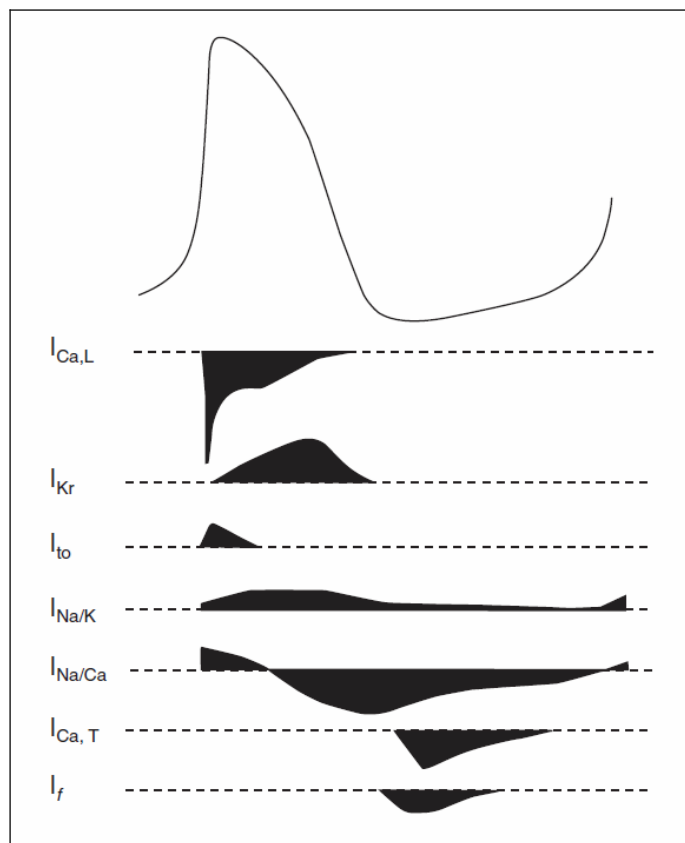


Figure 6 : Schéma illustrant l'évolution en fonction du temps des principaux courants ioniques impliqués dans l'activité sinusale spontanée.

$I_{Ca,L}$ = courant calcique lent ; $I_{Ca,T}$ = courant calcique transitoire ; I_{Kr} = courant potassique retardé ; I_f = courant pacemaker ; I_{to} = courant transitoire sortant ; I_{Na} = courant sodique.

Figure issue de Le Heuzey [Le Heuzey, 2004].

2.1.2.1 Le courant de fond : I_{Bg}

Comme pour la plupart des cellules excitables, les cellules du nœud sinusal possèdent un courant de fond qui est la résultante de plusieurs composantes. Il est principalement constitué par la pompe sodium/potassium et l'échangeur sodium/calcium. La première est une adénosine triphosphatase (ATPase) membranaire qui favorise la sortie de 3 ions sodium pour l'entrée de 2 ions potassium, responsable d'un courant entrant net. Alors que l'échangeur sodium/calcium permet l'entrée de 3 ions sodium et la sortie d'un ion calcium [Le Heuzey, 2004]. Contrairement au courant de fond des myocytes auriculaires, ventriculaires et des cellules de Purkinje, celui des cellules nodales ne contient pas le courant I_{K1} , courant sortant potassique responsable du maintien du potentiel de repos à des valeurs négatives (entre -90 et -80 mV) proches du potentiel électrochimique des ions potassium [Bois and Lenfant, 1990; Le Heuzey, 2004].

2.1.2.2 Le courant calcique de type T, $I_{Ca,T}$

Hagiwara *et al.* [Hagiwara, Irisawa *et al.*, 1988] ont démontré la présence de deux types de courants calciques dans des cellules sinusales de lapin : (i) le courant calcique de type lent, $I_{Ca,L}$, ayant un seuil d'activation de -40 mV, (ii) et un courant calcique de type transitoire, $I_{Ca,T}$, qui s'inactive plus rapidement et complètement en fonction du temps avec un seuil d'activation de -60 mV. Ces auteurs étaient les premiers à rapporter un ralentissement de la pente de dépolarisation diastolique lente après l'utilisation d'ions nickel bloquant le courant $I_{Ca,T}$ sans affecter le courant $I_{Ca,L}$. Ces résultats suggèrent la participation du courant $I_{Ca,T}$ à la phase de dépolarisation diastolique lente, tandis que le courant $I_{Ca,L}$ participe d'avantage à la phase de dépolarisation du potentiel d'action sinusal (phase ascendante systolique) [Ono, Shibata *et al.*, 2003].

2.1.2.3 Canal pacemaker : courant I_f

2.1.2.3.1 Canaux pacemaker

Le courant pacemaker I_f est le courant majeur impliqué dans la dépolarisation diastolique lente des cellules pacemaker et est régulé de façon directe par l'AMPc intracellulaire [Vilaine, 2006]. Il s'agit d'un courant net entrant non spécifique, transporté par les ions sodium et potassium (Figure 7). Son nom provient de sa particularité, en effet, il s'active pendant la phase d'hyperpolarisation du potentiel d'action contrairement aux autres courants ioniques qui s'activent après une dépolarisation membranaire, d'où le nom « funny ». Les études de « patch-clamp » ont été les premières à montrer que ce courant entrant est d'autant plus important que le potentiel membranaire est négatif [DiFrancesco, Ducouret *et al.*, 1989; Mangoni and Nargeot, 2008].

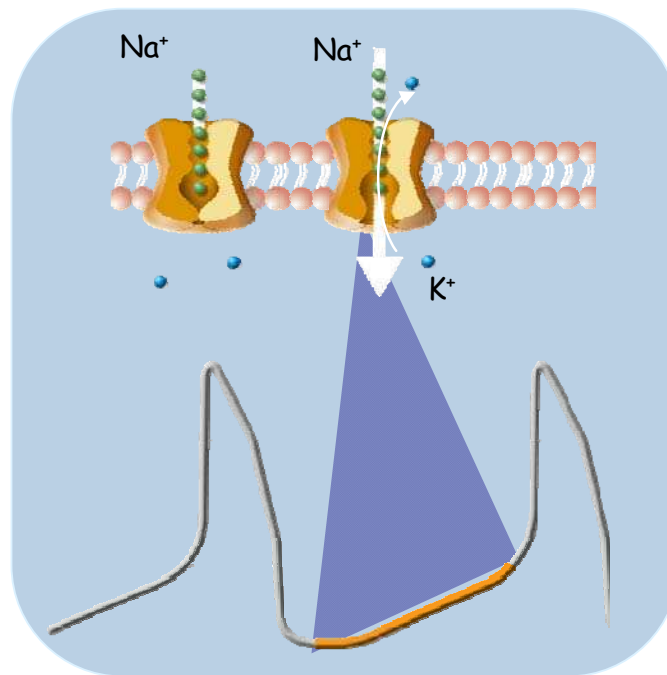


Figure 7 : Schéma représentatif des courants sodiques et potassiques impliqués des canaux pacemaker.

Adapté de Thollon *et al.* [Thollon, Cambarrat *et al.*, 1994].

Le progrès majeur dans la compréhension des mécanismes moléculaires à la base du fonctionnement du canal pacemaker a été atteint suite au clonage des canaux activés par l'hyperpolarisation sensible aux nucléotides cycliques (HCN) à la fin des années 1990 [Zagotta, Olivier *et al.*, 2003]. Plusieurs isoformes de ce canal transportant le courant I_f ont été identifiées, dont certaines localisées dans le nœud sinusal : les isoformes 1, 2, 3 et 4 [Clapham, 1998]. Ces canaux font partie de la super-famille des canaux voltage-dépendant non sélectifs aux cations. Comme largement décrit dans la littérature [Biel, Schneider *et al.*, 2002; Rosenbaum and Gordon, 2004], ils possèdent 6 domaines transmembranaires (S1 à S6), avec le domaine S4 fortement chargé positivement correspondant au « voltage sensor » et le domaine P situé entre les segments S5 et S6 formant le pore permettant le passage et la sélectivité des ions. Ces canaux HCN possèdent également une partie N- et C-terminale intracellulaire, dont la dernière correspond au site de fixation des nucléotides monophosphates cycliques (AMPC) (Figure 8).

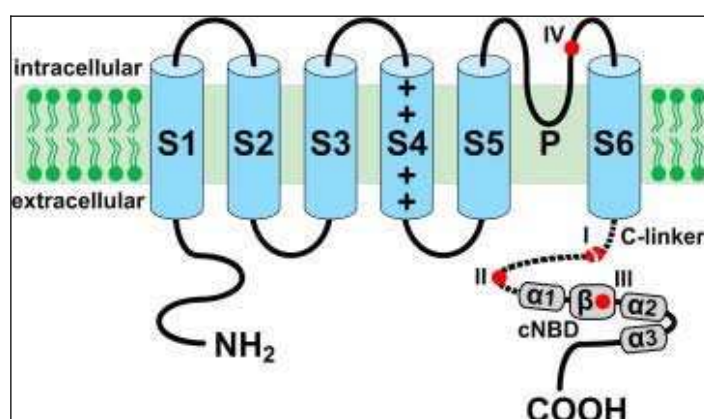


Figure 8 : Représentation schématique des canaux HCN

Le canal HCN comporte 6 segments transmembranaires (S1 à S6), un domaine P formant un pore pour le passage et la sélectivité des ions (P), une partie N- et C-terminale intracellulaire. Le « voltage-sensor » est formé l'hélice du segment S4 fortement chargé positivement.

Figure issue de Verkerk *et al.* [Verkerk, van Ginneken *et al.*, 2009].

Ces quatre isoformes HCN ont été trouvés dans des cœurs de vertébrés, mais leur expression varie en fonction du tissu cardiaque, de l'espèce, de l'âge et de l'état physiopathologique. Dans le myocarde, ce sont les cellules du nœud sinusal et les fibres de Purkinje qui présentent le plus fort taux d'expression de ces protéines. [Shi, Wymore *et al.*, 1999; Han, Bao *et al.*, 2002; Marionneau, Couette *et al.*, 2005]. De plus, dans la plupart des espèces, l'expression majoritaire des canaux HCN dans le nœud sinusal est celle de l'isoforme HCN4 représentant environ 80% de l'expression totale. Le reste de la transcription des canaux HCN dans les cellules du nœud sinusal adulte correspond principalement aux isoformes HCN2 [Moosmang, Stieber *et al.*, 2001; Zicha, Fernandez-Velasco *et al.*, 2005] et HCN1 [Shi, Wymore *et al.*, 1999; Marionneau, Couette *et al.*, 2005] (Tableau 1).

En outre, il existe une différence régionale dans l'expression de ces différentes isoformes de canaux comme l'ont décrit Tellez *et al.* [Tellez, Dobrzynski *et al.*, 2006]. En effet, ces auteurs rapportent une expression augmentée des isoformes HCN1 et HCN4 au centre du nœud sinusal de lapin par rapport à la périphérie.

Tableau 1 : Expression de l'ARNm des canaux HCN dans le cœur.

Reference	Cell type	Species	Method ^a	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	
Shi et al. 1999	SAN	Rabbit	RPA	18% ^b	1%	–	81%	
	Purkinje fibres	Rabbit	RPA	49%	11%	–	40%	
	Ventricle	Rabbit	RPA	–	100%	–	–	
	Ventricle	Rat	RPA	–	93%	–	7%	
	Neonatal ventricle	Rat	RPA	–	82%	–	18%	
Ishii et al. 1999	SAN	Rabbit	N	ND	ND	ND	++	
	Ventricle	Rabbit	N	ND	ND	ND	–	
	Atrium	Rabbit	N	ND	ND	ND	–	
Moroni et al. 2001	SAN	Rabbit	N, ISH	+	ND	ND	ND	
	AVN	Rabbit	ISH	±	ND	ND	ND	
Ludwig et al. 1998	Total heart	Mouse	N, ISH	–	+	–	ND	
Yasui et al. 2001	Embryonic ventricle	Mouse	9.5 dpc	QPCR	36%	6%	–	58%
			18 dpc	QPCR	19% ^c	45%	–	36%
Moosmang et al. 2001	SAN	Mouse	ISH	±	+	–	+++	
	Ventricle	Mouse	ISH	–	++	–	+	
	Atrium	Mouse	ISH	–	+	–	+	
Santoro et al. 1998	Total heart	Mouse	N	–	+	–	+	
		Human	N	–	+	ND	ND	
Ludwig et al. 1999	Total heart	Human	N	–	++	–	+	
	Ventricle	Human	RT-PCR	ND	+	ND	+	
	Atrium	Human	RT-PCR	ND	+	ND	+	
Seifert et al. 1999	Total heart	Human	N	ND	ND	ND	+	

HCN, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated; SAN, sinoatrial node; RPA, RNase protection assay; N, Northern blot analysis; ISH, in situ hybridization; QPCR, quantitative polymerase chain reaction; RT-PCR, nonquantitative PCR; AVN, atrioventricular node; dpc, days postcoitum; ND, not determined. Expression levels: below detection level (–), just above background (±), low (+), moderate (++), high (+++).

^a Each of the methods has specific intrinsic limitations. For this reason relative expression levels of HCN channel isoforms cannot be compared between the individual studies.

^b The percentage refers to the relative amount of a given HCN channel mRNA with respect to total HCN channel mRNA. The total expression of mRNA in rabbit Purkinje fibres and ventricle is about 4% and 1%, respectively, of that found in rabbit SAN (Shi et al. 1999).

^c Total amount of HCN channel mRNA at 18 dpc corresponds to about 20% of the amount at 9.5 dpc.

Tableau issu de Biel *et al.* [Biel, Schneider *et al.*, 2002].

Ces quatre isoformes présentent des seuils d'activité, une cinétique et une sensibilité à l'AMPc différents [Kaupp and Seifert, 2001; DiFrancesco, 2005]. Par exemple, les canaux HCN1 présentent un seuil d'activité plus positif, l'activité cinétique la plus élevée et la sensibilité à l'AMPc la plus basse [Santoro, Liu *et al.*, 1998; Ludwig, Zong *et al.*, 1999a; Biel, Schneider *et al.*, 2002], alors que les canaux HCN4 sont activés plus lentement et très sensibles à l'AMPc [Ishii, Takano *et al.*, 1999; Ludwig, Zong *et al.*, 1999b; Biel, Schneider *et al.*, 2002].

2.1.2.3.2 Régulation autonome

En plus de contribuer essentiellement à la production d'une activité spontanée, le courant pacemaker I_f reflète également l'action chronotrope des neurotransmetteurs. En effet, la région du nœud sinusal auriculaire chez les mammifères est très innervée par le système nerveux autonome qui exerce une régulation directe sur l'activité pacemaker [Baruscotti, Bucchi *et al.*, 2005; Mangoni and Nargeot, 2008]. Ainsi, une stimulation bêta-adrénergique augmente le potentiel membranaire et l'activité du courant pacemaker I_f et donc la pente de dépolarisation diastolique lente. Cette activation est déclenchée par une augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaire due à l'activation de l'adénylate cyclase via les récepteurs bêta-adrénergiques [Vilaine, 2006]. Il en résulte une diminution du temps de diastole et donc une augmentation de la fréquence cardiaque. À l'inverse, une stimulation vagale entraîne une réduction de la fréquence cardiaque par diminution de l'activité de l'adénylate cyclase après activation des récepteurs muscariniques, réduisant ainsi les niveaux d'AMPc intracellulaire [DiFrancesco and Tromba, 1988; Mangoni and Nargeot, 2008] (Figure 9).

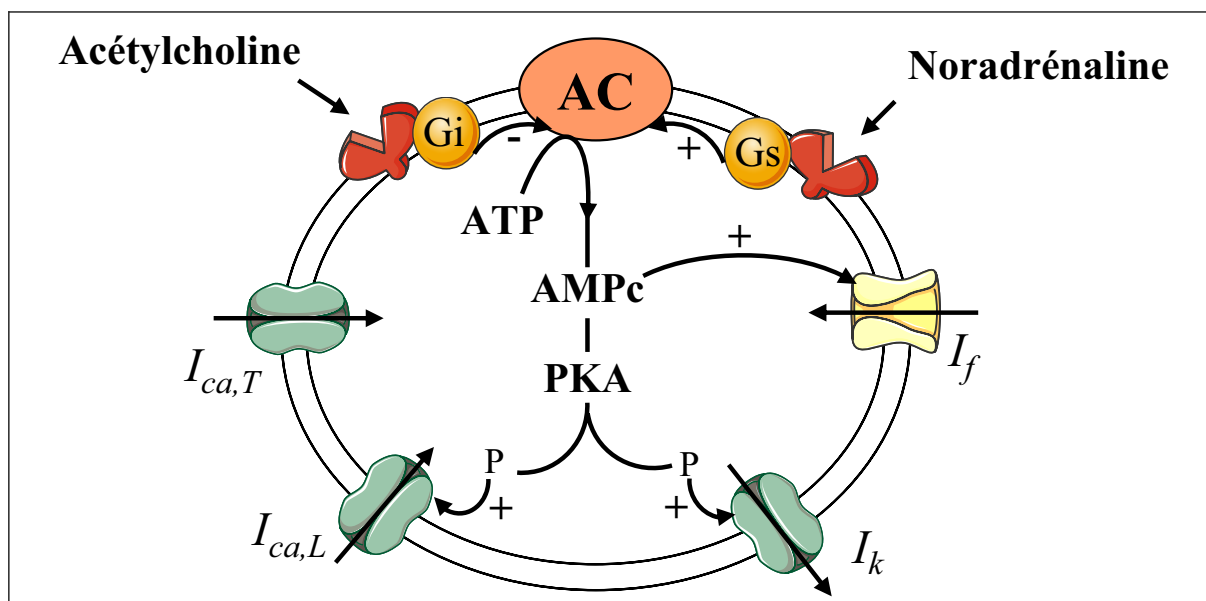


Figure 9 : Schéma représentatif des principaux courants des cellules du nœud sinusal auriculaire.

2.2 Fréquence cardiaque et risque cardiovasculaire

La fréquence cardiaque est connue depuis longtemps pour être le facteur le plus important, en dehors de l'activité contractile cardiaque, de la régulation de la consommation myocardique en oxygène : MVO₂ [Hall and Palmer, 2008]. Il est bien connu que l'accroissement de la fréquence cardiaque augmente le risque de mortalité cardiovasculaire [Cook, Togni *et al.*, 2006].

En effet, depuis plusieurs années, des études soulignent l'existence d'une corrélation positive significative entre la mortalité cardiovasculaire, la mortalité globale et la fréquence cardiaque [Cook, Togni *et al.*, 2006]. Une des premières études à s'être intéressée à cette question à grande échelle date des années 1980 [Dyer, Persky *et al.*, 1980]. Les auteurs ont montré qu'il existait une relation positive entre la fréquence cardiaque et les différentes causes de mortalité, en particulier coronaire et cardiovasculaire globale.

À l'heure actuelle, les arguments cliniques et épidémiologiques démontrent que l'augmentation de la fréquence cardiaque est un facteur prédictif de mortalité cardiovasculaire [Palatini and Julius, 1997a; Palatini and Julius, 1997b; Palatini, 2009]. Les connaissances actuelles suggèrent deux mécanismes possibles : (i) la fréquence cardiaque a une action directe sur la structure cardiovasculaire par un effet mécanique de la contrainte pulsatile ; (ii) la fréquence cardiaque est le reflet d'une hyperactivité sympathique, elle-même étant un facteur de risque majeur du développement de lésions athérosclérotiques et de ses complications. Ainsi, certains auteurs suggèrent qu'une fréquence cardiaque supérieure à 80-85 bpm est considérée comme anormalement élevée car associée à une augmentation

significative du risque cardiovasculaire [Palatini, 1999]. Une étude menée en France auprès de 5 713 hommes actifs asymptomatiques, sans maladie cardiovasculaire décelable avec un suivi par tests d'effort progressif standard sur une période de 23 ans a démontré que le risque de mort subite et d'infarctus aigu du myocarde était augmenté chez les individus ayant une fréquence cardiaque de repos supérieure à 75 bpm [Jouven, Empana *et al.*, 2005] (Figure 10).

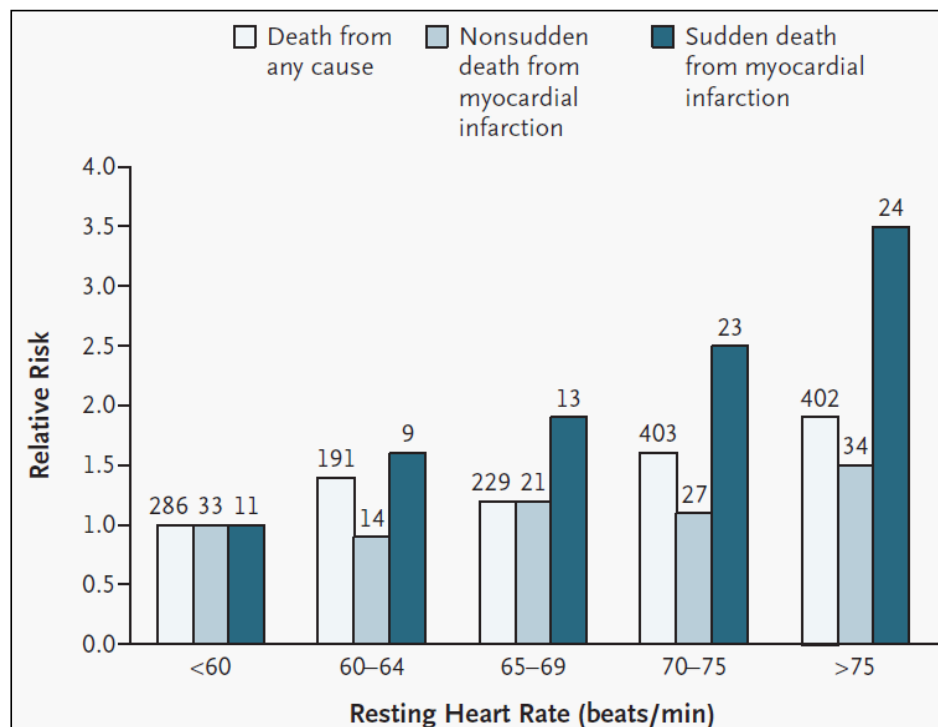


Figure 10 : Relation entre la fréquence cardiaque de repos et le risque de mortalité.
 Sont représentés, les risques de mortalité de toute cause et de mort subite et non subite par infarctus du myocarde. Le quintile le plus bas (groupe de référence) était composé d'individus dont la fréquence cardiaque au repos était inférieure à 60 bpm.
 Figure issue de Jouven *et al.* [Jouven, Empana *et al.*, 2005].

2.2.1 Tachycardie et lésions athérosclérotiques

De manière physiologique, l'artère est soumise en permanence à des contraintes mécaniques pouvant, en conditions pathologiques, entraîner le développement de plaques d'athéromes. Leur rupture est suivie de phénomènes de thrombose et d'une augmentation de la rigidité de la média. Dans des modèles animaux, il a été démontré qu'une élévation de la fréquence cardiaque au repos favorise le développement de l'athérosclérose par augmentation des contraintes au niveau de la paroi artérielle [Kaplan, Manuck *et al.*, 1987; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Giannoglou, Chatzizisis *et al.*, 2008]. Des études plus récentes rapportent également qu'une fréquence cardiaque élevée augmente l'importance et la fréquence des contraintes au niveau de la paroi artérielle ainsi qu'un raccourcissement du temps de diastole qui facilite l'exposition de l'endothélium aux forces de cisaillement [Giannoglou, Chatzizisis *et al.*, 2008]. Cette augmentation du travail cardiaque et des contraintes imposées aux parois artérielles favorise la croissance des cellules musculaires lisses et le dépôt de collagène, ce qui aboutit au développement d'une rigidité artérielle.

De plus, des études angiographiques chez l'Homme ont montré qu'une augmentation de la masse musculaire du ventricule gauche et de la fréquence cardiaque étaient associées à une plus haute incidence de rupture de plaques dans les artères coronaires [Heidland and Strauer, 2001].

2.2.2 Tachycardie sinusale et ischémie myocardique

Les cardiopathies ischémiques représentent aujourd'hui une cause majeure de morbi-mortalité cardiovasculaire, en particulier dans les pays industrialisés. Malgré le recours aux techniques de revascularisation de plus en plus fréquentes, le traitement médical reste indispensable pour la majorité des patients. Par ailleurs, une revascularisation myocardique n'est pas toujours recommandée [Saha and Marber, 2005]. Toutefois, l'efficacité des traitements médicaux habituels (bêta-bloquants, dérivés nitrés...) est prouvée mais reste limitée.

L'importance de la durée de diastole dans la perfusion myocardique n'est plus à démontrer. En effet, la perfusion coronaire a lieu lors de la diastole qui représente une phase importante pour l'oxygénation et l'apport en nutriments du myocarde. Ainsi, une augmentation de la fréquence cardiaque est un facteur déclenchant ou aggravant la plupart des épisodes d'ischémie myocardique par réduction du temps de diastole et donc la perfusion myocardique et augmentation de la consommation d'oxygène. De plus, il est admis que la tachycardie est le phénomène le plus délétère pour un cœur ischémique [Rosano, Vitale *et al.*]. Ainsi une baisse de la fréquence cardiaque exercerait une action anti-ischémique liée à la réduction de la MVO_2 et à l'augmentation du temps de perfusion en diastole [Guth, Heusch *et al.*, 1987; Heusch, Skyschally *et al.*, 2008].

En outre, une augmentation chronique de la fréquence cardiaque est un facteur prédictif de mortalité cardiovasculaire plus particulièrement chez les coronariens. Inversement, la réduction de la mortalité cardiovasculaire observée avec l'utilisation des bêta-bloquants et certains inhibiteurs calciques est attribuée en partie à la baisse de la fréquence cardiaque qu'ils induisent [Nul, Doval *et al.*, 1997; Vilaine, 2006; Rosano, Vitale *et al.*, 2010].

Plusieurs mécanismes ont été avancés afin d'expliquer l'implication de la fréquence cardiaque dans la mortalité d'origine ischémique, dont son rôle dans la genèse de lésions d'athérosclérose [Kaplan, Manuck *et al.*, 1987; Custodis, Baumhake *et al.*, 2008] et dans les ruptures de plaques chez les coronariens comme décrit précédemment.

De plus, il a été démontré qu'il existe une relation inverse entre la fréquence cardiaque et le seuil de fibrillation ventriculaire [Vaillant, Timour *et al.*, 2008; Vaillant, Tsibiribi *et al.*, 2008; Zhou, Lei *et al.*, 2009]. Ainsi, selon plusieurs auteurs, ce phénomène est responsable de la fibrillation ventriculaire primaire et qui est donc lié à l'inadéquation entre l'apport réduit en oxygène et sa consommation exagérée : plus l'inadéquation est importante plus le risque de fibrillation ventriculaire est élevé et inversement. En effet, une tachycardie tend à faciliter la désynchronisation des cellules ventriculaires musculaires, en particulier dans un cœur soumis à une ischémie myocardique, augmentant la MVO_2 et altérant la perfusion coronaire ce qui peut conduire à la mort subite [Jouven, Empana *et al.*, 2005] (Figure 11).

Chez les coronariens, il a été montré qu'une réduction de la fréquence cardiaque permettait d'atténuer l'impact délétère de l'angine de poitrine et de l'ischémie myocardique [Rosano, Vitale *et al.*, 2010]. En effet, l'étude de Stone *et al.* [Stone, Gibson *et al.*, 1990] rapporte que le propranolol qui induit une baisse de la fréquence cardiaque plus importante que le diltiazem permet une meilleure prévention des épisodes d'ischémie myocardique [Stone, Gibson *et al.*, 1990]. D'autres études rapportent que l'effet bénéfique des bêta-bloquants est neutralisé lors de l'application d'un pacing auriculaire et donc du retour à la normale de la fréquence cardiaque [Guth, Heusch *et al.*, 1987; Aupetit, Frassati *et al.*, 1998].

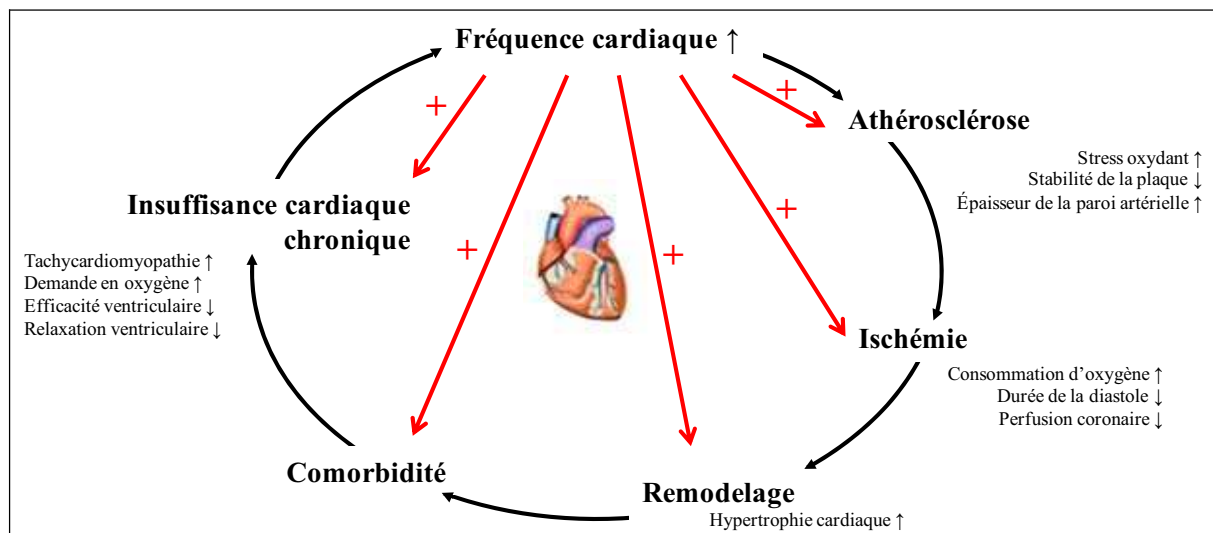


Figure 11 : Rôle de la fréquence cardiaque dans l'apparition de pathologies cardiovasculaires.

Figure adaptée de Reil *et al.* [Reil, Reil *et al.*, 2009].

2.2.3 Impact sur le métabolisme énergétique cardiaque

Comme précisé précédemment, l'ischémie est responsable d'altérations myocardiques notamment métaboliques. Ainsi, le métabolisme énergétique d'un cœur sain en conditions normoxiques sera développé ci-après afin de mieux comprendre l'impact de l'ischémie myocardique sur ce métabolisme.

2.2.3.1 Métabolisme énergétique d'un cœur sain

L'ATP est la principale source d'énergie myocardique. En conditions normales, presque toute la production d'ATP (>95%) myocardique est issue de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Le cœur a de faibles réserves en ATP et phosphocréatine : PCr (~ 8 mM ATP et ~ 15 mM PCr) et un fort taux d'hydrolyse (0,5 $\mu\text{mol/g}$ de poids humide/s au repos) ne lui permettant que quelques secondes d'autonomie [Mootha, Arai *et al.*, 1997; Gupta, Chacko *et al.*, 2009]. Il existe donc un *turnover* très rapide des réserves en ATP, soit environ toutes les 10 secondes en conditions normales. Ainsi, le myocarde dépend d'un apport continu et adéquat en oxygène et en substrats énergétiques [Stanley, Recchia *et al.*, 2005].

La machinerie métabolique est complexe et peut être représentée par 3 principaux mécanismes.

Le premier est l'utilisation des substrats énergétiques (Figure 12). Le cœur est un organe omnivore qui utilise pour la production d'énergie principalement les acides gras et les glucides (glucose et lactate), mais aussi les corps cétoniques et dans une proportion moindre les acides aminés [Neely and Morgan, 1974; Stone, Gibson *et al.*, 1990; Scolletta and Biagioli]. En conditions normales, 60-90% de l'acétyl-CoA entrant dans le cycle de Krebs

provient de la bêta-oxydation des acides gras, et 10-40% provient de l'oxydation du pyruvate issu du lactate et dans une proportion moindre de la glycolyse. Ainsi, la glycolyse contribue à environ 5% de la production totale d'ATP, alors que l'oxydation mitochondriale y contribue à 95%. L'oxydation de l'acétyl-CoA issus des glucides et acides gras par le cycle de Krebs conduit à la formation d'équivalents réducteurs (NADH) et de dioxyde de carbone (CO₂) (Figure 13).

Cependant, selon la nature du substrat énergétique métabolisé par le myocarde, la quantité d'oxygène utilisée pour la synthèse d'ATP est différente. L'acide gras est un meilleur substrat que le glucose en termes de production d'énergie : 129 ATP par molécule de palmitate oxydé sont produites contre 38 ATP par molécule pour le glucose [Neely and Morgan, 1974]. En revanche, l'oxydation d'une molécule d'acide gras, par exemple le palmitate, consomme plus d'oxygène que l'oxydation complète d'une molécule de glucose. Ainsi, le rapport ATP formé/oxygène produit qui représente le rendement énergétique, est de 2,6 pour le palmitate et 3,0 pour le glucose. Cette différence est sans conséquence en conditions normoxiques mais pourrait devenir un facteur déterminant pour la fonction cardiomyocytaire en situation de déficit en oxygène telle que l'hypoxie ou l'ischémie [Scolletta and Biagioli, 2010].

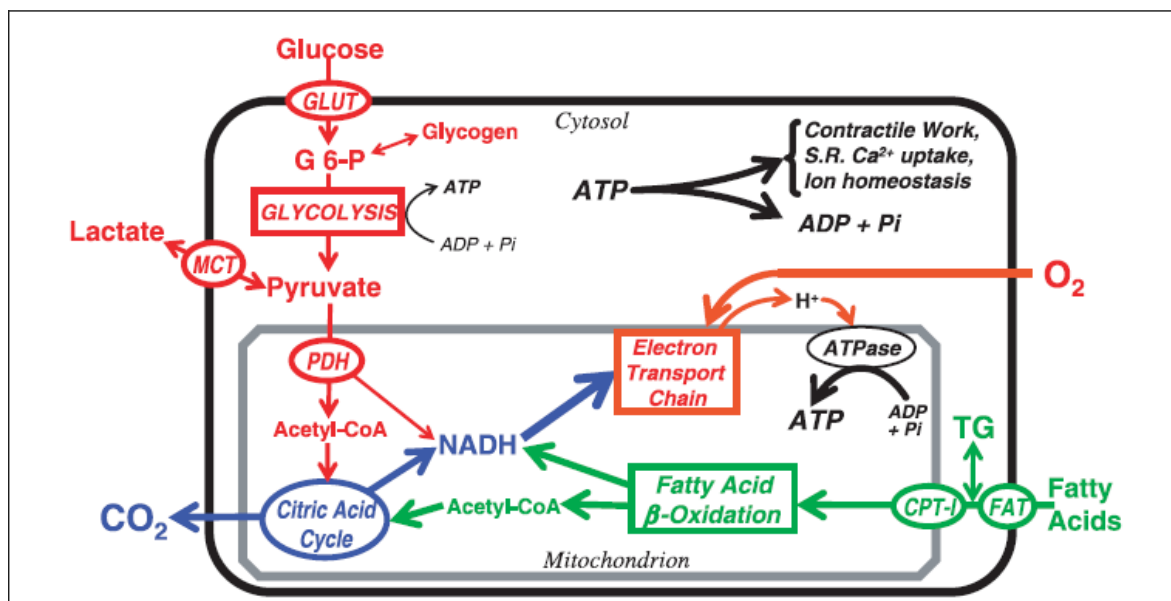


Figure 12 : Voies et régulation des substrats métaboliques myocardiques.

CPT-1, carnitine palmitoyltransférase-1 ; FAT, transporteur des acides gras /CD36 ; G6-P, glucose 6-phosphate, GLUT ; transporteur du glucose ; MCT, transporteur des acides monocarboxylique ; PDH, pyruvate déshydrogénase.

Figure issue de Stanley *et al.* [Stanley, Recchia *et al.*, 2005].

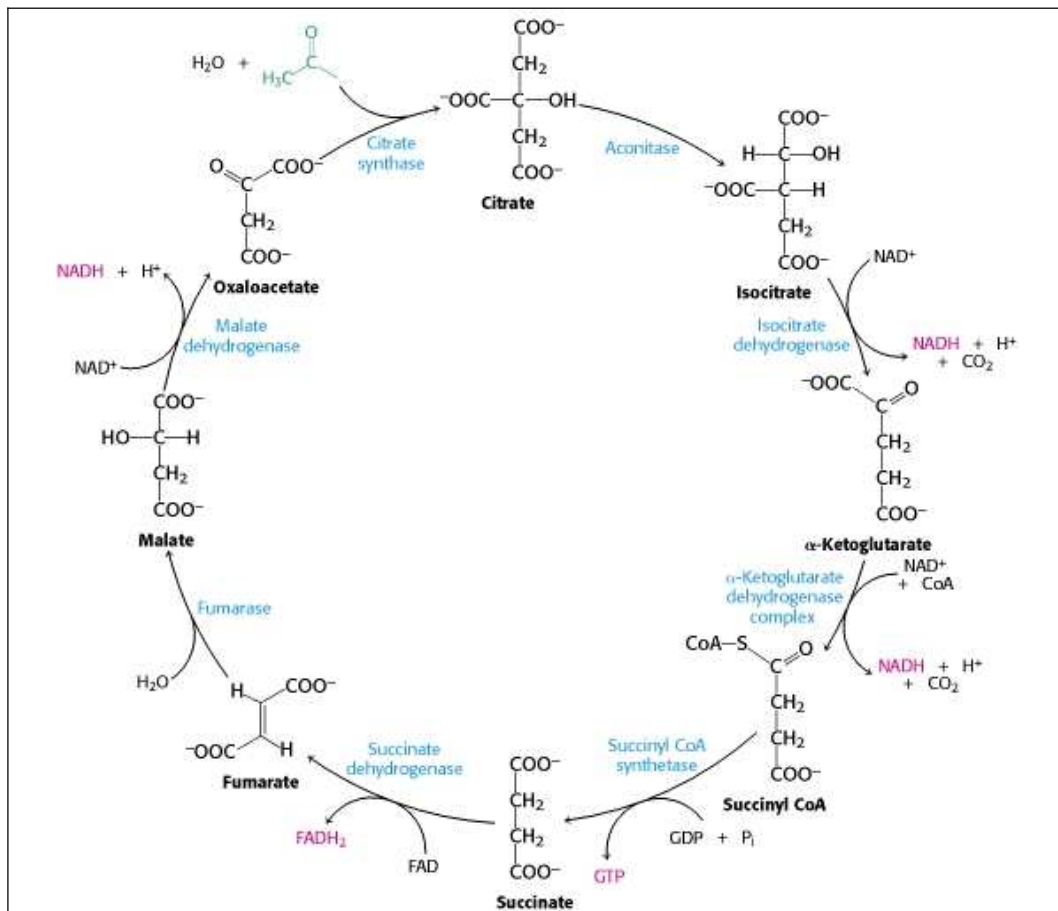


Figure 13 : Schéma représentatif du cycle de Krebs.

Figure issue de Berg [Berg, 2008].

Le **deuxième** composant de la machinerie métabolique cardiaque est la phosphorylation oxydative, c'est-à-dire la production d'énergie par la chaîne respiratoire mitochondriale. Les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (I à IV) permettent le transfert des électrons du NADH à l'oxygène, au NAD et à l'eau, créant ainsi un gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne mitochondriale. Ce gradient active l'ATP synthase pour la production d'ATP par phosphorylation d'ADP [Scolletta and Biagioli, 2010]. Par la suite, la translocase des nucléotides adényliques (ANT) réalise l'échange ATP – ADP entre le cytoplasme et la mitochondrie, afin de permettre la sortie d'ATP vers le cytosol.

Le troisième et dernier composant est le transfert et l'utilisation d'ATP déterminant le transport et la consommation d'énergie par les myofibrilles cardiaques. Le transfert d'ATP est rendu possible via le système créatine kinase (CK) (Figure 14) qui comporte ATP, ADP, créatine (Cr), phosphocréatine (PCr) et phosphate inorganique (Pi). Ce système CK implique le transfert de groupement phosphates entre la Cr et les nucléotides adényliques, réaction catalysée par les différentes isoformes de la CK, au niveau cytosolique (MM-CK) et au niveau de l'espace inter-membranaire mitochondrial (mi-CK) [Neubauer, 1998].

Dans la cellule myocardique, la MM-CK est présente soit sous forme libre dans le cytosol, soit fixée aux compartiments intracellulaires à proximité des ATPases (membrane plasmique, myofilaments, réticulum sarcoplasmique).

Dans le compartiment cytosolique l'ATP est hydrolysé en ADP + Pi qui sont alors transférés dans l'espace inter-membranaire mitochondrial afin de servir de substrats pour la phosphorylation oxydative pour la resynthèse d'ATP (production d'ATP mitochondriale) [van Beek, 2007]. L'ATP peut également être resynthétisé à partir de la PCr et l'ADP, réaction catalysée par la MM-CK couplée à l'ATPase de la myosine au niveau cytosolique. Cette production nette d'ATP permet de maintenir un rapport ATP/ADP élevé, favorisant un fonctionnement optimal de l'ATPase.

Ensuite, la mi-CK située dans l'espace inter-membranaire mitochondriale et couplée aux phosphorylations oxydatives, catalyse la reformation de PCr et ADP à partir d'ATP et Cr [van Beek, 2007]. L'ADP libéré par la mi-CK est alors immédiatement disponible et stimule la respiration mitochondriale qui est donc sous la dépendance de la mi-CK. La PCr est

rapidement diffusée de la mitochondrie aux myofibrilles où la MM-CK catalyse la formation d'ATP à partir de PCr.

Le système créatine kinase joue un rôle tampon afin de maintenir constant les niveaux d'ATP. Le ratio PCr/ATP est un bon index du métabolisme énergétique cardiaque et une valeur inférieure à 1,6 a été rapportée comme indice prédictif de mortalité cardiovasculaire chez les patients présentant une cardiomyopathie dilatée. Par ailleurs, la littérature rapporte qu'une augmentation de 20% du travail cardiaque provoque chez des patients atteints d'une sévère coronaropathie une diminution du rapport PCr/ATP de 1,8 jusqu'à 0,9 pendant l'exercice pour revenir à 1,3 après une phase de récupération de 2 min [Weiss, Bottomley *et al.*, 1990]. Cependant, l'analyse des niveaux d'ATP et PCr tissulaires chez les patients est rendue difficile de par leur instabilité chimique lors de la collecte d'échantillons [Scolletta and Biagioli, 2010].

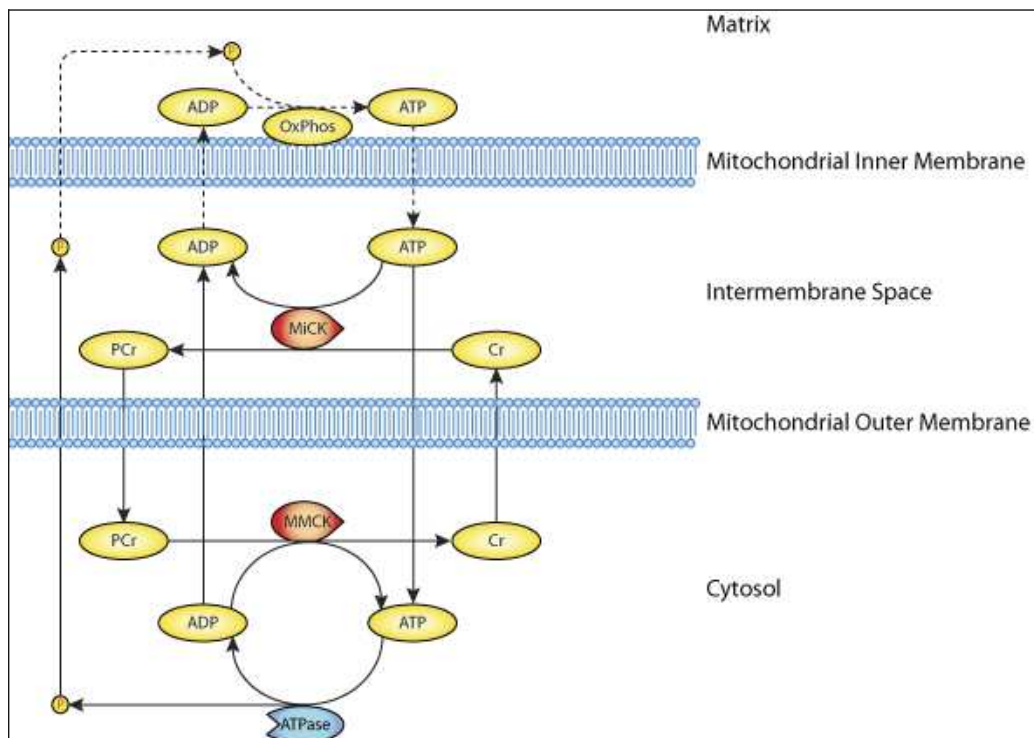


Figure 14 : Schéma représentatif du système créatine kinase.

OxPhos, phosphorylation oxydative ; MIM, membrane mitochondriale interne ; MOM, membrane mitochondriale externe. Figure issue de van Beek [van Beek, 2007].

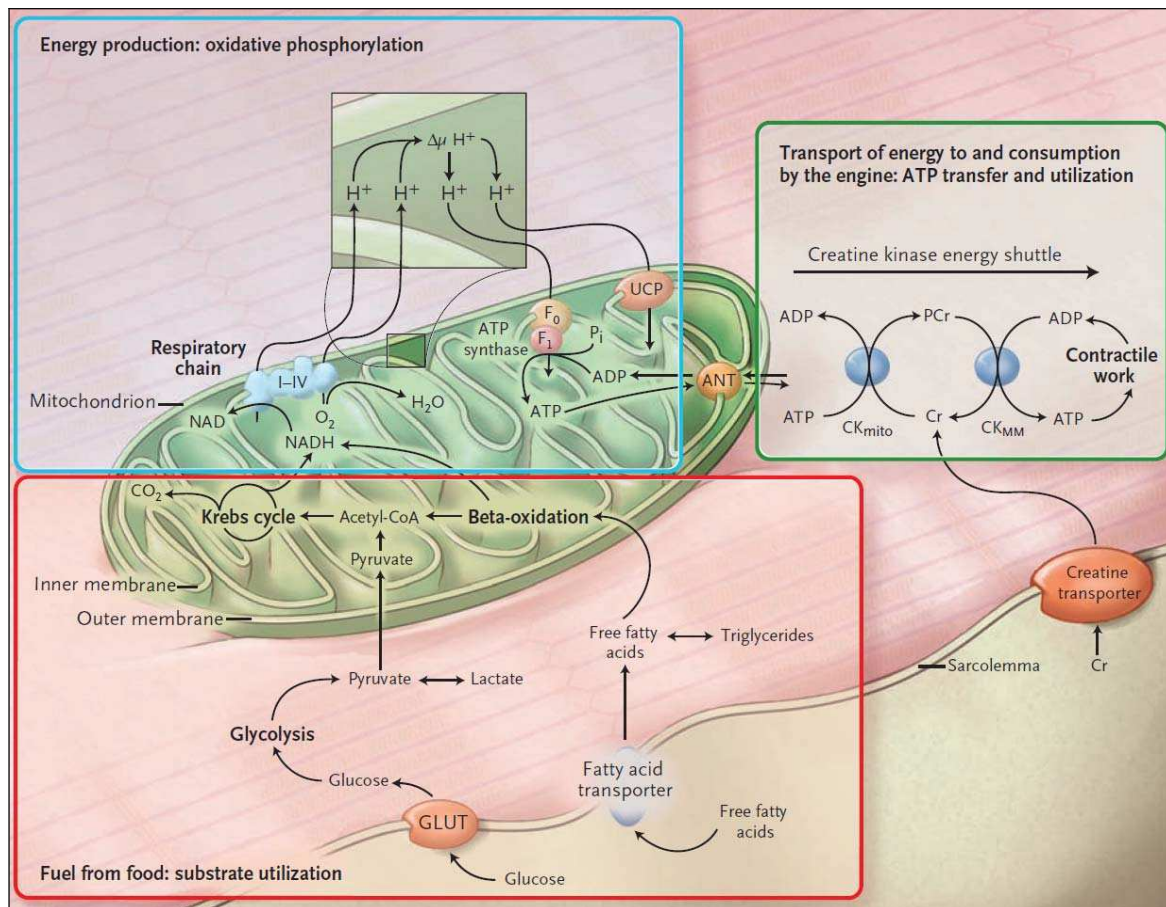


Figure 15 : Schéma résumant les 3 principaux mécanismes de la machinerie métabolique cardiaque.
Figure issue de Neubauer [Neubauer, 2007].

2.2.3.1.1 Métabolisme des glucides

La voie glycolytique convertit le glucose-6-phosphate et NAD^+ en pyruvate et NADH , ce qui permet de générer 2 ATP par molécule de glucose. Le NADH et le pyruvate produits par la glycolyse sont soit utilisés dans la mitochondrie afin de générer du NAD^+ et CO_2 (glycolyse aérobie), soit convertis en lactate et NAD^+ dans le cytosol (glycolyse anaérobie).

La glycolyse s'effectue à partir du glucose exogène ou des réserves endogènes du glycogène. Le transport du glucose à l'intérieur des myocytes est fonction du gradient de glucose de part et d'autre du sarcolemme, il est rendu possible grâce aux transporteurs de glucose, principalement GLUT-4 et dans une moindre mesure GLUT-1 (Figure 12). Lors d'une stimulation par l'insuline (ischémie, travail cardiaque augmenté) ou par l'activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPk) (exercice ou stress), les transporteurs de glucose sont recrutés au niveau du sarcolemme, permettant une augmentation de l'utilisation de glucose exogène [Stanley, Recchia *et al.*, 2005].

La phosphofructokinase-1 (PFK-1) est une enzyme clé de la voie glycolytique et catalyse la première étape irréversible du processus. Cette enzyme utilise l'ATP pour produire du fructose 1,6-bisphosphate et est activée par l'ADP, AMP et Pi, alors qu'elle est inhibée par l'ATP. Ainsi, la régulation de cette enzyme fait en sorte que la glycolyse augmente lors d'une chute du potentiel de phosphorylation [Stanley, Recchia *et al.*, 2005]. Le pyruvate formé lors de la glycolyse a trois devenir principaux : (i) la conversion en lactate, (ii) la décarboxylation en acétyl-CoA et enfin (iii) la décarboxylation en oxaloacétate (OAA) ou malate (anaplérose).

La décarboxylation du pyruvate est l'étape clé de l'oxydation des glucides et est catalysée par la pyruvate déshydrogénase (PDH) (Figure 16). Au niveau cardiaque, l'oxydation du glucose et du pyruvate, ainsi que l'activité de la PDH sont diminuées par une forte oxydation des acides gras [Stanley, Recchia *et al.*, 2005]. En plus de la formation de lactate et de l'oxydation par la PDH, le pyruvate peut rentrer dans le cycle de Krebs sous forme d'OAA ou de malate. Cette réaction correspond à l'anaplérose et a pour objectif de maintenir les réserves d'intermédiaires du cycle de Krebs.

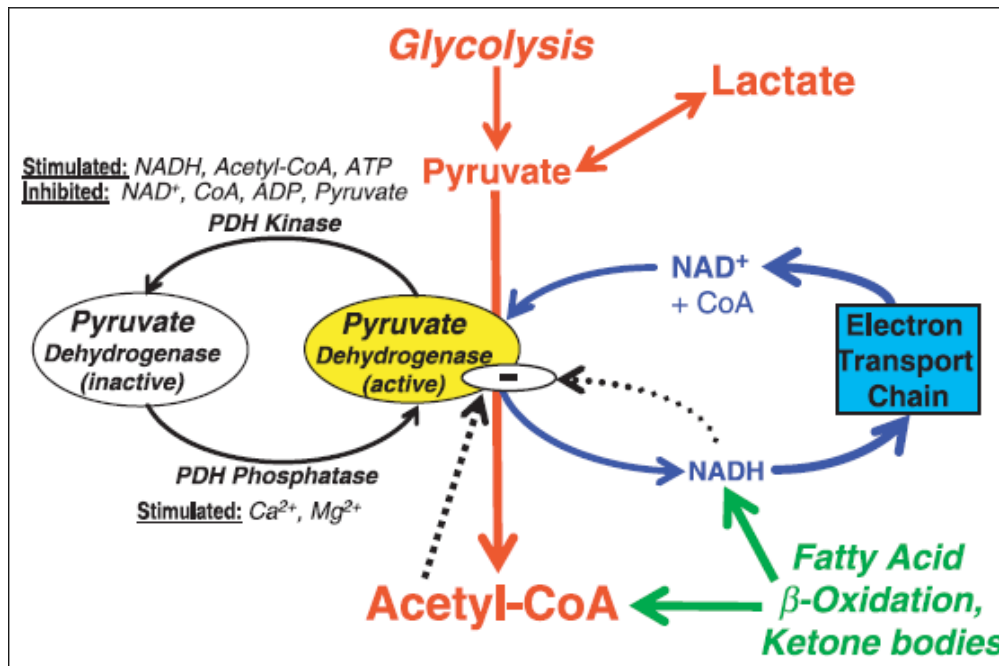


Figure 16 : Régulation de l'oxydation du glucose et du lactate par la pyruvate déshydrogénase
Figure issue de Stanley *et al.* [Stanley, Recchia *et al.*, 2005].

2.2.3.1.2 Métabolisme des acides gras

Le bon fonctionnement du cœur repose sur un équilibre particulièrement sophistiqué des voies métaboliques lipidiques destinées à assumer l'utilisation et la transformation des lipides en réponse aux besoins [Stanley, Recchia *et al.*, 2005].

Le taux de capture des acides gras par le cœur est déterminé par la concentration plasmatique d'acides gras non estérifiés qui varie chez l'Homme sain au cours de la journée, ou lors d'un stress métabolique (ischémie, diabète...). Les acides gras entrent dans la cellule cardiomyocytaire soit par diffusion passive soit via des transporteurs transmembranaires dont la translocase des acides gras (FAT dont la protéine CD36 est la forme la plus abondamment exprimée dans le cœur) ou la protéine de liaison aux acides gras de la membrane plasmique (FABPpm) [Stanley, Recchia *et al.*, 2005]. Après leur entrée dans les cellules, ils sont activés

par passage sous la forme d'acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase. Le produit de l'acyl-CoA synthase, c'est-à-dire les acyl-CoA à chaîne longue, peuvent alors être soit estérifiés en triglycérides phosphate acyl-transférase, soit transférés à l'intérieur de la matrice mitochondriale via un système de transport carnitine-dépendant qui met en jeu 3 enzymes : la carnitine palmitoyltransférase-I (CPT-1) située sur le feuillet externe de la membrane mitochondriale, la carnitine/acylcarnitine translocase et la carnitine palmytoyltransférase-2 (CPT-2) située sur le feuillet interne de la membrane mitochondriale [van der Vusse, van Bilsen *et al.*, 2000; Stanley, Recchia *et al.*, 2005]. Une fois rentré, l'acyl-CoA est soumis à la bêta-oxydation qui aboutit à la formation d'acétyl-CoA, lequel entre ensuite dans le cycle de Krebs. Seuls les acides gras à chaîne longue sont concernés par ce système de transport, les acyl-CoA à chaîne moyenne et courte entrant dans la mitochondrie par diffusion. Cette navette carnitine, et plus particulièrement la CPT-1, est l'étape limitante dans la dégradation mitochondriale des acides gras. Lors de la bêta-oxydation sont également produit en plus de l'acétyl-CoA, des équivalents réducteurs, le NADH et le FADH₂ [Stanley, Recchia *et al.*, 2005] (Figure 17).

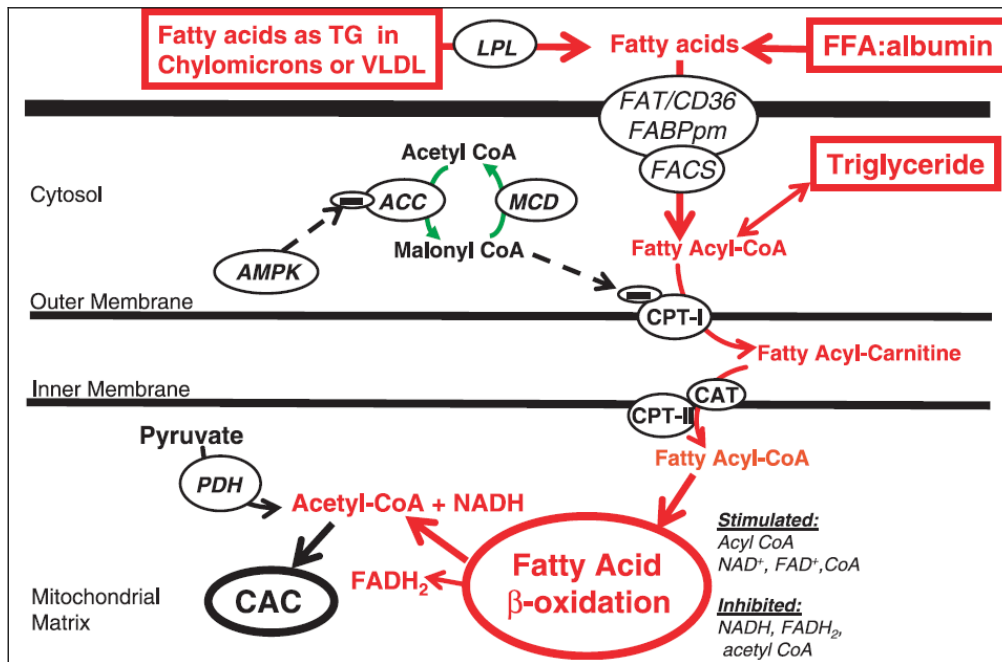


Figure 17 : Représentation schématique du métabolisme des acides gras myocardique.

ACC, acétyl-CoA carboxylase ; AMPk, protéine kinase activée par l'AMP ; CAT, carnitine acyltranslocase ; CPT-1, carnitine palmitoyltransférase-1 ; CPT-2, carnitine palmitoyltransférase-2, FABPpm, protéine de liaison des acides gras de la membrane plasmique ; FAT, translocase des acides gras ; FFA, acides gras ; LPL, lipoprotéine lipase ; MCD, malonyl-CoA décarboxylase ; TG, triglycéride ; VLDL, lipoprotéine de très basse densité.

Figure issue de Stanley *et al.* [Stanley, Recchia *et al.*, 2005].

2.2.3.2 Métabolisme énergétique d'un cœur ischémiq

L'ensemble des mécanismes métaboliques décrits précédemment suppose un apport en oxygène suffisant pour une adaptation instantanée de la balance énergétique entre production d'énergie à partir des substrats et besoins (Figure 18.A). Advenant une ischémie, le premier facteur limitant le métabolisme du cœur ne sera pas les substrats mais l'oxygène pour le bon fonctionnement de la phosphorylation oxydative. Dans de telles conditions, le cœur passera progressivement d'un métabolisme oxydatif et majoritairement lipidique à un métabolisme majoritairement glucidique s'accompagnant d'une augmentation de la glycolyse (Figure 18.B).

Dans les prochaines sections seront décrits les changements métaboliques qui prévalent lors d'une ischémie de type modéré à sévère. Il convient de préciser que seuls les changements suite à une insulte ischémique aiguë seront abordés dans cette thèse. Toutefois, il est connu que des conditions d'ischémie chronique qui prévalent entre autres chez les patients coronariens conduisent à des modifications dans l'expression des gènes métaboliques et à la mise en place de mécanismes d'adaptation.

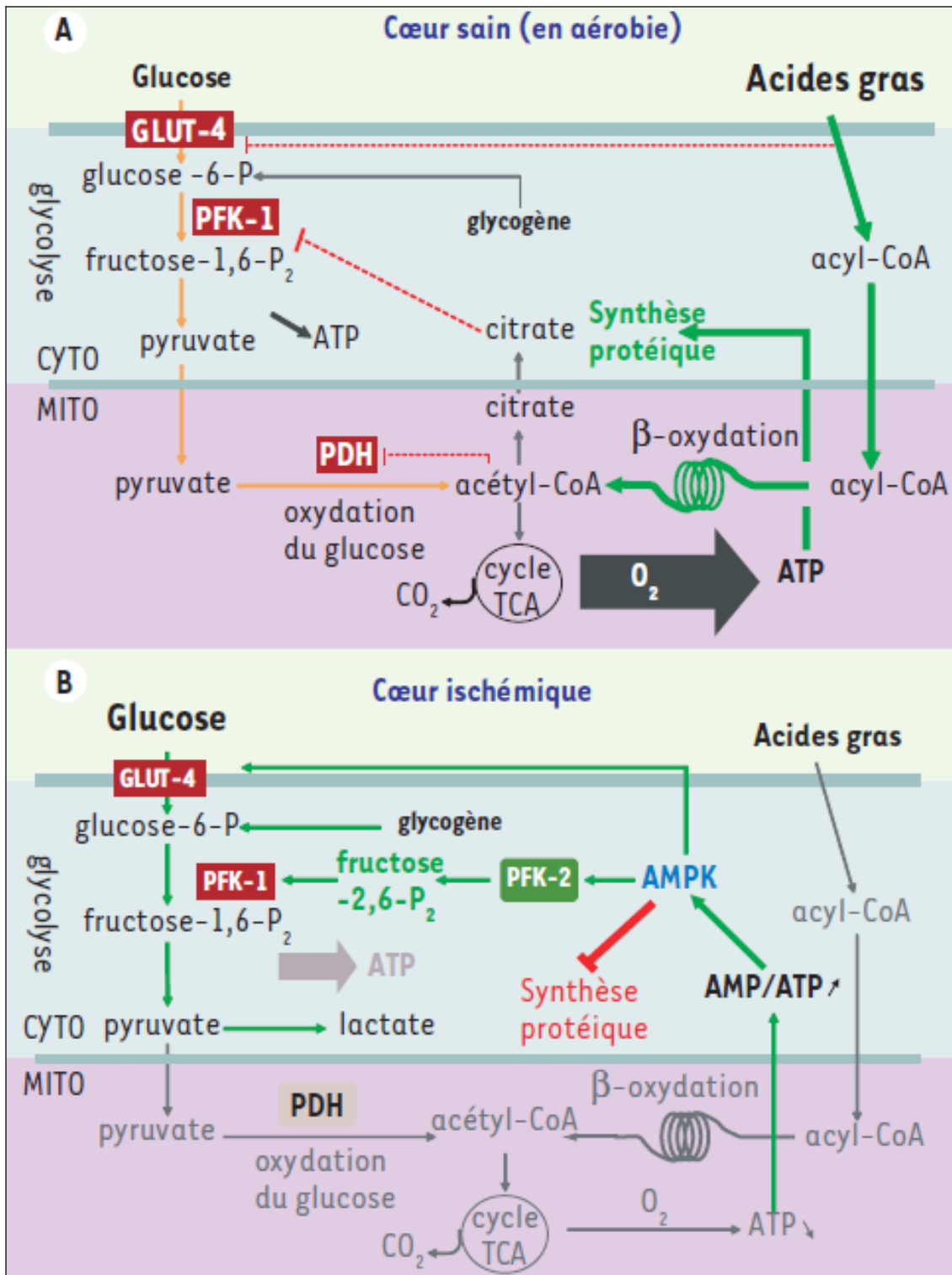


Figure 18 : Schéma représentatif du contrôle du métabolisme énergétique cardiaque en normoxie (A) et sous ischémie (B).

Figure issue de Foretz *et al.* [Foretz, Taleux *et al.*, 2006].

2.2.3.2.1 *Ischémie modérée*

Une ischémie modérée résulte en une diminution de la MVO_2 qui est couplée à une augmentation de l'état de phosphorylation (ADP/ATP) et de l'état redox (NADH/NAD⁺). L'augmentation du rapport ADP/ATP mène à une augmentation de la glycolyse alors que l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺ mène à une réduction de l'oxydation du pyruvate et une augmentation de la production de lactate [Salem, Stanley *et al.*, 2004].

Plus précisément, la glycolyse devient en partie anaérobie, ce qui fait chuter le nombre d'ATP produits (2 à la place de 38) en dessous de la demande cellulaire. Le cardiomyocyte est donc placé en déficit énergétique. En plus de cette diminution en ATP, une accumulation d'ADP et AMP est observée, activant l'AMPk laquelle active la PFK, et donc la glycolyse, mais aussi inhibe l'acétyl-CoA carboxylase. Le malonyl-CoA chute et l'inhibition de la CPT-1 est levée. Les acyl-CoA entrent librement dans la mitochondrie augmentant ainsi la bêta-oxydation. Ce phénomène est renforcé par l'action centrale des catécholamines qui stimulent la lipolyse des adipocytes, libérant des acides gras dans la circulation sanguine, ce qui augmente leurs disponibilités pour le cœur. Toutefois, une activité de bêta-oxydation résiduelle dans un contexte où l'apport en oxygène pour la phosphorylation oxydative est limitant, peut avoir des conséquences néfastes pour la cellule. En fait, ceci peut mener à l'accumulation de divers métabolites, soit des intermédiaires de la voie de bêta-oxydation et des équivalents réduits, lesquels pourraient bien contribuer non seulement à inhiber les réactions enzymatiques du cycle de Krebs mais aussi à favoriser la production d'anions superoxydes par la chaîne respiratoire, principalement au niveau du complexe I. Pour contrer ces potentiels effets néfastes d'une augmentation de l'activité de la bêta-oxydation en

conditions ischémiques, des interventions visant à inhiber cette voie (par exemple avec la trimétazidine) sont proposées.

2.2.3.2.2 Ischémie sévère

Dans des conditions d'ischémie sévère, la diminution de l'apport en oxygène conduit à l'arrêt total du métabolisme aérobie. La glycolyse anaérobie qui s'effectue sous l'action de phosphorylase, fournit alors plus de 80% de la production de phosphates à haute énergie [Jennings, Reimer *et al.*, 1983; Zhou, Huang *et al.*, 2008]. Le débit coronaire étant réduit, et par conséquent l'apport en glucose, le glycogène intracellulaire est alors utilisé. Bien que la glycolyse soit stimulée dans ces conditions, la production d'ATP devient peu rentable si elle aboutit à la formation de lactate et non de pyruvate. La stimulation de la glycolyse accompagnée d'une inhibition de l'oxydation du glucose, induit, *via* l'hydrolyse de l'ATP (glycolyse anaérobie), une production excessive de protons [Dennis, Gevers *et al.*, 1991]. C'est ce découplage entre glycolyse et oxydation du glucose, dans une condition où l'entrée de protons dans la mitochondrie est aussi inhibée, qui produit la majorité des protons lors de l'ischémie myocardique. Il s'ensuit une acidose intracellulaire, puis un effondrement des réserves en phosphates à haute énergie dont une chute des concentrations de PCr plus précoce que l'ATP et finalement une accumulation de phosphates inorganiques, d'ADP et AMP.

Ces facteurs biochimiques participent à l'altération de la contractilité du myocarde soumis à l'ischémie [Ferrari, Pepi *et al.*, 1998], conduisant à l'état de quiescence seulement quelques minutes après le début de l'ischémie. Ceci peut-être considéré comme un mécanisme protecteur pour le myocarde car il permet une réduction importante de l'oxydation mitochondriale et donc de la consommation d'oxygène [Ferrari, Pepi *et al.*, 1998].

La dysfonction ventriculaire peut être réversible si les facteurs responsables de l'ischémie, tels qu'une tachycardie, une augmentation du travail cardiaque ou une réduction de l'apport en oxygène, sont levés. Cependant, cette dysfonction ventriculaire peut persister plusieurs heures, voire plusieurs jours chez les patients après un épisode d'ischémie/reperfusion, aboutissant à un « stunning » ou sidération myocardique caractérisée par des altérations métaboliques spécifiques [Ferrari, Pepi *et al.*, 1998].

L'ischémie peut persister pour des durées plus longues entraînant alors la mort cellulaire. En clinique, cette situation décrit la phase aigue de l'infarctus du myocarde. D'un point de vue métabolique, une ischémie prolongée résulte en une diminution du pH intracellulaire et une augmentation progressive de la pression de repos et de la « rigidité myocardique ». L'augmentation précoce de lactate est suivie d'une diminution des concentrations d'ATP et de PCr tissulaire myocardique [Ferrari, Pepi *et al.*, 1998]. Ainsi, après une stimulation initiale, la glycolyse anaérobie est inhibée par une acidose plus sévère. A cette étape, des modifications ioniques importantes apparaissent dont une déplétion en K^+ et Mg^{2+} , et une surcharge du Na^+ et du Ca^{2+} intracellulaire : les concentrations tissulaires globales de Ca^{2+} restent inchangées alors que les concentrations mitochondriales sont augmentées, indiquant une redistribution intracellulaire de cet ion [Ferrari, Pedersini *et al.*, 1993].

L'ATPase des myofibrilles, qui consommait habituellement la majorité de l'ATP formé par le métabolisme aérobie, est inactivée et la contraction est très affectée dans la zone ischémique. Il est important de noter que dans le myocarde ischémique, 30-35% de l'ATP est

dépendant de l'ATPase des mitochondries [Jennings, Reimer *et al.*, 1983; Kobara, Tatsumi *et al.*, 1996].

Aussi, les dommages structuraux et fonctionnels des mitochondries sont des événements précoces de l'ischémie [Lesnefsky, Moghaddas *et al.*, 2001]. La mitochondrie participe également au paradoxe de la reperfusion [Ferdinandy, Schulz *et al.*, 2007] ; en effet, la restauration des fonctions mitochondriales dépend de la durée et de l'importance de l'ischémie. La reperfusion favorise la production de radicaux libres, la surcharge calcique mitochondriale, qui prédisposent à l'ouverture du pore de transition membranaire et à la libération de cytochrome c à l'origine d'un processus apoptotique.

2.2.3.3 Métabolisme énergétique et fibrillation ventriculaire

Comme décrit précédemment, les réserves myocardiques en ATP, principale source d'énergie, sont faibles, expliquant le couplage étroit entre sa synthèse et son hydrolyse. La fibrillation ventriculaire maintient des besoins énergétiques myocardiques comparables à un cœur travaillant [Ditchey, Goto *et al.*, 1992; Gazmuri, Berkowitz *et al.*, 1999; Gazmuri, Ayoub *et al.*, 2002]. Ainsi, lors de sa survenue et de l'arrêt de la circulation coronaire, un déséquilibre énergétique important apparaît conduisant à une ischémie myocardique globale [Kette, Weil *et al.*, 1993]. Malgré l'absence de contractions fonctionnelles au cours de la fibrillation ventriculaire, les myocytes restent métaboliquement actifs. Ceci s'explique en partie par les forts taux de catécholamines endogènes [Lindner, Ahnefeld *et al.*, 1990; Angelos, Ward *et al.*, 1994].

À la suite de privation en oxygène, la phosphorylation oxydative cesse et le métabolisme énergétique passe rapidement à un mode anaérobie. Cependant, la production d'ATP via la glycolyse anaérobie ne permet pas de compenser l'hydrolyse d'ATP afin de maintenir l'équilibre énergétique. Il en résulte donc une perte immédiate des réserves myocardiques en PCr et plus tardivement en ATP [Neumar, Brown *et al.*, 1991].

Si la reperfusion est rétablie rapidement, une récupération presque totale des réserves en PCr peut avoir lieu [Piper, Noll *et al.*, 1994; Angelos, Griffith *et al.*, 1995]. Toutefois, seulement une régénération partielle d'ATP se produit en raison notamment de la lenteur de synthèse de novo d'ATP, comme rapporté par Angelos *et al.* après 90 min de reperfusion [Angelos, Torres *et al.*, 2000].

3. Moyens pharmacologiques de lutte contre la tachycardie sinusale.

Comme indiqué précédemment, l'inotropisme et le chronotropisme cardiaques sont les facteurs importants de la MVO_2 et réduire leurs influences est un objectif fondamental du traitement de l'insuffisance coronaire. Cependant, les performances contractiles du cœur sont altérées précocement dans les pathologies ischémiques, il est donc dangereux de vouloir les diminuer davantage.

Ainsi, un des objectifs principaux dans le traitement de l'insuffisance coronarienne et notamment dans la prévention de la fibrillation ventriculaire primaire, est de rétablir un équilibre entre la consommation et la demande en oxygène.

Or, si peu de médicaments sont capables d'accroître le flux sanguin en cas d'occlusion coronarienne, la réduction des besoins peut être obtenue avec un grand nombre de médicaments tels que les bêta-bloquants ou inhibiteurs calciques. Des tentatives ont déjà été faites avec les antiarythmiques de classe I de Vaughn Williams pour prévenir la fibrillation ventriculaire. Cependant, ces antiarythmiques ne sont pas parvenus à réduire la mortalité qu'ils ont même aggravée dans de vastes essais randomisés, contrôlés vs. placebo. Ces essais ont été réalisés avec les antiarythmiques les plus récents et les plus actifs de l'époque, classés comme produits Ic, tels que l'encainide et le flécaïnide [1989; Echt, Liebson *et al.*, 1991]. Certes, l'échec pouvait être rapporté à la dépression de la conduction intraventriculaire particulièrement accentuée avec ces produits, mais les antiarythmiques de type Ib comme la lidocaïne ont abouti au même résultat en dépit de leur influence bien moindre sur la conduction [Hine, Laird *et al.*, 1989; Antman and Berlin, 1992].

Des travaux réalisés dans le laboratoire de Pharmacologie Médicale de Lyon sur un modèle porcin de striction coronaire brève équivalent à un spasme coronaire menant à la fibrillation ventriculaire sont venus confirmer pleinement les données cliniques en ce qui concerne les produits Ic [Faucon, Aupetit *et al.*, 1991; Timour, Aupetit *et al.*, 1991; Aupetit, Timour *et al.*, 1993; Bui-Xuan, Aupetit *et al.*, 1997] et Ib [Aupetit, Timour *et al.*, 1993; Timour, Aupetit *et al.*, 1994; Aupetit, Timour *et al.*, 1995] et n'ont pas révélé de comportement différent des produits Ia tel que le disopyramide par exemple [Timour, Aupetit *et al.*, 1994].

L'importance du rôle joué par la tachycardie dans l'apparition des lésions athérosclérotiques indique qu'une diminution de la fréquence cardiaque pourrait retarder l'apparition de ces lésions. L'équipe de Bassiouny [Bassiouny, Zarins *et al.*, 1994] a démontré que chez le singe soumis à un régime enrichi en cholestérol, l'épaisseur des plaques d'athérosclérose développées au niveau aorto-iliaque était corrélée au produit de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle moyenne. Dans ce modèle, la réduction de la fréquence cardiaque a permis de retarder le développement des lésions athérosclérotiques coronariennes.

Par ailleurs, la relation qui existe entre la fréquence cardiaque et le temps de diastole lors d'un battement cardiaque n'est pas linéaire, une diminution même faible de la fréquence cardiaque induit une augmentation importante de la perfusion diastolique coronaire [Borer, Fox *et al.*, 2003; Sulfi and Timmis, 2006]. A noter qu'une réduction de la fréquence cardiaque semble également faciliter le développement du réseau coronaire chez l'animal ainsi que la circulation coronaire chez l'homme [Zheng, Brown *et al.*, 1999].

Ainsi, une réduction de la fréquence cardiaque s'avère être un des objectifs les plus importants dans le traitement des pathologies cardiovasculaires dont l'angine de poitrine. Dans ce travail nous comparons l'efficacité d'un des traitements les plus utilisés dans l'insuffisance coronarienne, les bêta-bloquants, à un inhibiteur du courant pacemaker I_f , l'ivabradine.

3.1 Les bêta-bloquants

Les bêta-bloquants sont connus de longue date comme étant de bons antiarythmiques cardiaques. Ils sont particulièrement utilisés dans la prévention de la mort subite due à des tachyarythmies ventriculaires associées à une ischémie myocardique aiguë, syndrome du QT long congénital, et l'insuffisance cardiaque congestive. De nombreuses études rapportent que les bêta-bloquants, en tant qu'antiarythmiques, réduisent l'incidence de mort subite d'origine cardiaque, prolonge la survie chez les patients présentant une pathologie cardiaque [Singh, 2005]. Par ailleurs, comme rapporté dans plusieurs études, un tiers des individus hypertendus présentent des signes cliniques d'activité sympathique accrue [Palatini, Longo *et al.*, 2006]. Ainsi, les molécules capables de réduire la pression artérielle et la fréquence cardiaque par réduction de l'activité sympathique ou blocage des effets périphériques, sont particulièrement bénéfiques dans le traitement de cette pathologie. De plus, comme mentionné précédemment, une diminution de la fréquence cardiaque permet de réduire l'impact délétère au niveau hémodynamique de la tachycardie. Les bêta-bloquants, par réduction de la fréquence cardiaque, diminuent la MVO_2 et permettent une redistribution du débit coronaire au profit des couches sous-endocardiques en allongeant la durée de diastole [Palatini, 2009].

Cependant, en contradiction avec les résultats obtenus chez les patients en post-infarctus, l'efficacité des bêta-bloquants chez les sujets hypertendus s'est avérée plus faible que prévue sur une base épidémiologique [Lindholm, Carlberg *et al.*, 2005; Khan and McAlister, 2006].

Malgré la réduction de la fréquence cardiaque et la prévention de l'angine de poitrine chez les coronariens, les bêta-bloquants sont associés à plusieurs effets indésirables tels qu'une hypotension, une dépression, une dysfonction érectile ainsi qu'une aggravation des pathologies intrinsèques du nœud auriculo-ventriculaire, des pathologies obstructives pulmonaires ou de l'hyperlipidémie [Sulfi and Timmis, 2006]. De plus, un traitement aux bêta-bloquants peut également être responsable d'une prise de poids [Palatini, 2009] et d'un développement de diabète.

Dans une méta-analyse récente qui rassemblait 12 études, regroupant 94 492 patients, Bangalore *et al.* ont démontré que le traitement aux bêta-bloquants aboutissait à une augmentation de 22% du risque d'apparition de diabète en comparaison à un traitement avec des agents antihypertenseurs non diurétiques [Bangalore, Parkar *et al.*, 2007]. En outre, des effets « rebonds », parfois fatal, ont été rapportés lors de l'arrêt d'un traitement à court terme.

3.2 L'ivabradine

L'ivabradine (IVA) ou 3-(3-(((7S)-3,4-dimethoxybicyclo[4,2,0]octa-1,3,5-trien-7-yl)methyl) methylamino}propyl)-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dimethoxy-2H-3-benzazepin-2-one, hydrochloride) (Figure 19), découvert et mis au point par l'Institut de Recherches Servier, représente l'une des plus importantes percées en soins cardiovasculaires des deux dernières décennies. L'ivabradine est le premier agent de réduction de la fréquence cardiaque pure. Il agit par inhibition sélective et spécifique du courant pacemaker *I_f* [Thollon, Cambarrat *et al.*, 1994; DiFrancesco and Camm, 2004] qui contrôle la dépolarisation diastolique spontanée au niveau du nœud sinusal et régule la fréquence cardiaque. Cette inhibition est responsable d'une diminution de la pente de dépolarisation diastolique lente [Thollon, Cambarrat *et al.*, 1994] et donc d'une réduction de la fréquence cardiaque sinusale. Ces effets sont spécifiques du nœud sinusal, sans effet sur la conduction intra-cardiaque [Camm and Lau, 2003], la contractilité myocardique [Vilaine, Bidouard *et al.*, 2003] ou la repolarisation ventriculaire. Contrairement aux bêta-bloquants, qui constituent le traitement le plus courant contre l'angor stable, l'IVA n'est associé à aucun problème d'ordre sexuel, à aucun effet respiratoire indésirable provoqué par une constriction ou un spasme des voies respiratoires.

Les propriétés de l'IVA décrites lors des études pré-cliniques ont été confirmées chez l'homme en particulier pour (i) sa sélectivité électrophysiologique par inhibition du courant *I_f* et donc réduction de la fréquence cardiaque sinusale sans modification de la conduction auriculo-ventriculaire et de la repolarisation membranaire, (ii) sa sélectivité hémodynamique qui permet le maintien de la fraction d'éjection chez des patients présentant un dysfonctionnement ventriculaire gauche, et maintien de la contractilité myocardique (contrairement au bêta-bloquants), (iii) son action anti-ischémique d'un niveau comparable à celui d'un bêta-bloquant.

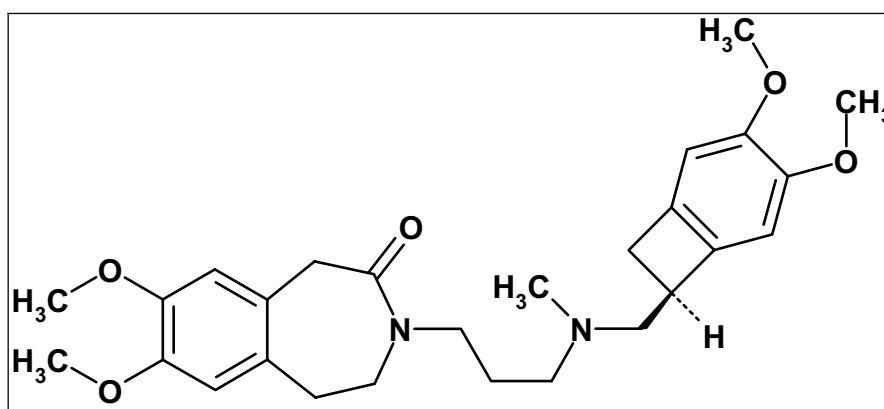


Figure 19 : Schéma représentatif de la molécule d'ivabradine.

J. Med. Chem., 1990, 33 (5), 1496-1504.

3.2.1 Efficacité clinique

L'ivabradine a montré son effet anti-angineux et anti-ischémique aux doses de 5 et 10 mg deux fois par jour dans plusieurs études cliniques randomisées vs. d'autres stratégies pharmacologiques de traitement [Diaz and Tardif, 2006; Fox, 2006; Tardif, 2007].

Tardif *et al.*, lors de l'étude « International Trial on the Treatment of Angina With Ivabradine » (INITIATIVE) ont comparé les effets anti-angineux et anti-ischémiques de l'ivabradine avec ceux d'un bêta-bloquant, l'aténolol [Tardif, Ford *et al.*, 2005]. Dans cet essai en double-aveugle, 939 patients présentant une angine de poitrine stable ont reçu de l'IVA (à la dose de 5 mg deux fois par jour pendant 4 semaines puis 7,5 ou 10 mg deux fois par jour pendant 12 semaines) ou de l'aténolol (à la dose de 50 mg pendant 4 semaines et ensuite 100 mg pendant 12 semaines). Tous les patients ont subi un test d'effort sur tapis roulant lors de la randomisation et à 4 et 16 semaines de traitement. Les résultats de cette étude démontrent la non-infériorité de l'IVA par rapport à l'aténolol chez les patients présentant une angine de poitrine stable.

Par la suite, Ruzylo *et al.*, ont comparé les effets anti-angineux et anti-ischémiques de l'IVA avec l'amlodipine (un antagoniste calcique) [Ruzylo, Tendera *et al.*, 2007]. Dans cette étude clinique en double-aveugle, 1195 patients avec des antécédents d'angine à l'effort ont reçu de l'IVA (à la dose de 7,5 mg ou 10 mg deux fois par jour) ou de l'amlodipine (à la dose de 10 mg une fois par jour). Les patients ont été soumis à des tests de tolérance à l'exercice en vélo avant le début du traitement et ensuite une fois par mois, pendant 3 mois. Les résultats rapportent que chez ces patients angineux, l'IVA a un effet comparable à l'amlodipine en ce qui concerne l'amélioration de la tolérance à l'exercice et un effet supérieur sur la réduction du produit pression-fréquence (utilisé comme marqueur de la consommation myocardique en oxygène).

De plus, l'équipe de Lopez-Bescos a étudié l'effet de l'IVA à plus long terme chez les patients avec angine de poitrine. Dans cette étude, 386 patients présentant une angine de poitrine chronique ont reçu de l'IVA (à la dose de 5 ou 7,5 mg deux fois par jour) pendant 12 mois. Le nombre de crise d'angor par semaines a été évalué ainsi que la consommation de dérivés nitrés à action rapide sur toute la durée de traitement [Lopez-Bescos, Filipova *et al.*, 2007]. Les résultats de cette étude ont rapporté que l'IVA était bien tolérée et présentait une efficacité anti-angineuse chez les coronariens recevant un traitement anti-angineux concomitant.

Enfin, l'équipe de Joannides *et al.*, a comparé les effets de l'IVA à ceux d'un bêta-bloquant sur la fonction cardiaque et hémodynamique au repos, lors d'un test tilt et lors d'un exercice sur 9 volontaires sains ayant reçu de l'ivabradine (30 mg), du propranolol (40 mg) ou un placebo. Ces auteurs rapportent que pour une diminution semblable de la fréquence cardiaque au repos et à l'exercice, l'administration aiguë d'IVA réduit la consommation en

oxygène myocardique de façon similaire au bêta-bloquant mais sans induire d'altération de la fonction cardiaque [Joannides, Moore *et al.*, 2006].

3.2.2 Tolérance et effets indésirables

Actuellement, les données cliniques sur l'IVA sont nombreuses. L'ensemble de ces études rapportent que l'ivabradine est en général bien tolérée. L'effet indésirable fréquemment rapporté (14% des patients) consiste en des troubles visuels dont les phosphènes, sensations lumineuses perçues par l'œil et non provoquées par la lumière, et qui résulteraient de l'inhibition du courant I_h des cellules rétinienne, courant identique au courant I_f . Dans la plupart des cas, ils disparaissent spontanément au cours du traitement, et sont toujours réversibles à l'arrêt du traitement. En plus de ces troubles visuels, il a été rapporté quelques cas de bradycardie, environ 3% des patients ayant reçu l'IVA.

3.2.3 Indications

L'Agence Européenne des Médicaments a approuvé l'emploi de l'IVA pour le traitement de l'angor stable chronique chez les patients ayant un rythme sinusal normal et présentant une contre-indication ou une intolérance aux bêta-bloquants. Cependant, l'IVA est contre-indiqué chez les patients présentant une bradycardie (fréquence cardiaque inférieure à 60 bpm), un bloc cardiaque ou arythmies.

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer l'impact d'une réduction de la fréquence cardiaque par administration d'IVA sur la propension à la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique et de comprendre quel(s) mécanisme(s) seraient impliqués.

Ainsi, dans une première partie de ce travail nous avons évalué l'impact d'une réduction de la fréquence cardiaque sur le risque de déclenchement de la fibrillation ventriculaire sur un modèle porcin de striction coronaire brève mais totale menant à la fibrillation ventriculaire. Ces travaux ont été réalisés au laboratoire de Pharmacologie Médicale (INSERM ERI22, Lyon, France) du Dr. Q. TIMOUR. La propension à la fibrillation ventriculaire a été évaluée par mesure du seuil électrique de fibrillation ventriculaire (SEFV) et du temps de son déclenchement (TDFV). L'effet de cette réduction a également été évalué sur :

- sur les modifications morphologiques (macroscopique et microscopique) avec la détermination de la taille de l'aire ischémiée par histoenzymologie, de l'ultrastructure cellulaire en microscopie électronique (mitochondries, noyaux...), de l'apoptose ;
- sur les modifications fonctionnelles avec l'évaluation du flux sanguin myocardique régional par tomographie par émission de positons ;
- sur le statut énergétique cardiaque par détermination des concentrations myocardiques des composés phosphorés riche en énergie en spectroscopie RMN ;
- sur l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique cardiaque.

Afin de mieux comprendre l'impact de la réduction de la fréquence cardiaque induite par l'IVA, le métabolisme énergétique myocardique a été étudié de façon plus spécifique. Dans une seconde partie, les effets de l'VA sur la fonction cardiaque et les flux énergétiques ont été étudiés sur un modèle murin de cœurs sains isolés perfusés en mode travaillant semi-recirculant, en conditions normoxiques. À l'aide de l'utilisation d'isotopes stables et d'analyse en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse, il est possible d'étudier spécifiquement la sélection des substrats pour la production d'énergie, expertise spécifique du laboratoire du Dr. Ch. DES ROSIERS (Laboratoire du métabolisme intermédiaire, Montréal, Canada). L'impact de l'IVA a été comparé à celui d'un bêta-bloquant couramment utilisé en clinique, le métoprolol.

**PREMIERE PARTIE : Rôle de la fréquence
cardiaque sur la propension à la fibrillation
ventriculaire d'origine ischémique**

Les travaux effectués au laboratoire de pharmacologie médicale à Lyon, ont eu pour objectif principal de caractériser l'impact de l'ivabradine, et plus précisément la réduction de la fréquence cardiaque qu'elle induit, sur la propension à la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique. Ces travaux réalisés à Lyon ont fait l'objet de trois études différentes :

Dans une première étude (ÉTUDE 1), nous avons recherché l'effet doses de l'IVA et déterminé la dose minimale efficace capable de retarder l'apparition de la fibrillation ventriculaire. Cette étude a fait l'objet d'un premier article publié : « *Ivabradine induces an increase in ventricular fibrillation threshold during acute myocardial ischemia: an experimental study* » (*Journal of cardiovascular Pharmacology*, 2008).

Dans la seconde étude (ÉTUDE 2), nous avons recherché les mécanismes qui pourraient être impliqués dans l'action de l'IVA sur le seuil électrique de fibrillation ventriculaire. Ainsi, l'impact de l'IVA a été évalué (i) sur l'ultrastructure des cardiomyocytes (par microscopie électronique, ***étude 2a***) et (ii) la perfusion myocardique (étude en tomographie par émission de positons, ***étude 2b***). Ces travaux ont fait l'objet d'un second article soumis, pour publication : « *Heart rate reduction with ivabradine increases ischemia-induced ventricular fibrillation threshold: role of myocyte structure and myocardial perfusion* » (*British Journal of Pharmacology*, 2010).

Dans la dernière étude (ÉTUDE 3), nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'impact de l'ivabradine sur le métabolisme énergétique. Pour cela, la propension à la fibrillation ventriculaire a été objectivée par la mesure du temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique. Le statut énergétique cardiaque a été évalué par le dosage myocardiques des composés phosphorés à haute énergie.

1. Méthodologie commune à l'ensemble des trois études

1.1 Préparation des animaux

1.1.1 Procédures d'anesthésie

Les animaux ont été prémédiqués 30 min avant le début de l'expérience par de la kétamine (Imalgène[®], 20 mg/kg en *i.v.* Labo Merial, Lyon, France) afin de limiter le stress et de diminuer les doses d'anesthésique général. L'état d'anesthésie générale a ensuite été induit par du propofol (Diprivan[®], 3 mg/kg en *i.v.* Astra Zeneca, Paris France) au niveau d'une veine marginale de l'oreille) et entretenue par du chloralose (Sigma Aldriche, Allemagne) à la dose de 100 mg/kg en *i.v.* via la veine jugulaire. Le chloralose a été choisi pour ses faibles effets cardiovasculaires et sa durée d'action suffisante au bon déroulement de nos expérimentations.

Les animaux ont ensuite été trachéotomisés et une sonde de trachéotomie de type trachéoflex n°8 a été placée dans la trachée permettant de ventiler les poumons des animaux. La ventilation et le monitoring respiratoire ont été réalisés conjointement grâce à un respirateur Dräger SA2 comportant un analyseur de gaz et un capnographe. Cet analyseur était connecté au circuit respiratoire au niveau de l'extrémité de la sonde d'intubation permettant ainsi de noter la fraction inspirée en oxygène (Fio₂) et la pression partielle de CO₂ dans les gaz expiré en fin d'expiration (Pet CO₂). Le volume courant initial était fixé à 15 ml/kg et la fréquence imposée par le respirateur était maintenue fixe à un rythme de 15 cycles/min.

1.1.2 Réalisation de l'ischémie

Après une thoracotomie médiane, une péricardectomie et une isolation de l'artère interventriculaire antérieure, l'ischémie a été obtenue par occlusion totale (donc parfaitement reproductible) de cette artère, dans sa partie proximale au moyen d'un fil préalablement passée en anse autour d'elle. L'ischémie était appréciée de visu par l'aspect violacé du territoire non perfusé (en aval de l'occlusion) et plus objectivement par le niveau de décalage de segment ST et de l'amplitude de l'onde T dans la dérivation correspondante (DII) (Figure 20).

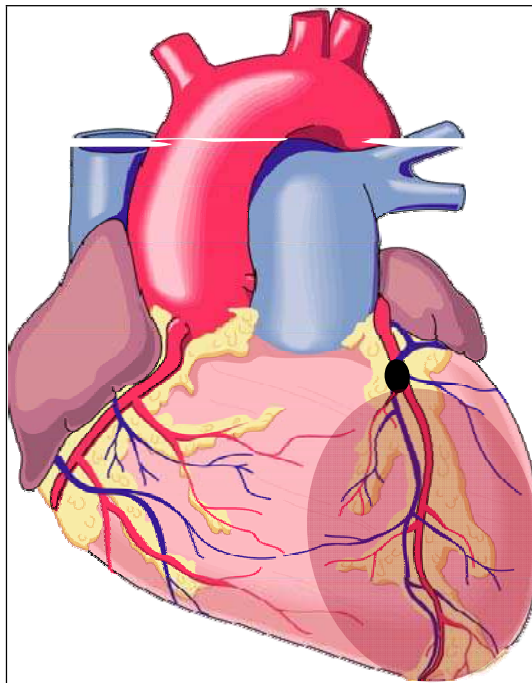


Figure 20 : Schéma représentatif de la région ventriculaire gauche soumise à l'ischémie.

1.2 Détermination des paramètres électrophysiologiques

1.2.1 La fréquence cardiaque sinusale

Un électrocardiogramme de surface (ECG) a été enregistré sur un électrocardiographe (Cardiolab Amplifier : Prucka Engineering Inc. Sugarland, Texas, USA) via une dérivation standard DI ou DII à partir d'électrodes placées sur partie proximale des membres inférieurs et supérieurs de l'animal. L'ECG a été suivi tout au long de l'expérimentation sur un oscilloscope E-2089 (Siemens, Erlangen, Allemagne) permettant le suivi en continue de la fréquence cardiaque qui a été enregistrée aux moments clés du protocole (avant, pendant et après occlusion coronaire).

1.2.2 La durée du potentiel d'action monophasique

L'activité électrique des fibres ventriculaires a été mesurée localement via une double électrode « Catronic ORX 6F » (Plastimed, France) insérée en sous-épicardique dans la zone ventriculaire gauche soumise à l'ischémie. La durée du potentiel d'action monophasique corrigée par la fréquence cardiaque (dMAPc) d'après la formule de Bazett ($dMAP/RR^{1/2}$ avec RR l'intervalle R-R de l'ECG de surface), a été suivie tout au long du protocole sur un oscilloscope E-2089 (Siemens, Erlangen, Allemagne) et enregistrée aux moments clés du protocole. Elle a été mesurée à 90% de la repolarisation ventriculaire.

1.2.3 Évaluation de la fibrillation ventriculaire

1.2.3.1 Seuil électrique de fibrillation ventriculaire

Dans les études 1 et 2 la fibrillation ventriculaire a été objectivée par la mesure du seuil électrique de fibrillation ventriculaire : SEFV (évalué en mA). Pour cela, l'occlusion coronaire a été maintenue durant 1 min et l'ischémie a été appréciée de visu par l'aspect violacé du territoire non perfusé (en aval de l'occlusion) et plus objectivement par le niveau de décalage de segment ST et de l'amplitude de l'onde T dans la dérivation correspondante (DII). La détermination du SEFV a été réalisée à une minute d'ischémie, par l'application d'une stimulation électrique ventriculaire via une sonde bipolaire introduite en sous-épicardique dans la zone soumise à l'ischémie (stimulateur S1 Hugo Sachs ; Fribourg en Brisgau, Allemagne). La fréquence de stimulation était variable selon le protocole et le produit utilisé, avec des stimuli d'une largeur (durée) de 100 ms. L'accroissement progressif de l'intensité d'entraînement par paliers de 0,5 mA toutes les 8 secondes a permis de déclencher la fibrillation ventriculaire et ainsi de déterminer le SEFV.

Après chaque fibrillation (à l'exception de la dernière), l'animal a bénéficié d'une défibrillation par choc électrique externe à 360 Joules (Shiller, Bruker Medical SA, Defigard 3002, Wissembourg, France). À la fin de l'expérimentation, l'euthanasie a été obtenue en ne pratiquant pas de défibrillation après la dernière fibrillation ventriculaire.

1.2.3.2 Temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire

Dans l'étude 3 réalisée à Lyon, la fibrillation ventriculaire a été évaluée par la mesure de son temps de déclenchement : TDFV (mesuré en secondes). Pour cela, l'occlusion coronaire a été réalisée jusqu'à obtention de la fibrillation ventriculaire, sans application d'une stimulation électrique ventriculaire (comme pour la détermination du SEFV). Le temps nécessaire au déclenchement de la fibrillation ventriculaire a ainsi été mesuré.

1.3 Détermination des paramètres hémodynamiques

1.3.1 Pressions artérielles

Les pressions artérielles (évaluées en mmHg) ont été enregistrés via un cathéter inséré dans l'artère carotide gauche et connectée à enregistreur Hewlett Packard (M1166 A, model 66 S, Hewlett Packard Inc, USA). Les pressions artérielles systolique (PAs), diastolique (PAd) et moyenne (PAm) ont été enregistrées en continue et analysées par le logiciel Acqknowledge[®].

1.3.2 Contractilité myocardique

La contractilité myocardique a été évaluée par la mesure de la dérivée première de la pression ventriculaire gauche en fonction du temps : dP/dt_{\max} VG (évalué en mmHg/sec). Pour cela, un cathéter de type « queue de cochon » a été introduit via l'artère carotidienne droite (préalablement disséquée) jusqu'à l'apex du ventricule gauche afin d'enregistrer en continue la pression intraventriculaire gauche. Le traitement informatisé par le logiciel Acqknowledge[®] (Biopac System Inc., Santa Barbara, CA, USA) a permis le calcul en continue de la dérivée première de la pression ventriculaire gauche en fonction du temps et la détermination de son pic maximal représentatif de la contractilité myocardique.

1.4 Détermination macroscopique de l'ischémie

1.4.1 Principe

Mise au point par Nachlas 1963 [Nachlas, Davidson *et al.*, 1963], la technique est basée sur la mise en évidence au plan macroscopique de l'activité succino-deshydrogénase (SDH) au sein des cardiomyocytes. L'activité SDH, très sensible aux variations du débit coronaire (donc de l'apport en O₂), diminue, voire disparaît quelques minutes après un accident ou insulte ischémique spontané ou après l'induction d'une anoxie expérimentalement.

1.4.2 Méthode

À la fin de l'expérimentation, le cœur a été entièrement prélevé, la masse ainsi que le volume ont été déterminés successivement. Après excision des parois auriculaires et du ventricule droit, ces paramètres ont de nouveau été déterminés pour le ventricule gauche. Des sections de ventricule gauche d'environ 2 mm d'épaisseur ont été coupées de la base à l'apex. Il a été retenu 1 coupe sur 3 de façon aléatoire pour l'analyse. Par la suite, les coupes retenues ont été incubées 15 min à 37°C dans une solution contenant du nitro-bleu de tétrazolium (NBT, 1 mg/ml) et du tampon phosphate à pH 7,2. La réaction a été arrêtée au bout de 15 min par une solution de formol à 10%. Cette réaction colore en bleu les zones myocardiques non soumises à l'ischémie (activité SDH préservée) alors que le myocarde ischémique n'est pas coloré. Après fixation au formol (10%, 24 heures), les coupes ont été photographiées et les surfaces totales, épargnées et ischémiques ont été mesurées par planimétrie (Image analyser, Scion Image, Scion Corporation, Frederick, U.S.A). Les surfaces ainsi mesurées ont été rapportées au volume puis à la masse du ventricule gauche afin de quantifier la proportion de ventricule gauche hypoxique.

2. ÉTUDE 1 : Caractérisation des effets de l'ivabradine et de l'ischémie sur la propension à la fibrillation ventriculaire

2.1 Protocoles d'études

2.1.1 Effet dose de l'ivabradine : étude 1, protocole 1

L'objectif de ce protocole 1 (Figure 21) a été de déterminer la dose minimale d'IVA permettant d'obtenir une baisse de la fréquence cardiaque comparable à celle obtenue en clinique (de l'ordre de 20%) corrélée à une meilleure prévention de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique.

Trois doses d'IVA ont été testées : 0,25 – 0,5 et 0,625 mg/kg (N=6 pour chaque groupe) et un groupe contrôle a reçu une solution saline de volume identique à celui de l'IVA (N=6). L'impact sur la fibrillation ventriculaire a été étudié par la détermination du SEFV. Ce dernier a toujours été déterminé à 1 min d'ischémie : i) avant administration du traitement (solution saline ou IVA) à une période de stimulation électrique ventriculaire de 300 ms (c'est-à-dire une fréquence de stimulation élevée correspondant à 200 bpm) obtenue par entraînement électrique ventriculaire; ii) après administration du traitement (solution saline ou IVA) à une période de stimulation basale (10% au dessus de la fréquence spontanée de l'animal afin d'être dans les conditions physiologiques).

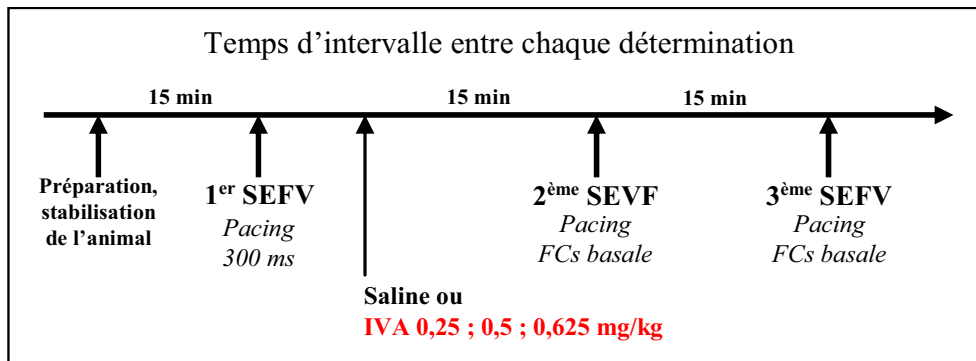


Figure 21 : Schéma du protocole 1 : étude de l'effet-dose de l'IVA sur la propension à la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique.

2.1.2 Corrélation fréquence cardiaque et seuil électrique de fibrillation ventriculaire : étude 1, protocole 2

L'objectif du protocole 2 (Figure 22) a été d'étudier l'effet de la réduction de la fréquence cardiaque induite par l'IVA sur le SEFV. La détermination du SEFV a toujours été réalisée durant l'ischémie i) dans un groupe contrôle ayant reçu une solution saline (volume équivalent à celui administré avec l'IVA ; N=9), à une période de stimulation de 300 ms (200 bpm), et ii) dans un groupe ayant reçu de l'IVA (à la dose déterminée précédemment ; N=9) à une période de stimulation fixe de 450 ms.

Contrairement au protocole 1, les périodes de stimulation imposées ont été fixées à 300 ms (saline) et à 450 ms (IVA) afin de réduire les différences de fréquence cardiaque existant entre animaux.

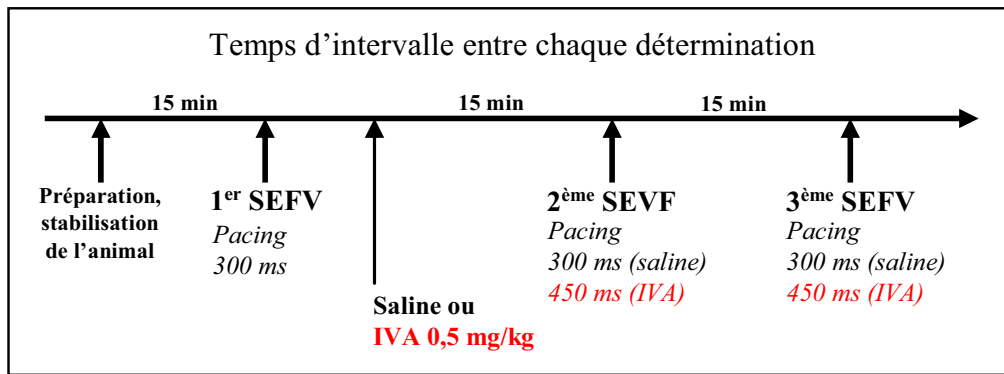


Figure 22 : Schéma du protocole 2 visant à étudier l'effet de l'administration d'IVA à la dose de 0,5 mg/kg sur le SEFV en condition ischémique.

2.1.3 Rôle de l'ischémie sur le seuil électrique de fibrillation ventriculaire : étude 1, protocole 3

Deux protocoles différents ont été réalisés, le protocole 3a et 3b afin d'étudier l'impact de l'ischémie elle-même lors de la détermination du SEFV pour de mieux comprendre les effets de l'IVA observés lors des protocoles précédents.

2.1.3.1 Protocole 3a

Dans ce protocole 3a (Figure 23), le SEFV a été déterminé avant administration d'IVA à une période de stimulation de 300 ms, puis après administration d'IVA (à la dose de 0,5 mg/kg ; N=8) à une période de stimulation de 450 ms puis de nouveau à 300 ms afin d'étudier l'effet fréquence. Pour chacune de ces conditions, le SEFV a été évalué sans ischémie puis sous ischémie (à 1 min d'occlusion comme décrit dans le paragraphe 1.2.3.1).

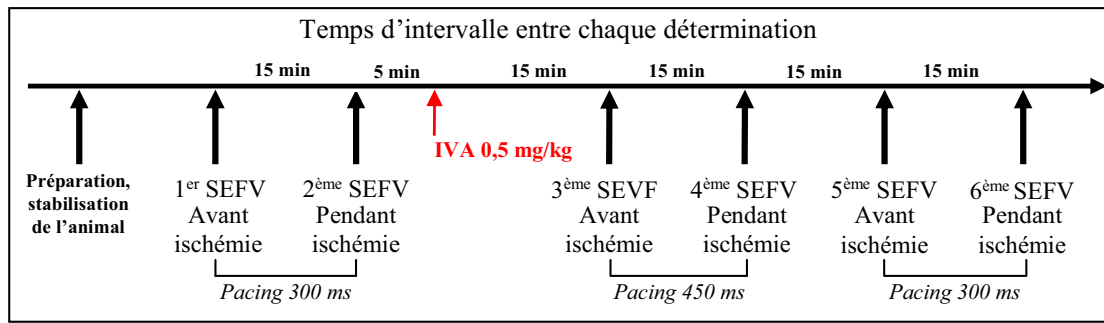


Figure 23 : Schéma du protocole 3a visant à étudier l'effet de l'IVA à la dose de 0,5 mg/kg et l'effet de l'ischémie sur le SEFV.

2.1.3.2 Protocole 3b

Dans ce protocole 3b (Figure 24), l'effet de l'IVA sur la propension à la fibrillation ventriculaire a été étudié dans des conditions non ischémiques, à différentes périodes de stimulation (400 ms et 300 ms) avant et après son administration (à la dose de 0,5 mg/kg ; N=4). Afin de pouvoir réaliser une stimulation ventriculaire à deux périodes différentes en condition basale (avant administration d'IVA) et tenant compte de l'impossibilité d'effectuer une stimulation ventriculaire en dessous de la fréquence cardiaque de l'animal, nous avons choisi de diminuer la période de stimulation de 450 ms à 400 ms. La stimulation à 300 ms de période étant une situation tachycarde, aucun ajustement était nécessaire.

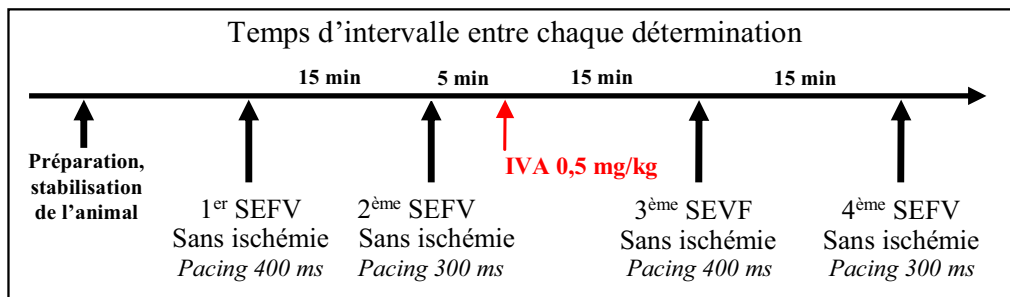


Figure 24 : Schéma du protocole 3b visant à étudier l'effet de l'IVA à la dose de 0,5 mg/kg sur le SEFV en condition non ischémique à 2 périodes de stimulation (400 ms vs. 300 ms).

2.2 Analyse statistique

L'ensemble des résultats de l'étude électrophysiologique, hémodynamique et anatomopathologique a été analysé à l'aide du GraphPad Prism 4[®]. Chaque paramètre enregistré dans chaque protocole (FCs, dMAPc, SEFV, PAs, PAd, PAm, dP/dtmax VG), ont été étudiés de la façon suivante :

Dans le protocole 1 (effet dose de l'IVA) et le protocole 2 (corrélation FCs et SEFV), une ANOVA à deux voies pour des mesures répétées a été réalisée afin d'étudier l'effet groupe ainsi que l'effet temps lors de l'administration des traitements (saline ou IVA). Un post-test de Bonferroni a été effectué lorsque l'analyse de variance était significative.

Dans les protocoles 3a et 3b une ANOVA à une voie pour des mesures répétées a été réalisée, suivie d'un post-test de Tuckey lorsque l'analyse de variance était significative afin d'étudier l'effet (i) de l'administration d'IVA (protocoles 3a et 3b), (ii) de l'ischémie et (protocole 3a) (iii) de la période de stimulation (protocole 3a).

La comparaison de la taille de la zone ventriculaire gauche soumise à l'ischémie a été faite par une ANOVA à une voie pour le protocole 1 et par un test t non pairé pour le protocole 2.

2.3 Résultats

Les fréquences cardiaques, la dMAPc ainsi que l'ensemble des paramètres hémodynamiques représentés ci-après, ont été enregistrées à 1 minute d'ischémie, avant l'application de la stimulation électrique ventriculaire à période variable.

2.3.1 Étude de l'effet dose de l'ivabradine : étude 1, protocole 1

2.3.1.1 Résultats électrophysiologiques

Ce protocole avait pour objectif de vérifier l'effet de l'IVA rapporté dans la littérature et nous permettre de choisir la dose d'IVA ayant le meilleur impact sur la prévention de la fibrillation ventriculaire dans notre modèle.

La détermination du SEFV a été effectuée avec une période de stimulation électrique ventriculaire correspondant à la fréquence spontanée de l'animal afin d'observer un effet le plus physiologique possible de l'IVA. La fréquence cardiaque représentée ici a été mesurée à une minute d'ischémie, avant la réalisation de la stimulation électrique ventriculaire pour la détermination du SEFV.

À la dose de 0,625 mg/kg, la baisse de fréquence cardiaque est apparue trop rapidement et de façon importante, entraînant des troubles du rythme (extrasystoles, rythme idioventriculaire...). Nous avons donc décidé de l'enlever de l'analyse statistique du fait de l'instabilité de la fréquence cardiaque.

Ces résultats montrent un effet dose de l'IVA sur SEFV et la fréquence cardiaque : plus la concentration d'IVA administrée est grande et plus la fréquence cardiaque diminue et

le SEFV augmente (Figure 25 et Figure 26). Ces effets ne sont pas accompagnés de modification de la dMAPc par la fréquence cardiaque.

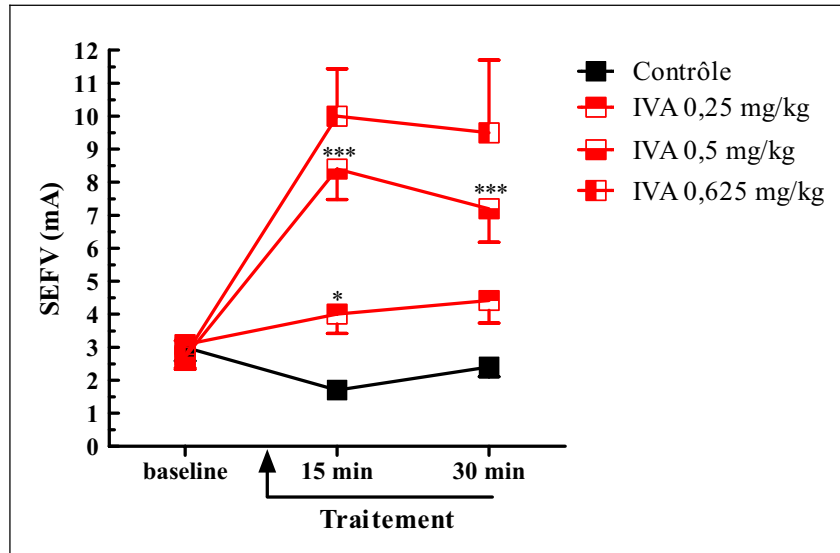


Figure 25 : Évolution dose-dépendante du SEFV (étude 1, protocole 1).

SEFV, seuil électrique de fibrillation ventriculaire. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM.

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. contrôle

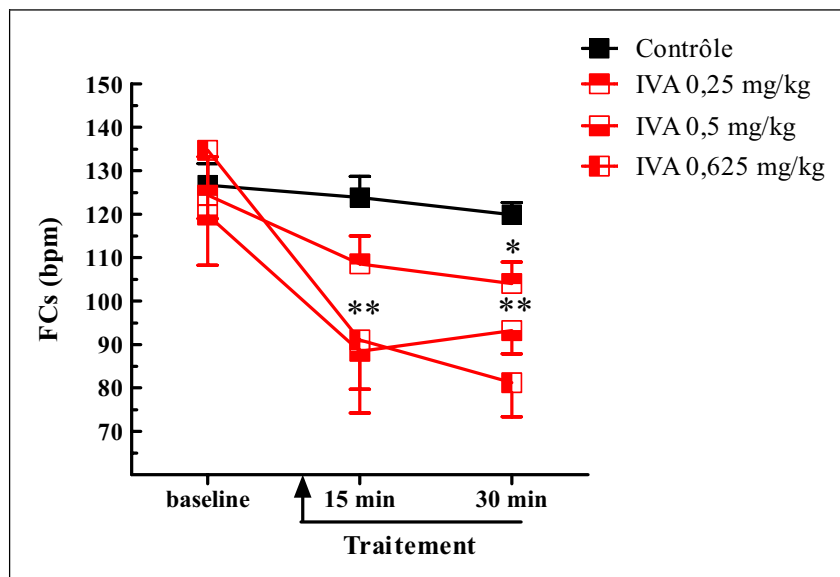


Figure 26 : Évolution dose-dépendante de la fréquence cardiaque (étude 1, protocole 1)

FCs, fréquence cardiaque sinusale.. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. contrôle.

Tableau 2 : Impact de l'administration d'ivabradine à différentes doses (0,25 ; 0,5 et 0,625 mg/kg) sur la durée du potentiel d'action monophasique corrigée (étude 1, protocole 1).

dMAPc	Baseline		Traitement	
	Contrôle	11,7 ± 0,3	11,2 ± 0,2	12,1 ± 0,3
IVA 0,25 mg/kg	10,7 ± 0,3	10,4 ± 0,5	10,9 ± 0,3	
IVA 0,5 mg/kg	11,9 ± 0,4	12,0 ± 0,8	12,4 ± 0,6	
IVA 0,625 mg/kg	13,0 ± 0,4	12,8 ± 0,6	14,0 ± 0,9	

dMAPc, durée du potentiel d'action monophasique corrigée pour la fréquence cardiaque, d'après la formule de Bazett ($dMAP/\sqrt{RR}$). Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

2.3.1.2 Résultats hémodynamiques

L'administration d'IVA à dose croissante n'a induit aucune altération ni de la contractilité myocardique objectivée par la mesure du dP/dt_{max} (Figure 27) ni de la fonction hémodynamique (Tableau 3).

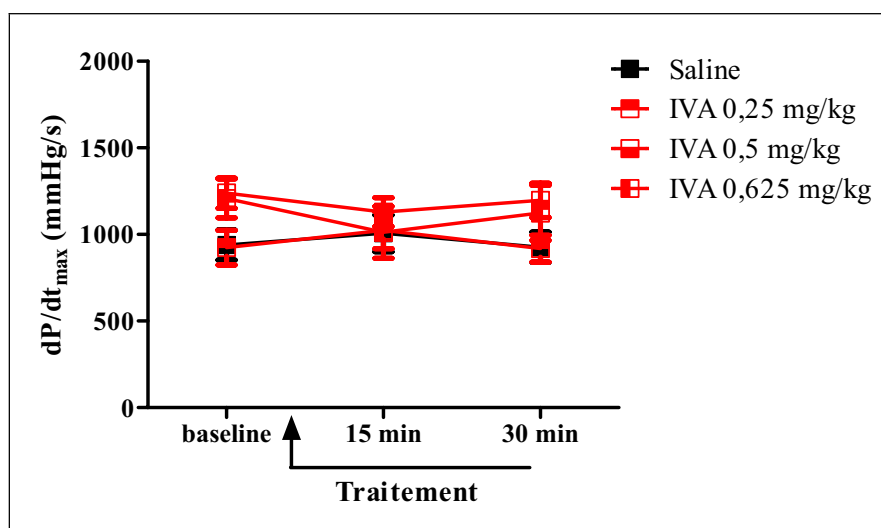


Figure 27 : Impact de l'administration d'ivabradine à différentes doses (0,25 ; 0,5 et 0,625 mg/kg) sur la dP/dt_{max} (étude 1, protocole 1).

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

Tableau 3 : Impact de l'administration d'ivabradine à différentes doses (0,25 ; 0,5 et 0,625 mg/kg) sur la fonction hémodynamique en conditions ischémiques (étude 1, protocole 1).

		Baseline	Traitement	
PAs (mmHg)	Contrôle	80 ± 4	83 ± 3	76 ± 4
	IVA 0,25 mg/kg	78 ± 2	76 ± 3	73 ± 2
	IVA 0,5 mg/kg	86 ± 4	79 ± 3	84 ± 3
	IVA 0,625 mg/kg	89 ± 5	79 ± 3	83 ± 7
PAd (mmHg)	Contrôle	64 ± 3	66 ± 3	59 ± 5
	IVA 0,25 mg/kg	59 ± 3	51 ± 3	45 ± 5
	IVA 0,5 mg/kg	64 ± 3	54 ± 3	56 ± 3
	IVA 0,625 mg/kg	72 ± 6	51 ± 5	58 ± 5
PAm (mmHg)	Contrôle	70 ± 3	73 ± 3	65 ± 5
	IVA 0,25 mg/kg	67 ± 3	59 ± 3	58 ± 3
	IVA 0,5 mg/kg	73 ± 3	65 ± 2	69 ± 4
	IVA 0,625 mg/kg	78 ± 5	65 ± 6	70 ± 6

PAs, pression artérielle systolique, PAd, pression artérielle diastolique, PAm, pression artérielle moyenne. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

Suite à ces résultats la dose de 0,5 mg/kg a été choisie pour la suite de cette étude. A cette dose, l'IVA entraîne une meilleure prévention de l'apparition de la fibrillation associée à une réduction de la fréquence cardiaque de l'ordre de 21% 30 min après son administration, sans autre effet potentiellement délétères.

2.3.2 Corrélation fréquence cardiaque - seuil électrique de fibrillation ventriculaire : étude 1, protocole 2

Afin de mieux comprendre l'effet de la réduction de la fréquence cardiaque induite par l'IVA sur la propension à la fibrillation ventriculaire, le SEFV a été évalué sous ischémie à deux périodes de stimulation différente selon la molécule administrée : i) dans un groupe contrôle ayant reçu une solution saline à une période de stimulation de 300 ms, et ii) dans un groupe ayant reçu 0,5 mg/kg de l'IVA à une période de stimulation fixe de 450 ms.

2.3.2.1 Résultats électrophysiologiques

Le SEFV a été déterminé à une période de stimulation de 300 ms avant administration des traitements (baseline) puis à une période de stimulation de 300 ms (groupe contrôle) ou 450 ms (groupe IVA 0,5 mg/kg).

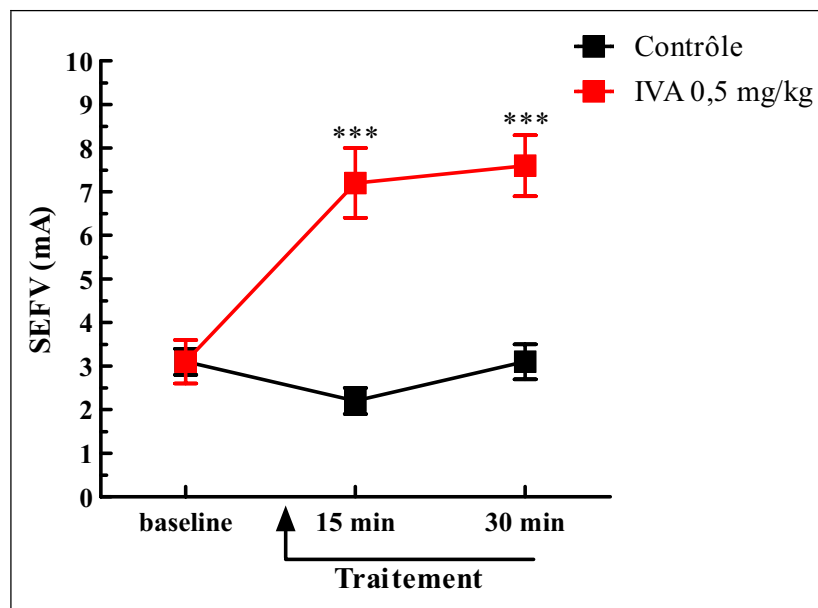


Figure 28 : Évolution du SEFV (étude 1, protocole 2).

Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$ vs. contrôle.

Une réduction significative de la fréquence cardiaque est observée après administration d'IVA en comparaison au groupe contrôle (***) $p < 0,001$; Figure 29), sans modification de la durée du potentiel d'action monophasique corrigée (Tableau 4).

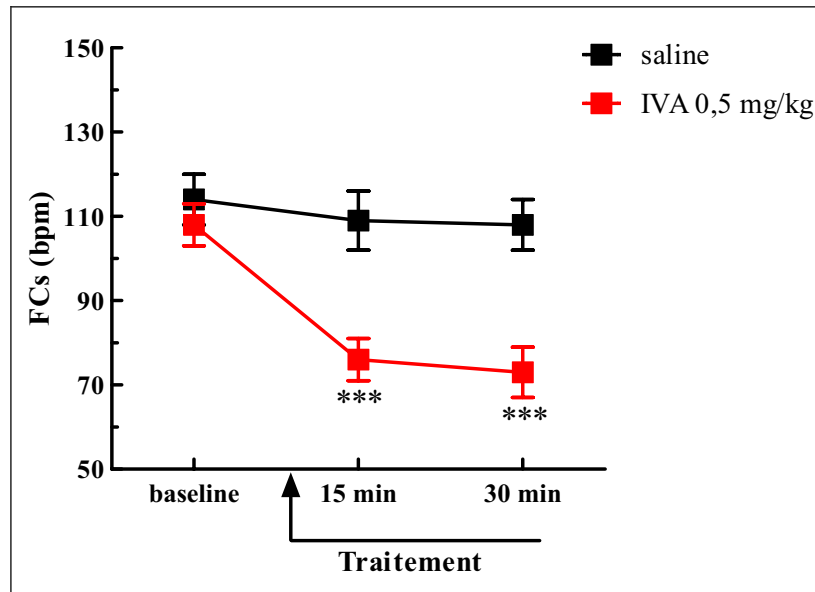


Figure 29 : Évolution de la fréquence cardiaque (étude 1, protocole 2).
Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$ vs. contrôle.

Tableau 4 : Impact de l'administration d'ivabradine (0,5 mg/kg) sur la durée du potentiel d'action monophasique corrigée (étude 1, protocole 2) en conditions ischémiques.

	Baseline		Traitement	
		P=300 ms	Saline : P=300ms	IVA 0,5 mg/kg : P=450ms
dMAPc				
Contrôle	11,7 ± 0,3		11,2 ± 0,2	12,1 ± 0,3
IVA 0,5 mg/kg	11,9 ± 0,4		12,0 ± 0,8	12,4 ± 0,6

dMAPc, durée du potentiel d'action monophasique corrigée. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

2.3.2.2 Résultats hémodynamiques

Comme rapporté dans le protocole précédent, la réduction de la fréquence cardiaque induite par l'IVA n'entraîne aucune altération de la contractilité myocardique.

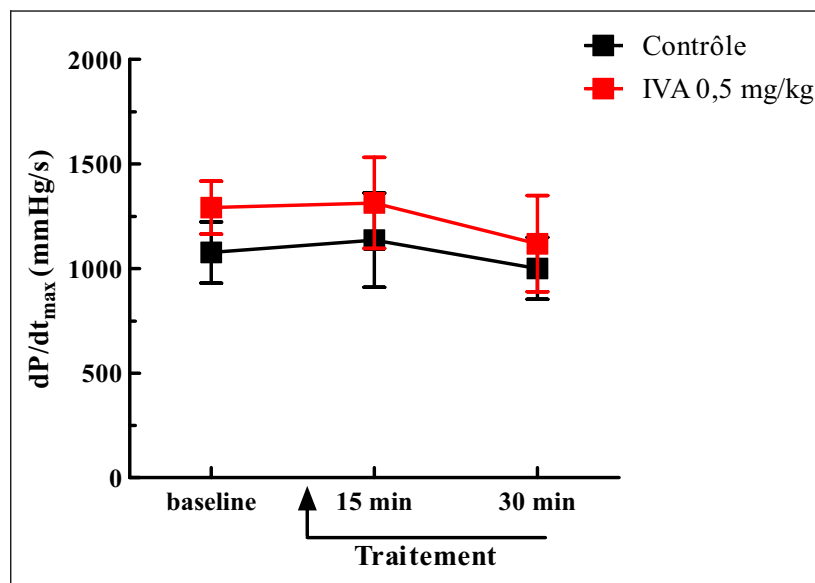


Figure 30 : Évolution du dP/dt_{max} VG (étude 1, protocole 2).

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

Le Tableau 5 rapporte l'évolution des pressions artérielles enregistrées à 1 min d'ischémie. Les résultats montrent que l'administration d'IVA 0,5 mg/kg a entraîné une diminution de la pression artérielle diastolique (* p<0,05) qui est une conséquence directe de la réduction de la fréquence cardiaque.

Tableau 5 : Impact de l'administration d'ivabradine (0,5 mg/kg) sur la fonction hémodynamique (étude 1, protocole 1) en conditions ischémiques.

		Baseline		Traitement	
		P=300 ms		Saline P=300ms IVA 0,5 mg/kg P=450ms	
PAs (mmHg)	Contrôle	78 ± 3	76 ± 3	73 ± 4	
	IVA 0,5 mg/kg	74 ± 3	70 ± 6	69 ± 5	
PAd (mmHg)	Contrôle	57 ± 6	54 ± 4	54 ± 4	
	IVA 0,5 mg/kg	55 ± 4	42 ± 3*	39 ± 3*	
PAm (mmHg)	Contrôle	66 ± 3	64 ± 3	61 ± 4	
	IVA 0,5 mg/kg	63 ± 4	53 ± 4	49 ± 4	

PAs, pression artérielle systolique, PAd, pression artérielle diastolique, PAm, pression artérielle moyenne. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM. * p<0,05 vs. contrôle.

2.3.2.3 Résultats morphologiques

L'étude macroscopique démontre que l'administration d'IVA a réduit la taille de la région myocardique hypoxique en comparaison au groupe contrôle (***) p<0,001 ; Figure 31).

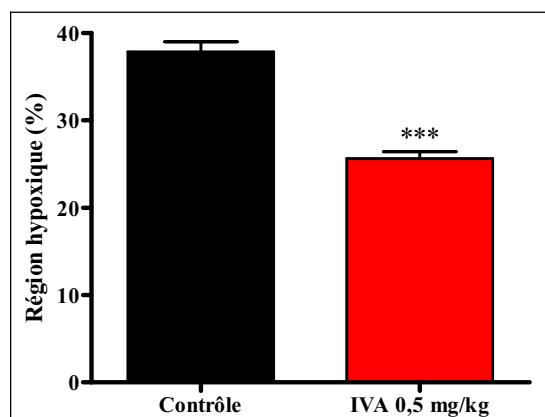


Figure 31 : Taille de la région hypoxique mesurée (étude 1, protocole 2).
Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM. *** p<0.001 vs. contrôle.

2.3.3 Impact de l'ischémie sur le seuil électrique de fibrillation ventriculaire : étude 1, protocole 3

2.3.3.1 Impact de l'ischémie et de l'administration d'IVA en normoxie ou ischémie : protocole 3a

2.3.3.1.1 Résultats électrophysiologiques

La Figure 32 représente le SEFV déterminé avant et à une minute d'ischémie, avant et pendant administration d'IVA à deux périodes de stimulation différentes (300 et 450 ms). Ces résultats ne rapportent aucune différence du SEFV en conditions non ischémiques même après administration d'IVA et pour n'importe quelle période de stimulation ventriculaire. Cependant, sous ischémie l'administration d'IVA augmente le SEFV uniquement lorsque que celui-ci est déterminé à une période de stimulation de 450 ms (** $p < 0,001$ vs. baseline), et non de 300 ms.

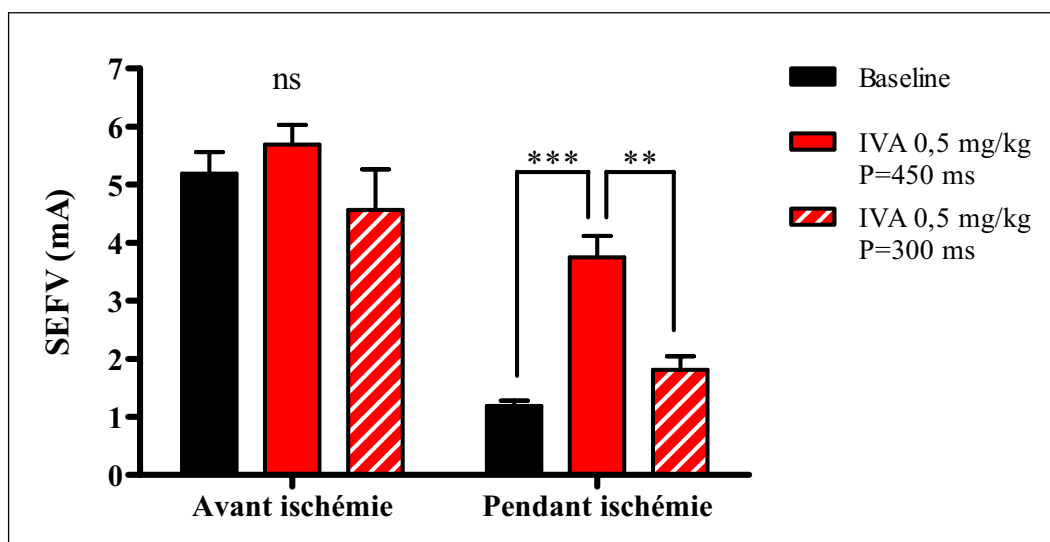


Figure 32 : Impact de l'administration d'IVA sur le SEFV déterminé avant et pendant ischémie, à périodes de stimulation variables (étude 1, protocole 3a).

Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM.

*** $p < 0,001$ IVA 450 ms vs. baseline et ** $p < 0,01$ IVA 300 ms vs. IVA 450 ms pendant ischémie.

À cet effet sur le SEFV est associée une réduction de la fréquence cardiaque de l'ordre de 25% (Figure 33) sans modification de la dMAPc (Tableau 6).

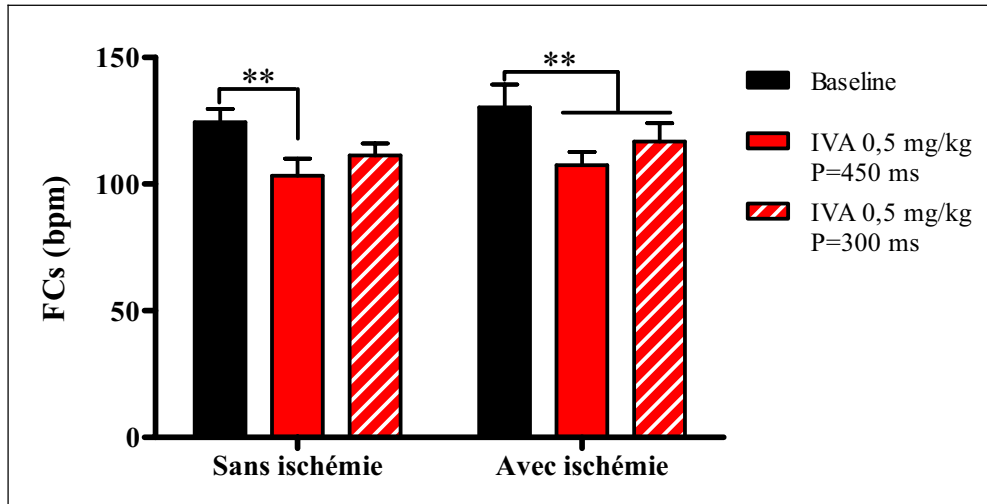


Figure 33 : Impact de l'administration d'IVA sur la fréquence cardiaque déterminée avant et pendant ischémie, à périodes de stimulation variables (étude 1, protocole 3a).

Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$ vs. baseline avant et pendant ischémie.

Tableau 6 : Impact de l'administration d'ivabradine à la dose de 0,5 mg/kg la durée du potentiel d'action monophasique corrigée, avant et durant l'ischémie myocardique (étude 1, protocole 3a).

	Baseline		Ivabradine 0,5 mg/kg			
	P=300 ms		P=450 ms		P=300 ms	
	Sans ischémie	Avec ischémie	Sans ischémie	Avec ischémie	Sans ischémie	Avec ischémie
dMAPc	11,6 \pm 0,4	11,5 \pm 0,4	11,5 \pm 0,6	10,8 \pm 0,6	10,5 \pm 0,6	11,0 \pm 0,4

dMAPc, durée du potentiel d'action monophasique corrigée. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM.

2.3.3.1.2 Résultats hémodynamiques

La Figure 34 représente la contractilité myocardique mesurée avant et administration d'IVA, et avant ou pendant réalisation de l'ischémie. Les résultats montrent que l'ischémie elle-même est responsable d'une altération de la contractilité myocardique.

De plus, l'évolution des paramètres hémodynamiques sont représentés dans le Tableau 7. Les PAs, la PAD et la PAm diminuent pendant l'ischémie en conditions basales (période de stimulation de 300 ms). L'administration d'IVA semble prévenir la chute de la PAD et PAm, mais pas la PAD, lors de la détermination du SEFV à la période de 300 ms.

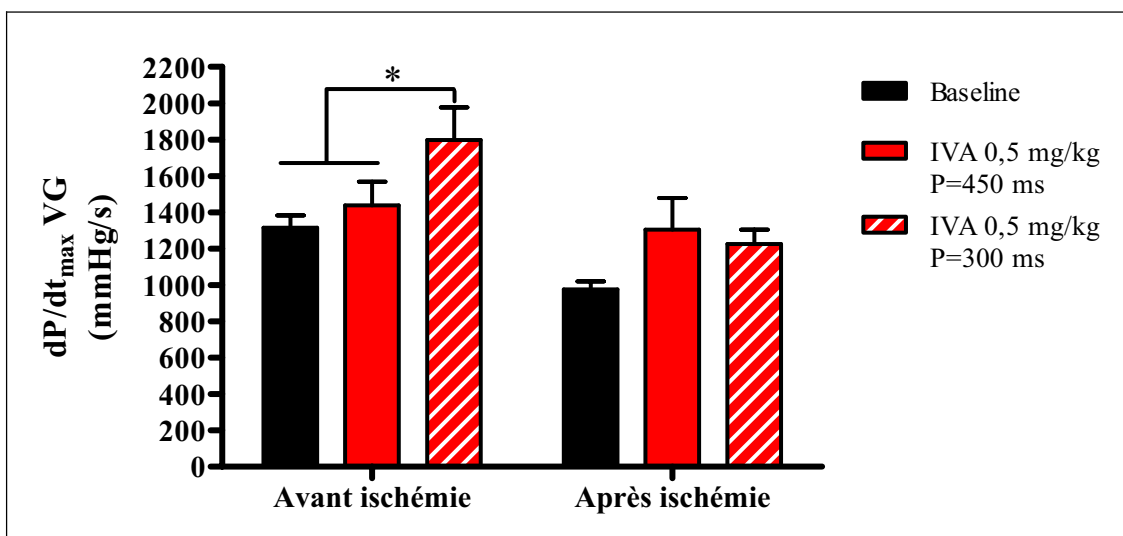


Figure 34 : Impact de l'administration d'ivabradine à la dose de 0,5 mg/kg sur la contractilité myocardique, avant et pendant réalisation de l'ischémie (étude 1, protocole 3a).

Tableau 7 : Impact de l'administration d'ivabradine à la dose de 0,5 mg/kg sur les paramètres hémodynamiques, avant et pendant réalisation de l'ischémie (étude 1, protocole 3a).

	Baseline		Ivabradine 0,5 mg/kg			
	P=300 ms		P=450 ms		P=300 ms	
	Sans ischémie	Avec ischémie	Sans ischémie	Avec ischémie	Sans ischémie	Avec ischémie
PAs (mmHg)	97 ± 4	81 ± 2**	93 ± 2	87 ± 2	95 ± 3	78 ± 5\$\$
PAd (mmHg)	71 ± 4	57 ± 3**	71 ± 4	65 ± 4	67 ± 3	57 ± 5
PAm (mmHg)	82 ± 4	66 ± 3*	79 ± 4	70 ± 5	79 ± 3	65 ± 5

PAs, pression artérielle systolique ; PAd, pression artérielle diastolique, PAm, pression artérielle moyenne. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

* p<0,05 et ** p<0,01 baseline pendant ischémie vs. avant ischémie. \$\$ p<0,01 IVA P=300 ms pendant ischémie vs. avant ischémie.

2.3.3.2 Impact de l'administration d'IVA en normoxie : protocole 3b

2.3.3.2.1 Résultats électrophysiologiques

Ce dernier protocole avait pour objectif d'évaluer l'impact de l'IVA en conditions normoxiques sur le SEFV. La Figure 35 représente le SEFV déterminé avant et après administration d'IVA. Une diminution du SEFV est rapportée lors de l'application d'une stimulation ventriculaire rapide (P=300 ms) en comparaison à une période de stimulation ventriculaire plus élevée (P=400 ms), en absence ou en présence d'IVA. La réduction de la fréquence cardiaque obtenue sous IVA (Figure 36) sans modification de la dMAPc (Tableau 8), n'améliore pas le SEFV qu'il soit déterminé à une période élevée ou non. Ainsi, dans ces conditions de détermination du SEFV en normoxie, l'IVA n'apporte aucun effet bénéfique supplémentaires.

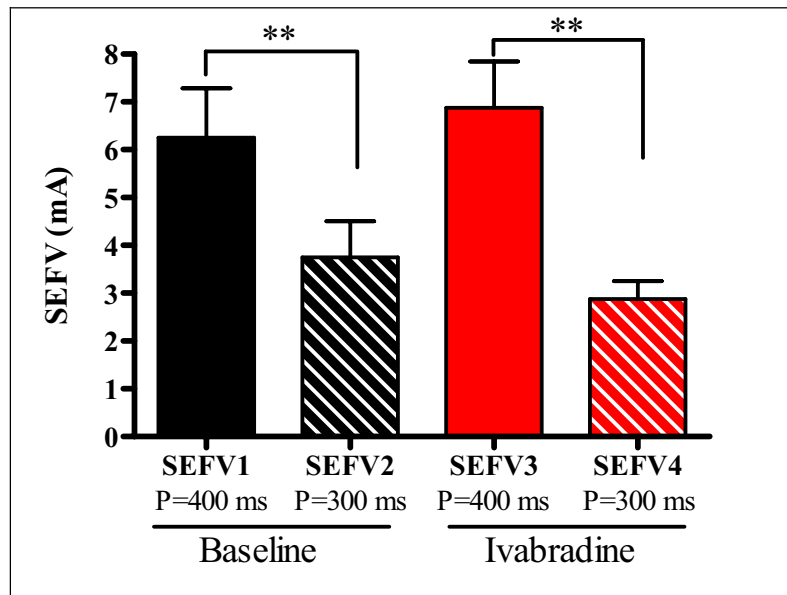


Figure 35 : SEFV après administration d'IVA en normoxie (étude 1, protocole 3b).
 SEFV, seuil électrique de fibrillation ventriculaire. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM.
 ** $p < 0,01$ P=300 ms vs. P=400 ms.

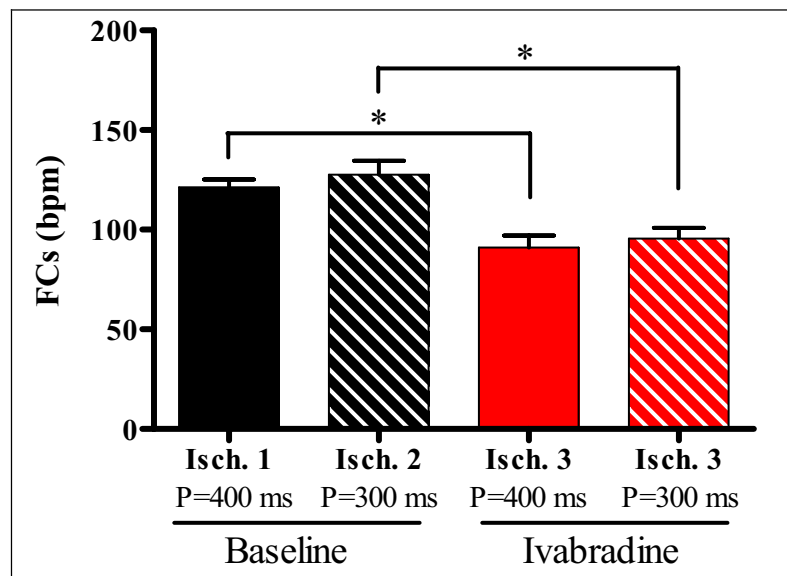


Figure 36 : Réduction de la fréquence cardiaque par l'IVA en normoxie (étude 1, protocole 3b)
 FCs, fréquence cardiaque sinusale ; Isch., schémie. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM.
 * $p < 0,05$ IVA vs. baseline.

Tableau 8 : Impact de l'administration d'IVA sur la durée du potentiel d'action monophasique corrigée en normoxie (étude 1, protocole 3b).

	Baseline		Ivabradine 0,5 mg/kg	
	Isch. 1 P=400 ms	Isch. 2 P=300 ms	Isch. 3 P=400 ms	Isch. 4 P=300 ms
dMAPc	11,0 ± 1,7	12,2 ± 1,0	11,3 ± 1,3	11,5 ± 0,6

dMAPc, durée du potentiel d'action monophasique corrigée. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

2.3.3.2 Résultats hémodynamiques

Le Tableau 9 rapporte les pressions artérielles et la contractilité myocardique. Dans ces conditions de normoxie, l'administration d'IVA à la dose de 0,5 mg/kg, ne modifie pas la fonction hémodynamique et contractile cardiaque.

Tableau 9 : Impact de l'administration d'IVA sur la fonction cardiaque hémodynamique en normoxie (étude 1, protocole 3b).

	Baseline		Ivabradine 0,5 mg/kg	
	Isch. 1 P=400 ms	Isch. 2 P=300 ms	Isch. 3 P=400 ms	Isch. 4 P=300 ms
PAs (mmHg)	100 ± 6	87 ± 6	95 ± 1	93 ± 5
PAd (mmHg)	77 ± 8	68 ± 7	60 ± 2	61 ± 4
PAm (mmHg)	86 ± 8	76 ± 6	76 ± 1	76 ± 4
dP/dt _{max} (mmHg/s)	1197 ± 133	1212 ± 152	1387 ± 374	1509 ± 344

PAs, pression artérielle systolique ; PAd, pression artérielle diastolique, PAm, pression artérielle moyenne. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

2.4 Discussion

Dans cette étude nous avons démontré que la baisse de la fréquence cardiaque induite par l'IVA a réduit la propension à la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique (objectivée par une augmentation du SEFV) et a limité la taille de la zone hypoxique sans modifier la dMAPc qui est habituellement diminuée lors de l'ischémie myocardique. L'ensemble de ces effets n'était pas associé à des modifications du dP/dt_{\max} VG ni d'aucun autre paramètre hémodynamique et électrophysiologique, contrairement à d'autres molécules couramment utilisés en clinique dans le traitement des cardiopathies ischémiques comme les inhibiteurs calciques ou les bêta-bloquants [Lama, 2002], ce qui constitue une avancée thérapeutique indéniable. De plus, l'originalité de l'action de l'IVA est que son administration entraîne une réduction dose-dépendante de la fréquence cardiaque [Vaillant, Timour *et al.*, 2008]. Des résultats similaires ont été rapporté par DiFrancesco [DiFrancesco and Camm, 2004]. Ces auteurs montrent effectivement une réduction dose-dépendante de la fréquence cardiaque par l'IVA sans altération hémodynamique ou électrophysiologique, et sans modification de la résistance des artères coronaires.

Les médicaments actuellement utilisés dans la prévention de la fibrillation ventriculaire (bêta-bloquants ou inhibiteurs calciques) ont également été étudiés au laboratoire de Pharmacologie Médicale de Lyon sur notre modèle porcin d'ischémie myocardique aigue. Contrairement aux antiarythmiques de classe I notamment Ia et Ic qui ont réduit le seuil électrique de la fibrillation ventriculaire [Faucon, Aupetit *et al.*, 1991; Timour, Aupetit *et al.*, 1991; Aupetit, Timour *et al.*, 1993; Timour, Aupetit *et al.*, 1994; Bui-Xuan, Aupetit *et al.*, 1997], les bêta-bloquants [Aupetit, Frassati *et al.*, 1998] et les inhibiteurs calciques [Bui-

Xuan, Aupetit *et al.*, 1997] ont, en revanche, réduit la propension à la fibrillation ventriculaire. Toutefois, leur administration étaient associés à des altérations électrophysiologiques (allongement de l'intervalle PR) et/ou hémodynamiques (baisse de la contractilité cardiaque). Ainsi, l'apport de l'IVA constitue une alternative thérapeutique intéressante aux β -bloquants et aux inhibiteurs calciques en cas d'ischémie myocardique particulièrement sensible aux variations de l'hémodynamique cardiaque. Dans ce travail, nous avons analysé les effets de l'IVA sur :

Ivabradine et fréquence cardiaque

Il est bien connu que l'ischémie myocardique conduit à des ectopies ventriculaires voire à la fibrillation ventriculaire, cause majeure de mort subite des patients coronariens [Boengler, Schulz *et al.*, 2009]. Ce risque est augmenté en cas de tachycardie qui aggrave le déséquilibre entre la demande et l'apport myocardique en oxygène [Koplan and Stevenson, 2009]. Une réduction de la fréquence cardiaque sinusale, considérée comme marqueur de la demande myocardique en oxygène et du travail cardiaque [Palatini, 2009], diminue la consommation en oxygène et améliore la perfusion myocardique par l'allongement de la durée des diastoles [Heusch, 2008]. C'est ainsi que la baisse de la fréquence cardiaque induite par l'IVA participe à la réduction du risque de déclenchement de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique.

Fréquence cardiaque et durée de potentiel d'action monophasique

Il a été rapporté qu'à la suite d'une ischémie myocardique aigue telle qu'obtenue dans notre modèle, des altérations ioniques apparaissent dès les premières secondes de l'occlusion coronarienne, dont une fuite cellulaire d'ions K^+ [Shaw and Rudy, 1997; Rubart and Zipes,

2005] et une accumulation intracellulaire d'ions Na^+ et Ca^{2+} [Rubart and Zipes, 2005]. Ces modifications ioniques sont responsables de troubles de repolarisation ventriculaire et d'une réduction de la durée des potentiels d'action monophasiques, lesquels conditionnent un accroissement de l'excitabilité [Lyons, Burgess *et al.*, 1977; Schamroth and Schamroth, 1984; Overholser, Zheng *et al.*, 2008]. Par ailleurs, ces altérations peuvent générer des post-potentiels dépolarisants tardifs, eux-mêmes responsables du déclenchement de la fibrillation ventriculaire et donc la mort subite.

Ainsi, l'ivabradine en réduisant la fréquence cardiaque par augmentation du temps de diastole, tend à combattre la réduction de la dépolarisation ventriculaire secondaire à l'ischémie dont la corrélation avec le potentiel de membrane a été démontrée par d'autres auteurs [Janse and Wit, 1989]. De plus elle s'opposerait à la genèse de post-potentiels dépolarisants tardifs.

Fréquence cardiaque et région hypoxique

La réduction de la taille de la région myocardique hypoxique rapportée dans ce travail était associée à une réduction du risque de déclenchement de la fibrillation ventriculaire. Des travaux précédents réalisés au laboratoire de Lyon avaient rapportés des résultats similaires [Vaillant, Timour *et al.*, 2008; Vaillant, Tsibiribi *et al.*, 2008] pouvant s'expliquer par la baisse de la fréquence cardiaque. En effet, lors d'occlusion coronarienne, l'ischémie s'étend jusqu'aux limites du territoire anatomiquement irrigué par cette artère. L'augmentation de la durée de diastole induite par l'IVA est associée à une amélioration de la perfusion myocardique par les artères coronaires fonctionnelles non ligaturées et/ou leurs branches collatérales, ce qui pourrait ainsi expliquer la préservation de l'activité SDH le marqueur d'ischémie utilisé dans cette étude.

Cependant, l'identification précise du lien entre arythmie et réduction de la fréquence cardiaque ne peut pas être expliquée directement par la présente étude. Les effets hétérogènes de l'ischémie myocardique (existence de zones frontalières épicaudiques et endocardiques, de gradients de concentrations ioniques) n'ont pas été pris en compte. Bien que notre méthode d'étude de la propension à la fibrillation ventriculaire par détermination du seuil électrique ait été critiquée, elle s'est avérée fiable et reproductible [Tsibiribi, Bui-Xuan *et al.*, 2006; Vaillant, Timour *et al.*, 2008; Vaillant, Tsibiribi *et al.*, 2008].

Conclusion

L'IVA se montre donc expérimentalement capable de prévenir dans une réelle mesure, la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique. Son effet sur l'automatisme sinusale lui confère la possibilité d'agir non seulement en préventif, mais également en curatif c'est-à-dire après installation de l'occlusion coronaire. C'est dans l'éventualité d'une inadéquation transitoire entre l'afflux sanguin réduit et besoins nutritifs exagérés associée à un risque de fibrillation ventriculaire primaire [Kochs, Eggeling *et al.*, 1993; de Jong, Marsman *et al.*, 2009] que l'on peut attendre cliniquement le plus sûr intérêt de l'administration de l'IVA.

3. ÉTUDE 2 : Propension à la fibrillation ventriculaire : structure cardiomyocytaire et perfusion myocardique

3.1 Objectifs et protocoles d'étude

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la protection contre la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique rapportée dans l'étude précédente, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur l'ultrastructure cardiomyocytaire et sur la perfusion myocardique régionale.

Ainsi, des ischémies myocardiques ont été obtenues par occlusion totale et brève (1 min) de l'artère coronaire interventriculaire antérieure selon la méthode décrite précédemment (paragraphe 1.2.3.1) dans deux protocoles distincts.

Dans le protocole 1, l'évolution des paramètres électrophysiologiques (SEFV, FCs, dMAP) et hémodynamiques (dp/dt_{max} VG et pressions artérielles) a été étudiée en fonction de l'administration du traitement (solution saline ou IVA). L'excision terminal du cœur a permis : i) de déterminer la taille de la zone myocardique soumise à l'ischémie (activité de le SDH) ; ii) d'étudier l'ultrastructure cardiomyocytaire (en microscopie électronique); iii) d'évaluer l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose (caspase 3, p53 et bcl2 ; en PCR).

Dans le protocole 2, l'étude de la perfusion myocardique par mesure du flux sanguin myocardique régional (FSMR) a été réalisée en Tomographie par Émission de Positons (TEP). Dans ce protocole 2, une occlusion coronaire totale et brève (1 min) a également été réalisée, mais aucune fibrillation ventriculaire n'a été induite.

3.1.1 Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur la morphologie myocardique : étude 2, protocole 1

L'objectif de ce protocole 1 (Figure 37) a été de comparer l'effet de deux fréquences cardiaques, une élevée et l'autre basale sur le SEFV. La stimulation électrique ventriculaire a été réalisée soit à une période 300 ms (200 bpm), soit à une période dite basale fixée à 10% en dessous de la période cardiaque spontanée de l'animal afin d'être le plus proche possible des conditions physiologiques.

Afin de tester l'impact de la réduction de la fréquence cardiaque par l'IVA, le SEFV a été déterminé avant et après administration d'une solution saline (Groupe contrôle, N=6) ou d'IVA à la dose de 0,25 mg/kg (Groupe IVA, N=6). La dose d'IVA utilisée dans ce protocole a été réduite par rapport aux protocoles précédents. Cette réduction a été justifiée par les résultats du protocole 1 de l'étude 1 qui a permis d'obtenir une baisse modérée de la fréquence cardiaque sinusale et une bonne efficacité sur le SEFV.

Le SEFV a été déterminé sous pacing ventriculaire avec une période de 10% au-dessus de la fréquence cardiaque sinusale (1^{er}, 3^{ème} et 5^{ème} détermination du SEFV) ou après application d'un pacing ventriculaire à fréquence élevée de 200 bpm obtenue avec une période de 300 ms (2^{ème}, 4^{ème} et 6^{ème} SEFV).

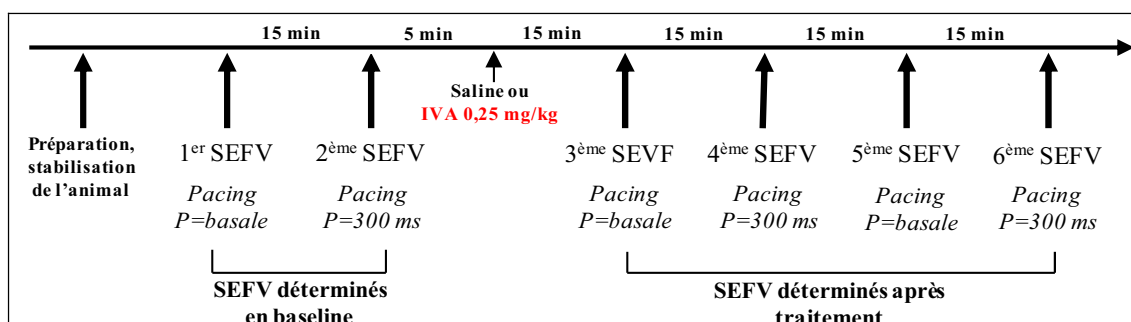


Figure 37 : Impact de la fréquence cardiaque sur le SEFV (étude 2, protocole 1).

Saline (Groupe contrôle) vs. IVA (Groupe IVA 0,25 mg/kg).

SEFV, seuil électrique de fibrillation ventriculaire ; P, période de stimulation électrique ventriculaire.

3.1.2 Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur la perfusion myocardique : étude 2, protocole 2

L'objectif principal de ce protocole 2 a été, outre la mesure du FSMR lors de l'administration d'IVA, de démontrer si l'amélioration éventuelle de la perfusion myocardique régionale lors de l'ischémie était due à la seule baisse de la fréquence cardiaque obtenue par l'IVA ou si cette dernière agissait par un autre mécanisme. Afin de répondre à cette question, nous avons analysé les modifications de la perfusion myocardique à la reperfusion d'une ischémie lors d'une réduction de la fréquence cardiaque obtenue i) soit par stimulation électrique du nerf vague (N=4), ii) soit par l'administration d'IVA 0,25 mg/kg (N=3) (Figure 38).

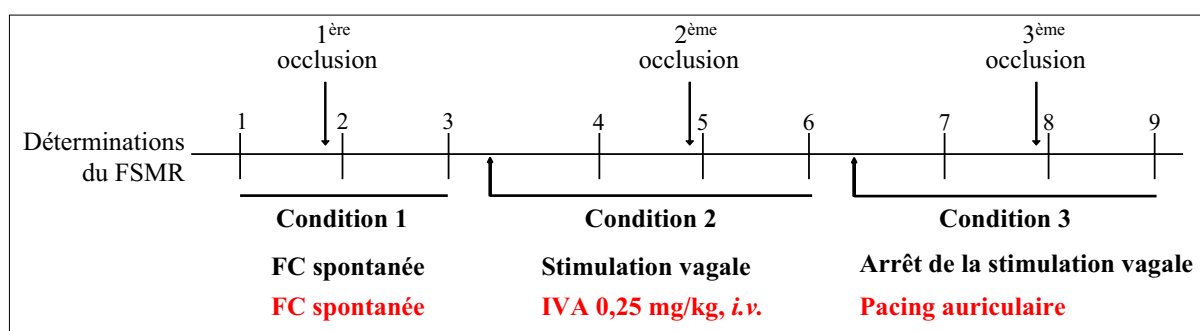


Figure 38 : Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur la perfusion myocardique régionale (étude 2, protocole 2).

FC, fréquence cardiaque ; FSMR, flux sanguin myocardique régional.

3.2 Matériel et méthodes spécifiques de l'étude 2

3.2.1 Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur morphologie myocardique : Étude 2, Protocole 1

3.2.1.1 Impact d'une baisse de la fréquence cardiaque sur l'ultrastructure des cardiomyocytes

Immédiatement après euthanasie, un prélèvement de myocarde a été effectué au centre de la région myocardique soumise à l'ischémie pour l'étude ultrastructurale des cardiomyocytes en microscopie électronique. Les prélèvements ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde 4% et cacodylate-HCl (0,3 M, pH 7,4). Ils ont ensuite été fixés avec du tétroxyde d'osmium 2% - cacodylate-HCl de sodium (pH 7,4 ; 1 heure), puis déshydratés avec de l'éthanol à gradient croissant (30%, 50%, 70%, and 95%; 5 min) et de l'éthanol pure (3*10 min). Une imprégnation a été effectuée avec de l'Epon A (50%) plus B (50%) plus DMP30 (1,7%). Enfin, l'inclusion a été obtenue par polymérisation du mélange d'Epon (60°C ; 72 heures). Des coupes de 60-90 nm ont été obtenues avec un ultramicrotome (RMC MTX ; Elexience) et contrastée avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb puis observées avec un microscope électronique à transmission (JEOL 1200CX) au Centre Commun d'Imagerie Laennec (CeCIL, Université Claude Bernard, Faculté de Médecine Lyon R.T.H. Laennec, Lyon). Ainsi, les lésions suivantes ont ainsi été évaluées :

- **le nombre de noyaux** présentant une rupture membranaire et une agglomération irrégulière de la chromatine (sur 20 noyaux observés). Le noyau cardiomyocytaire a une forme ovalaire, entouré de double membranes, la membrane externe est en contacte avec le réticulum endoplasmique. Le nucléole, souvent unique se trouve proche d'un des pôles, la chromatine, dispersée sous la forme de fines granulations.

- **le nombre de sarcolemmes** présentant une rupture et des œdèmes (sur 20 sarcolemmes observés) ;
- **le nombre de ruptures jonctionnelles** (sur 20 jonctions cellulaires observées) ;
- **le nombre de cardiomyocytes nécrosés** (sur 20 cardiomyocytes observés) ;
- **le nombre de mitochondries** présentant un déplacement, un gonflement, une dégranulation ou des ruptures de crêtes (sur 200 mitochondries observées) ;
- **le nombre de capillaires** ayant un épaississement de la lame basale et dont leur noyau présente une mauvaise distribution de la chromatine (sur 20 capillaires observés).

3.2.1.2 Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose

Les caspases 3 et 9 dans le tissu cardiaque reflètent les processus apoptotiques durant l'ischémie myocardique. L'activation de la caspase 9 entraîne la libération du cytochrome c par les mitochondries et caractérise la phase réversible. A l'inverse, la caspase 3 caractérise la phase irréversible de la chaîne apoptotique [Czerski and Nunez, 2004]. La protéine suppresseur de tumeur p53, intermédiaire de l'apoptose, agit soit par activation de la « **protéine de mort** » **Bax** ou suppression de la transcription de la « **protéine de survie** » **Bcl-2**, ou les deux. Un rétrocontrôle négatif de Bcl-2 ou positif de Bax est associé à une activation de l'apoptose après ischémie/reperfusion [Zhao and Vinten-Johansen, 2002].

Des échantillons myocardiques ont été prélevés au centre de la région myocardique soumise à l'ischémie, puis congelés immédiatement dans l'azote liquide et stockés à -80°C. Une qRT-PCR a été réalisée afin d'étudier l'expression des gènes des 3 protéines impliquées dans la cascade des réactions apoptotique.

3.2.1.2.1 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARNs a été réalisée avec le kit RNeasy mini kit (Qiagen) selon un protocole particulier pour des échantillons de muscle. Pour chaque prélèvement de cœur, des coupes de 30 µm d'épaisseur ont été faites au cryostat et lysées dans du tampon de lyse (RLT du kit : 10 mg d'échantillon dans 300 µl de RLT) dans des tubes à billes (lysing Matrix D) adaptés au Fastprep (QBiogene). 590 µl d'eau dépourvue en RNase ainsi que 10 µl de protéinase K (Qiagen ; 10 min, 55°C) ont été rajoutées à l'homogénat. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 3 min à 10 000 g (à 20-25°C). Le surnageant a été prélevé et 450 µl d'éthanol ont été rajoutés. La suite du protocole a été effectuée selon les instructions du fabricant du kit.

3.2.1.2.2 Étude qualitative et quantitative des ARN

Une étude qualitative et quantitatives des ARN a été effectuée à l'aide du Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies) sur une puce ARN 6000 Nano (sensibilité de 25-500 ng/µl; Agilent Technologies) par mesure spectrophotométrique sur un bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies). La qualité de chaque ARN a été évaluée par l'indice de qualité RNI (RNA Integrity Number) (valeur moyenne entre 7,8 et 9).

3.2.1.2.3 Transcription inverse (RT)

Les ARN totaux (0,8 µg) et 1 µl (500 ng) d'oligo dT (12-18) ont été dénaturés 10 min à 70°C (afin d'éliminer les structures secondaires), puis placés dans la glace (« flash cooling » afin d'éviter leur renaturation). La réaction s'est effectuée dans un volume final de 20 µl contenant 40 U (1 µl) de RNase-out, 0,5 mM de chaque dNTP, 10 mM de dithiothréitol, le tampon RT 1X et 200 U/µl d'enzyme Mu-MLV, à 42°C pendant 1,5 heure.

3.2.1.2.4 PCR en temps réel (qPCR)

Principe : Le Light-Cycler est un thermocycleur à échanges thermiques très rapides (air pulsé), couplé à un micro-spectrofluorimètre. Son unité optique comporte trois canaux de détection de la fluorescence et une source de lumière. Il est piloté par un ordinateur permettant l'acquisition et le suivi en temps réel des données, contrairement à la PCR classique qui donne des résultats en point final. La réaction d'amplification de la séquence ADN cible suit les mêmes étapes qu'en PCR classique c'est-à-dire dénaturation, hybridation, extension. À la différence d'une PCR classique, la PCR en temps réel utilise une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé. Les résultats ont été obtenus à partir du logiciel d'analyse du Light-Cycler.

Quantification relative : la quantification relative des gènes d'intérêts dans chaque échantillon a été obtenue par rapport à un gène de référence non-régulé, ici la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) afin de normaliser nos résultats. Nous avons utilisé le logiciel "Real Quant" (Roche) qui tient compte de l'efficacité d'amplification de chaque gène, pour évaluer le rapport relatif entre différents échantillons. Ce rapport final est exprimé comme le rapport du gène d'intérêt / de référence de chaque essai divisé par le rapport du gène d'intérêt / gène de référence d'un échantillon.

Liste des amorces utilisées :

[11-Genomic] caspase3-pig-L TTTCTTCAGAGGGGACTGCT 40
[11-Genomic] caspase3-pig-R CACGCCATGTCATCTTCAGT 40
[11-Genomic] p53-pig-L CTTTGAGGTGCGTGTTTGTG 40
[11-Genomic] p53-pig-R GGCTTCTTCTTTTGCCTGG 40
[11-Genomic] GAPGH-pig-L GGGCATGAACCATGAGAAAGT 40
[11-Genomic] GAPGH -pig-R TGTGGTCATGAGTCCTTCCA 40
[11-Genomic] bcl2-pig-FW GAAAAGCAAGTGGCAAGAGG 40
[11-Genomic] bcl2-pig-Rev AGGCCTCCCAAAGTTTACT 40
[11-Genomic] bcl2-pig2-FW GAGATGCCAATTGGTGGAGT 40
[11-Genomic] bcl2-pig2-rev AAAACAGGTGCCTCCTTCC 40

3.2.2 Détermination du flux sanguin myocardique régional : étude 2, protocole 2

Le flux sanguin myocardique régional (FSMR, déterminé en ml/min/g) a été quantifié dans deux groupes d'animaux par TEP. La préparation des animaux des animaux était similaire à celle décrite précédemment (Etude 1).

3.2.2.1 Conditions expérimentales

Le FSMR a été évalué à des moments clés du protocole :

- i)* avant occlusion coronarienne : **déterminations 1, 4 et 7,**
- ii)* à la reperfusion : **déterminations 2, 5 et 8,**
- iii)* 15 min après la levée de l'ischémie : **déterminations 3, 6 et 9,**

dans 3 conditions :

- i)* à fréquence cardiaque spontanée : **condition 1,**
- ii)* à fréquence cardiaque diminuée : **condition 2,** soit par stimulation vagale soit par l'administration d'IVA,
- iii)* lors du retour à la fréquence cardiaque initiale : **condition 3,** soit par arrêt de la stimulation vagale soit par pacing auriculaire.

La stimulation vagale a été réalisé après la mise en place sur un des nerfs vagues (préalablement disséqué), d'une sonde de stimulation reliée à un stimulateur (Hugo Sachs, Freiburg, Germany) permettant de délivrer des courants de 20 Volts, de 100 ms de période et de 1,5 ms de durée.

La stimulation auriculaire a été réalisée grâce à une sonde d'entraînement placée dans l'oreillette gauche et reliée à un stimulateur (Hugo Sachs, Freiburg, Germany) délivrant un courant de 1 mA d'intensité, de 5 ms de durée et d'une période variable, basée sur la fréquence cardiaque spontanée des animaux avant l'administration d'IVA aux conditions basales.

3.2.2.2 Imagerie TEP

L'imagerie TEP utilise une classe de traceurs radiomarqués qui décroissent avec l'émission d'un positon. Ce positon interagit avec un électron produisant deux photons gamma de 511 keV qui partent sur une même trajectoire mais en sens opposé. Ces rayons gamma sont alors détectés par un ensemble de capteurs contenu dans la caméra TEP. L'analyse TEP a été effectuée avec un tomographe Siemens/ECAT EXACT HR+ 63-slice whole-body tomography). L'évaluation du FSMR a été effectuée par l'injection d'un bolus (10 secondes) de H₂¹⁵O (250-300 MegaBecquerel) en *i.v.*

L'acquisition a été effectuée pendant 5 min à chaque injection de H₂¹⁵O et a permis la détermination d'une série dynamique de 22 fenêtres : 10 x 4 secondes ; 2 x 10 secondes ; 3 x 20 seconde ; 3 x 30 secondes. L'analyse de cette série a permis d'estimer le FSMR par l'utilisation du modèle de Iida [Araujo, Lammertsma *et al.*, 1991; Iida, Kanno *et al.*, 1991].

3.2.2.3 Analyse d'images

Le FSMR a été estimé sur deux coupes (en position basale et apicale) dans le petit axe. Six régions d'intérêt ont été dessinées dans chacune de ces coupes afin d'évaluer la perfusion myocardique. L'une de ces régions d'intérêt correspond à la région myocardique

perfusée par l'artère interventriculaire antérieure (face antérieure) et deux autres correspondants à la région myocardique opposée (face postérieure non irriguée par cette artère coronaire) que nous avons utilisée comme région contrôle.

Une analyse factorielle de séquence d'images médicales (FAMIS) [Frouin, Bazin *et al.*, 1992] a été appliquée à nos séries dynamiques afin d'obtenir des images représentatives de la perfusion myocardique relative [Ahn, Lee *et al.*, 2001].

Le FSMR normalisé par battement (ml/min/g/battement) a été quantifié dans la région myocardique soumise à l'ischémie (B1, Figure 39.A) et exprimé en pourcentage du FSMR de la région contrôle (B2, Figure 39.B) : $(B1-B2)/B2*100$.

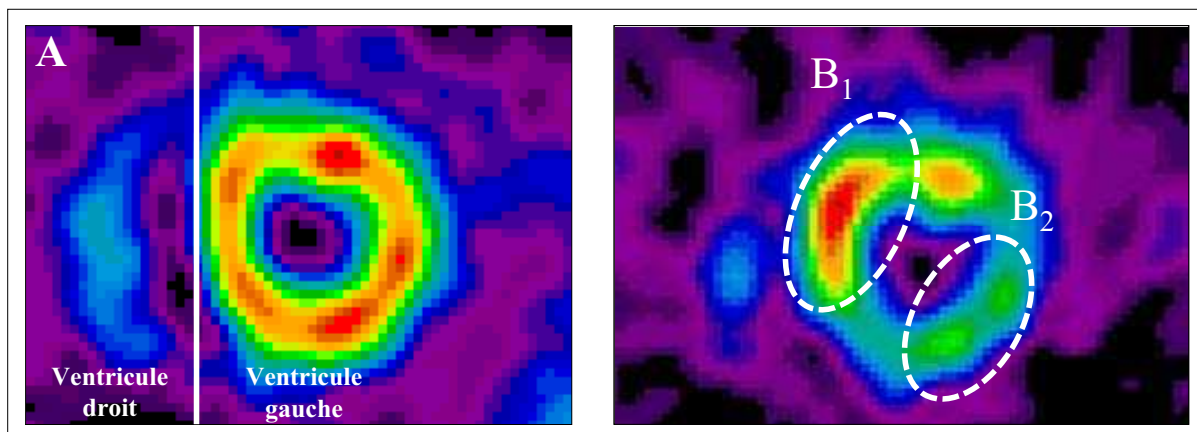


Figure 39 : Tomogrammes illustrant le FSMR sans traitement à FC spontanée avant occlusion (A) et à la reperfusion (B).

**La couleur rouge indique une perfusion myocardique élevée.
Le FSMR est exprimé en pourcentage de la région contrôle : $(B1-B2)/B2*100$.**

3.2.3 Analyse statistique

3.2.3.1 Protocole 1

Une ANOVA à deux voies a été utilisée afin d'étudier l'effet temps et traitement sur la fréquence cardiaque, le SEFV, la dMAPc et le dp/dt_{max} VG suivie d'un post-test de Bonferroni lorsque l'analyse de variance était significative.

La taille de la région myocardique soumise à l'ischémie ainsi que les niveaux d'expression des gènes pour l'apoptose ont été analysés par l'utilisation d'un test t non apparié.

Un test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse des résultats en microscopie électronique qui correspondent à un dénombrement (variables non continues).

3.2.3.2 Protocole 2

Afin d'étudier l'effet temps et traitement (IVA ou stimulation vagale) entre les deux groupes, une ANOVA à deux voies a été réalisée suivie d'un post-test de Bonferroni lorsque cette analyse de variance était significative pour la fréquence cardiaque et le FSMR relatif.

Les conditions 1 et 4 ont été également comparées afin d'étudier l'effet plus spécifiquement la baisse de fréquence cardiaque induite soit par stimulation vagale, soit par l'administration d'IVA. Pour cela, une ANOVA à deux voies a été réalisée sur le FSMR suivie d'un post-test de Bonferroni sur le FSMR normalisé par battement cardiaque (ml/g/battement).

3.3 Résultats

3.3.1 Impact de la baisse de la fréquence cardiaque sur la structure cardiomyocytaire : étude 2, protocole 1

3.3.1.1 Résultats électrophysiologiques

Dans ce protocole 1 (étude 2), le SEFV a été déterminé à période de stimulation électrique ventriculaire variable : à période basale (10% au dessus de la période spontanée de l'animal) et à 300 ms (fréquence rapide).

L'analyse montre que le SEFV déterminé à période de stimulation basale est significativement augmenté (***) $p < 0,001$; Figure 40) après l'administration d'IVA qui est associée à une réduction significative de la fréquence cardiaque (** $p < 0,01$ vs. contrôle ; Figure 41). Il est intéressant de noter qu'aucune modification de la durée du potentiel d'action monophasique corrigée n'est rapporté dans ces conditions (Tableau 10).

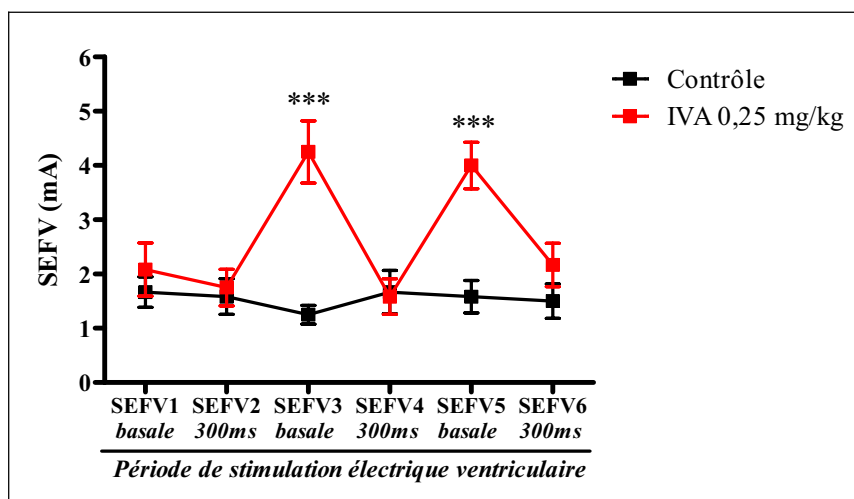


Figure 40 : SEFV en conditions ischémiques à périodes de stimulation ventriculaires variables (étude 2, protocole 1).

SEFV, seuil électrique de fibrillation ventriculaire.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$ IVA 0,25 mg/kg vs. groupe contrôle.

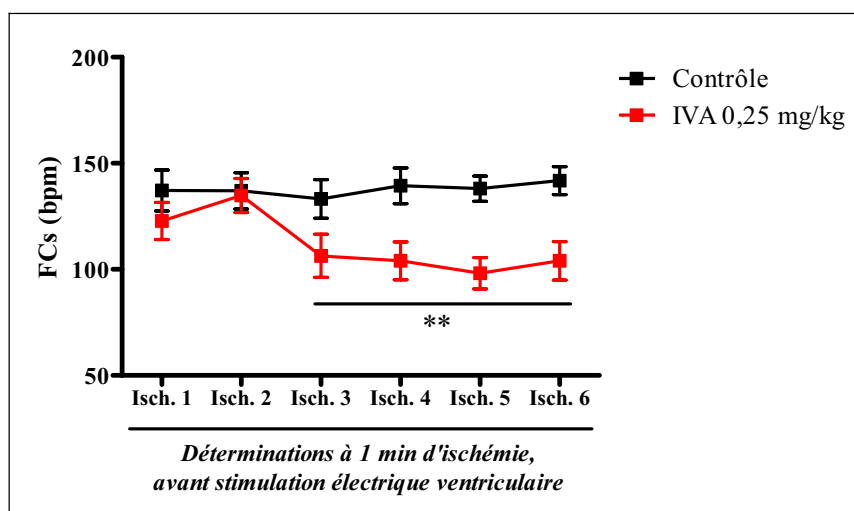


Figure 41 : Fréquence cardiaque sinusale en conditions ischémiques (étude 2, protocole 1).

FCs, fréquence cardiaque sinusale ; Isch., ischémie.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$ IVA vs. contrôle.

Tableau 10 : Impact de l'administration d'IVA à la dose de 0,25 mg/kg sur la durée du potentiel d'action monophasique corrigée en conditions ischémiques (étude 2, protocole 1).

	Baseline		Ivabradine 0,25 mg/kg			
	Isch. 1	Isch. 2	Isch. 3	Isch. 4	Isch. 5	Isch. 6
dMAPc						
Contrôle	11,9 \pm 0,4	11,7 \pm 0,3	11,2 \pm 0,2	11,6 \pm 0,3	12,1 \pm 0,3	12,0 \pm 0,3
IVA 0,25 mg/kg	10,9 \pm 0,3	11,0 \pm 0,4	10,5 \pm 0,7	11,0 \pm 0,6	11,3 \pm 0,2	11,6 \pm 0,4

dMAPc, durée du potentiel d'action monophasique corrigée ; Isch., ischémie. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM.

3.3.1.2 Résultats hémodynamiques

Les résultats rapportés précédemment sur le SEFV et la fréquence cardiaque ne sont associés à aucune modification de la contractilité myocardique objectivée par la mesure du dP/dt_{\max} VG (Figure 42).

Cependant, une baisse de la pression artérielle diastolique et moyenne est observée dans nos conditions ischémiques après administration d'IVA à la dose de 0,25 mg/kg (Tableau 11), conséquence directe de la réduction de la fréquence cardiaque.

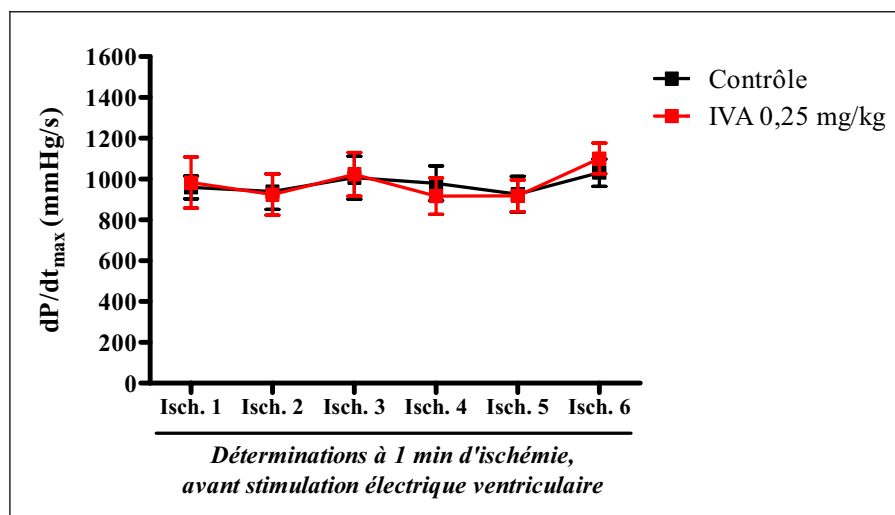


Figure 42 : Contractilité myocardique conditions ischémiques (étude 2, protocole 1).
SEFV, seuil électrique de fibrillation ventriculaire ; VG, ventricule gauche.
Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM.

Tableau 11 : Impact de l'administration d'IVA sur la fonction cardiaque hémodynamique.

	Baseline		Ivabradine 0,25 mg/kg			
	Isch. 1	Isch. 2	Isch. 3	Isch. 4	Isch. 5	Isch. 6
PAs (mmHg)						
Contrôle	84 \pm 5	80 \pm 4	83 \pm 3	82 \pm 4	76 \pm 4	82 \pm 3
IVA 0,25 mg/kg	83 \pm 4	77 \pm 2	68 \pm 6	69 \pm 3	69 \pm 4	72 \pm 3
PAd (mmHg)						
Contrôle	68 \pm 7	64 \pm 3	66 \pm 3	62 \pm 4	59 \pm 5	65 \pm 3
IVA 0,25 mg/kg	61 \pm 5	59 \pm 3	43 \pm 5**	44 \pm 4*	45 \pm 5	47 \pm 4*
PAm (mmHg)						
Contrôle	74 \pm 6	70 \pm 3	73 \pm 3	71 \pm 4	65 \pm 5	72 \pm 3
IVA 0,25 mg/kg	70 \pm 5	66 \pm 3	51 \pm 5**	53 \pm 4*	54 \pm 5	56 \pm 3

Isch., Ischémie ; PAs, pression artérielle systolique ; PAd, pression artérielle diastolique ; PAm, pression artérielle moyenne. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. baseline à la même période.

3.3.1.3 Résultats morphologiques

3.3.1.3.1 Taille de l'ischémie

D'un point de vue macroscopique, l'administration d'IVA dans nos conditions, a réduit la taille de la zone myocardique soumise à l'ischémie (** $p < 0,001$ vs. contrôle) représentée par la perte de l'activité SDH.

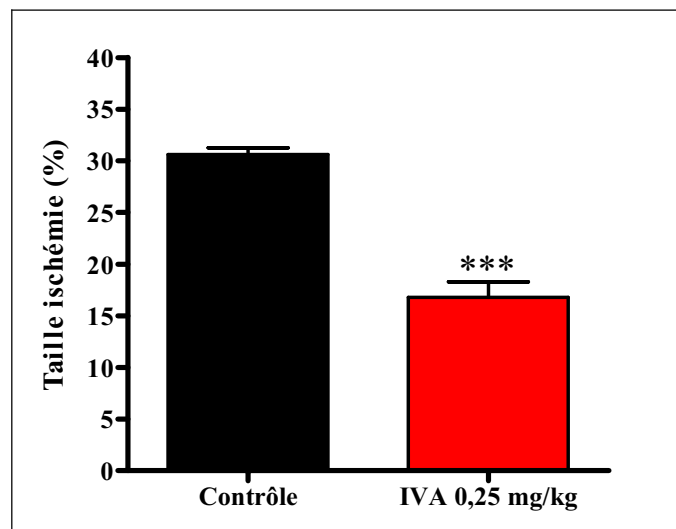


Figure 43 : Taille de la région myocardique hypoxique (étude 2, protocole 1).

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$ IVA 0,25 mg/kg vs. contrôle.

3.3.1.3.2 Ultrastructure cardiomyocytaire

L'analyse en microscopie électronique a révélé que l'administration d'IVA dans nos protocoles d'ischémie/fibrillation ventriculaire et reperfusion a permis une meilleure conservation de l'ultrastructure cardiomyocytaire, objectivée par un développement significativement réduit de lésions tant au niveau nucléaire, membranaire que mitochondriale en comparaison aux animaux contrôles (Tableau 12).

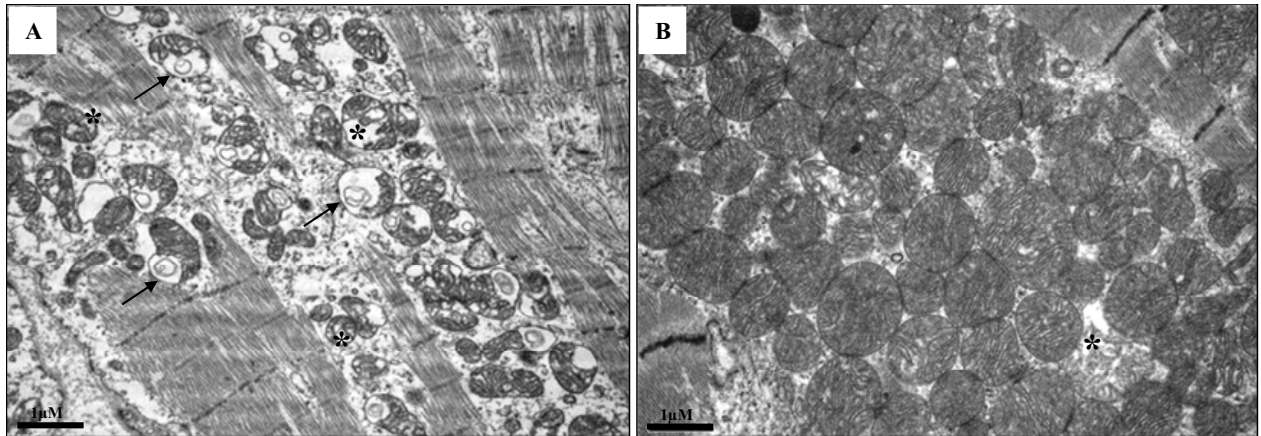
Tableau 12 : Changements ultrastructuraux observés sur des prélèvements myocardiques terminaux, dans la zone soumise à l'ischémie (étude 2, protocole 2).

	Contrôle	IVA 0,25 mg/kg
Mitochondries (Figure 44)		
Déplacement	157,5 (135 ; 167,5)	47,5 (32,5 ; 62,5) **
Gonflement	150,0 (132,5 ; 155)	43,5 (32,5 ; 55) **
Dégranulation	145,0 (125 ; 165)	46,0 (32,5 ; 61,5) **
Rupture des crêtes	132,5 (105 ; 134,5)	35,0 (32 ; 38,5) **
Aspect des noyaux (Figure 45)		
Rupture de la membrane nucléaire	17,0 (15,5 ; 20)	5,0 (4,5 ; 6,5) **
Agglomération irrégulière de la chromatine	15,0 (13 ; 18,5)	4,5 (3,5 ; 6,5) **
Sarcolemme		
Œdème	18,5 (17 ; 20)	5,0 (2,5 ; 5) **
Rupture	14,5 (12 ; 16,5)	6,5 (5 ; 8,5) **
Rupture jonctionnelle	16,5 (15 ; 17,5)	6,0 (4 ; 8,5) **
Œdème interstitiel	2,0 (1,5 ; 3)	1,0 (1 ; 2)
Nécrose cardiomyocytaire	13,5 (11 ; 16)	3,5 (2,5 ; 7) **
Capillaires (Figure 46)		
Noyaux	15,0 (13 ; 18,5)	4,5 (3,5 ; 6,5) **
Épaississement membranaire	14,0 (11,5 ; 14,5)	6,5 (4,5 ; 7) **

Les valeurs sont représentées en médiane (25^{ème} ; 75^{ème} percentile). ** p<0.01 vs. contrôle.

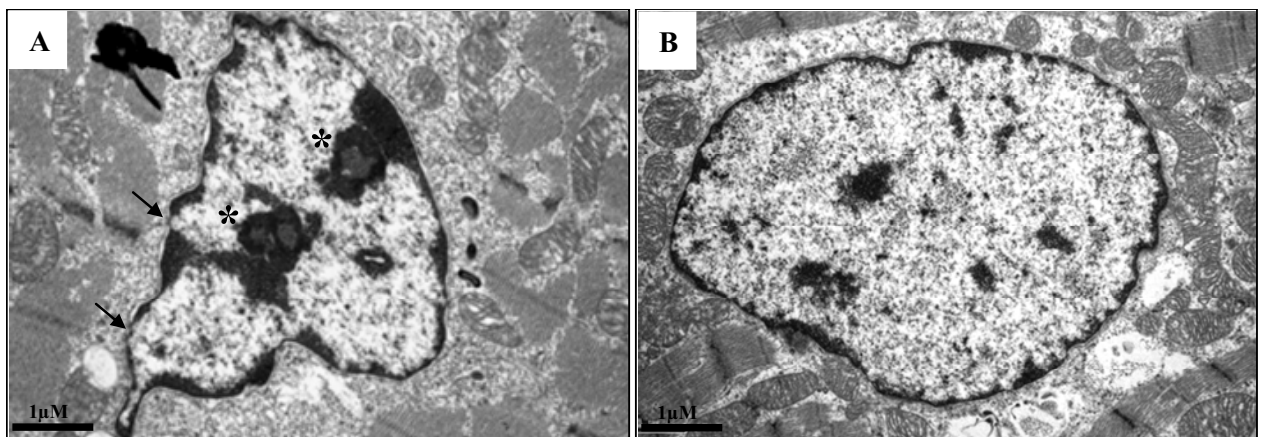
Les Figure 44, Figure 45 et Figure 46 représentent des coupes de myocarde observées en microscopie électronique, et plus précisément les mitochondries, le noyau et les capillaires sanguins.

La Figure 44 illustre des lésions mitochondriales rapportées principalement dans le groupe contrôle. On note en particulier une rupture des crêtes mitochondriales internes (*) et des œdèmes qui apparaissent en plages blanches dans les mitochondries (→).



**Figure 44 : Représentation de lésions mitochondriales dans le groupe contrôle (A) et IVA (B).
* rupture des crêtes ; → gonflement mitochondrial. Coupe transversale x20.000.**

Par ailleurs, il a été rapporté de plus fréquemment des lésions nucléaires dans le groupe contrôle (Tableau 12). La Figure 45 représente un noyau observé dans le groupe contrôle (A) et dans le groupe IVA (B). On note une agglomération de la chromatine (*) ainsi que des ruptures de la membrane nucléaire (→) dans les contrôles en comparaison au groupe IVA où une discrète margination de la chromatine est rapportée.



**Figure 45 : Représentation de lésions nucléaires dans le groupe contrôle (A) et IVA (B).
* agglomération de la chromatine ; → rupture de la membrane nucléaire. Coupe transversale x8.000.**

La Figure 46 représente un capillaire myocardique du groupe contrôle (A) et IVA (B). Sur la photo, on note particulièrement, un épaissement important de la membrane basale (→) observé majoritairement dans le groupe n'ayant pas reçu l'IVA.

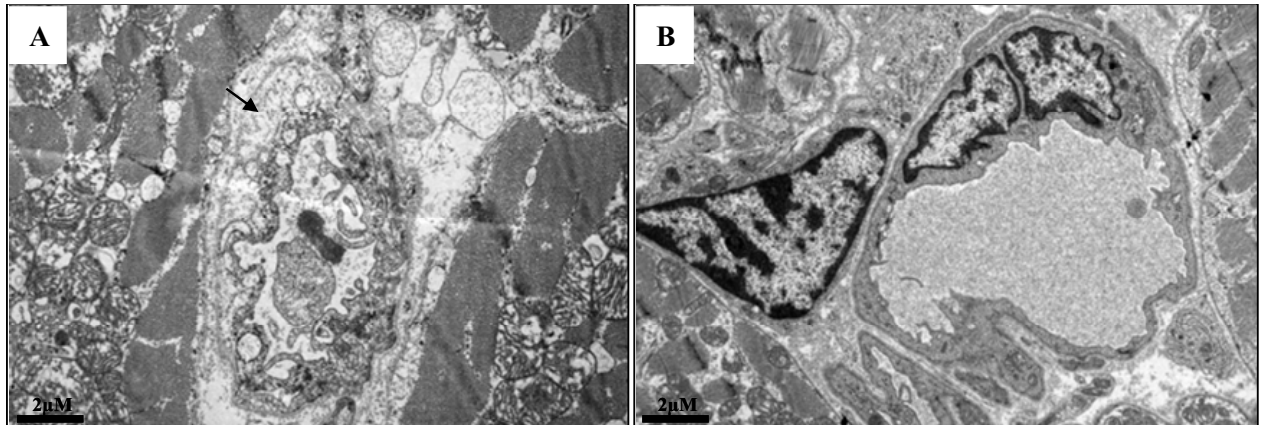


Figure 46 : Représentation de lésions des capillaires myocardiques dans le groupe contrôle (A) et IVA (B).
 → épaissement membranaire. Coupe transversale x8.000.

3.3.1.3.3 Résultats apoptotiques

L'analyse de l'expression de gènes impliqués dans le mécanisme apoptotique (p53, Bcl-2 et caspase 3) ne révèle aucune différence significative entre nos animaux contrôles et ceux ayant reçu de l'IVA.

Tableau 13 : Expression des niveaux de marqueurs apoptotiques mesurés sur des prélèvements terminaux de myocarde au niveau de la zone soumise à l'ischémie (étude 2, protocole 2).

	Contrôle	IVA 0,25 mg/kg
Caspase3	1,89 ± 0,44	3,18 ± 0,92
bcl-2	1,09 ± 0,27	0,61 ± 0,09
p53	2,08 ± 0,52	1,32 ± 0,37

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM.

3.3.2 Impact d'une baisse de la fréquence cardiaque sur la perfusion myocardique à la reperfusion : étude 2, protocole 2

Tout d'abord, l'administration d'IVA à la dose de 0,25 mg/kg ainsi que l'application d'une stimulation ventriculaire ont entraîné une réduction de la fréquence cardiaque similaire, de l'ordre de 30% (** $p < 0,001$ vs. condition 1) (Figure 47).

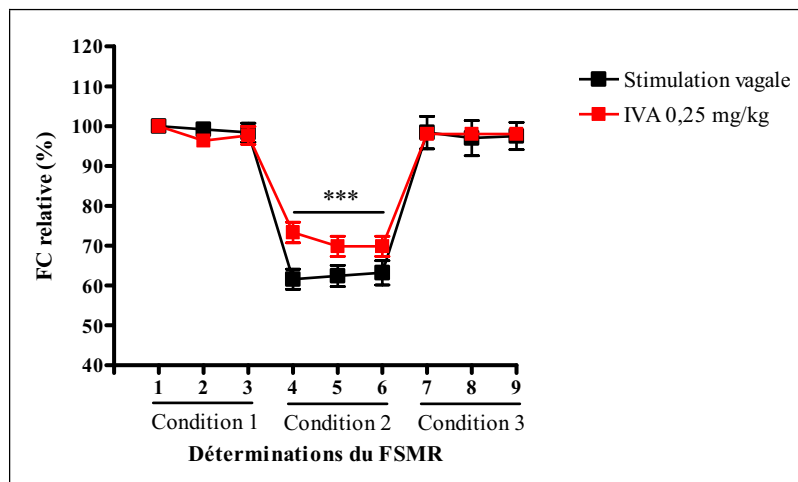


Figure 47 : Évolution relative de la fréquence cardiaque par rapport à la valeur basale dans chaque groupe (étude 2, protocole 2).

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$ vs. condition 1 (baseline).

La Figure 48 représente l'évolution du FSMR normalisé relatif de la région myocardique soumise à l'ischémie par rapport à la région myocardique contrôlée. L'analyse révèle une augmentation du FSMR normalisé relatif à la levée de l'occlusion dans la région myocardique soumise à l'ischémie (déterminations 2, 5 et 8). Cette hyperémie à la reperfusion est augmentée après administration d'IVA (* $p < 0,05$ condition 5 vs. condition 2) et à la limite de la significativité pour les animaux ayant eu une stimulation vagale.

La perfusion normalisée relative revient à la normale lors du retour au niveau initial de la fréquence cardiaque obtenue par la stimulation auriculaire seulement dans le groupe ayant reçu de l'IVA (déterminations 7, 8 et 9), alors que l'hyperémie persiste après l'arrêt de la stimulation vagale.

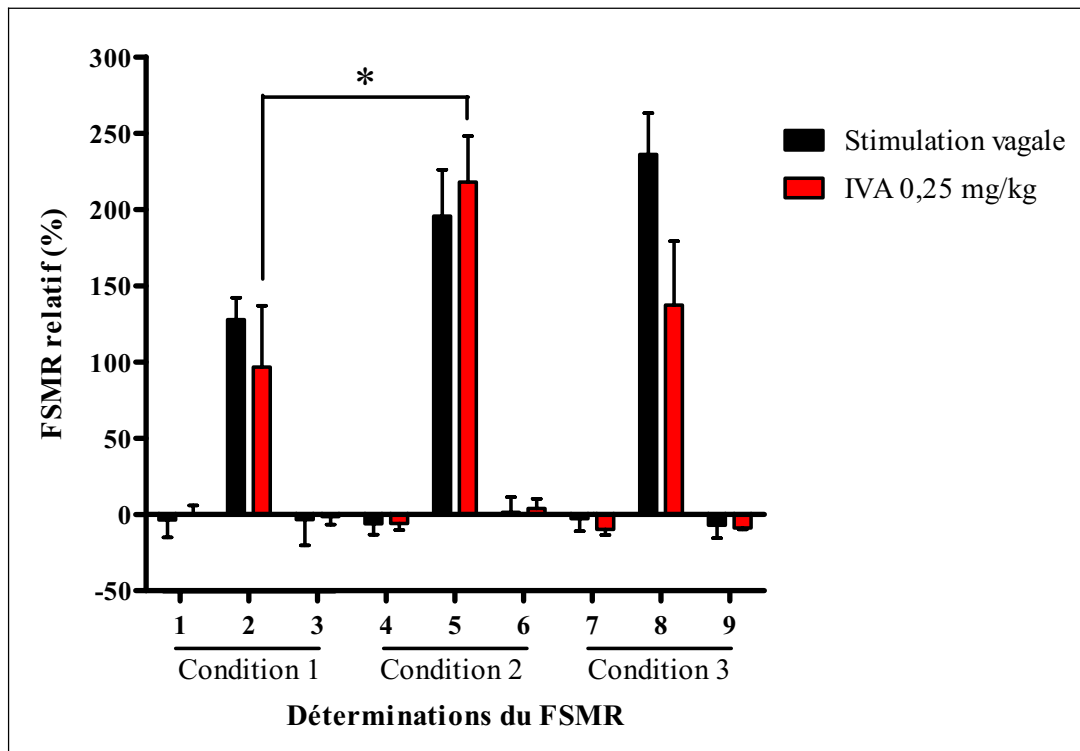


Figure 48 : Évolution du FSMR normalisé relatif dans la région myocardique soumise à l'ischémie rapporté à la région non soumise à l'ischémie (étude 2, protocole 2).

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ condition 1 vs. condition 2.

La Figure 49 représente le FSMR normalisé pour les conditions 1 et 4 plus précisément, en condition basale (détermination 1) et après réduction de la fréquence cardiaque induite par stimulation vagale ou administration d'IVA (détermination 4). Le FSMR est rapporté par battement cardiaque.

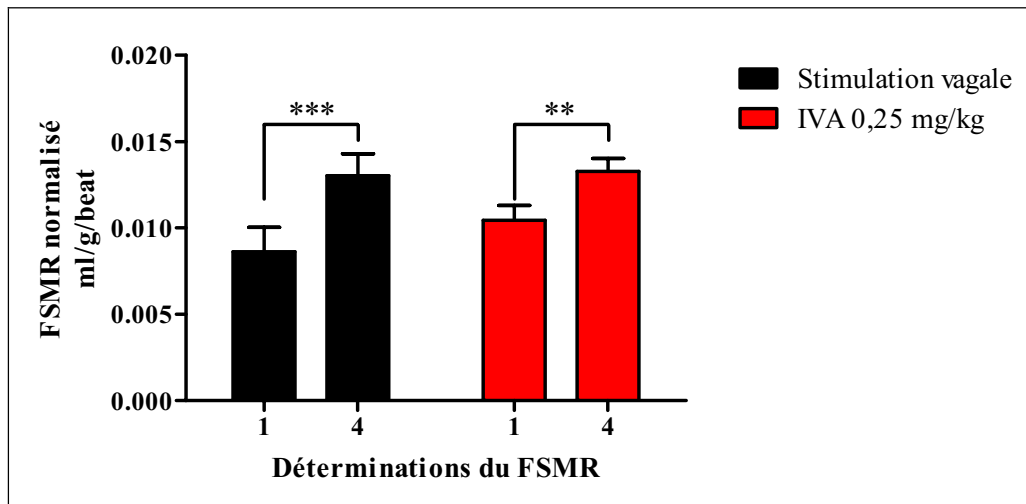


Figure 49 : Effet de la baisse de la fréquence cardiaque sur le FSMR normalisé (étude 2, protocole 2). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ condition 4 vs. condition 1.

La Figure 50 est une représentation du FSMR à fréquence cardiaque spontanée (1) et à la reperfusion myocardique (2). La couleur rouge indique le maximum de perfusion sanguine.

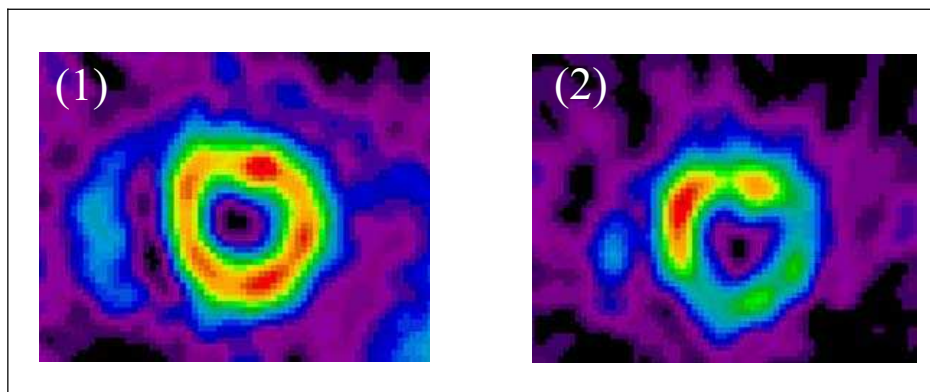


Figure 50 : Tomogrammes représentant le FSMR à fréquence cardiaque spontanée (1) et à la reperfusion sans traitement (2) (étude 2, protocole 2).

3.4 Discussion

Les résultats de la présente étude effectuée sur notre modèle d'ischémie myocardique aiguë, confirment ceux de l'étude précédente. Dans ce travail nous démontrons pour la première fois que l'administration d'IVA in vivo induit une préservation de l'ultrastructure cardiomyocytaire principalement mitochondriale lors d'ischémie / fibrillation ventriculaire, ainsi qu'une amélioration de la perfusion myocardique à la reperfusion. De plus, nous confirmons que la diminution de la fréquence cardiaque induite par l'IVA est associée à une réduction du risque de déclenchement de la fibrillation ventriculaire (augmentation du SEFV) et de la taille de la zone hypoxique. Ces effets ne sont accompagnés d'aucune modification de la dMAPc dont on observe un raccourcissement lors de l'ischémie myocardique, de l'activité apoptotique, de la contractilité myocardique ou de la fonction hémodynamique.

Plusieurs travaux ont démontré qu'une baisse de la fréquence cardiaque obtenue par exemple avec les bêta-bloquants diminuait le risque de déclenchement de la fibrillation ventriculaire [Aupetit, Frassati *et al.*, 1998]. Ainsi, l'ensemble des effets cardioprotecteurs rapportés dans ce travail s'expliquerait principalement par la réduction de la fréquence cardiaque laquelle résulte en une amélioration de la perfusion myocardique qui participe donc à son effet bénéfique [Monnet, Ghaleh *et al.*, 2001; Monnet, Colin *et al.*, 2004; Ferrari, Cargnoni *et al.*, 2006; Vaillant, Timour *et al.*, 2008].

Fréquence cardiaque lésions myocardiques

Nous avons démontré que la réduction de la taille de la zone myocardique hypoxique est corrélée à une baisse de propension à la fibrillation ventriculaire tel que rapporté dans

plusieurs études réalisées dans notre laboratoire [Vaillant, Timour *et al.*, 2008; Vaillant, Tsibiribi *et al.*, 2008] et discuté dans le travail précédent.

D'un point de vue structural, il est bien décrit que des périodes prolongées d'ischémie / reperfusion sont génératrices de lésions au niveau i) membranaire s'accompagnant d'une perte du potentiel de membrane, ii) nucléaire et iii) mitochondriale pouvant mener à l'apparition d'arythmies ou si les lésions mitochondriales sont sévères à la mort cellulaire [Zhang, Liem *et al.*, 2008]. Des études précédentes ont rapportées un effet bénéfique anti-ischémique de l'IVA dans de tels modèles d'ischémie prolongées [Monnet, Ghaleh *et al.*, 2001; Heusch, Skyschally *et al.*, 2008; Ceconi, Cargnoni *et al.*, 2009]. Cependant, peu d'informations ont été rapportées sur l'effet de l'IVA lors d'occlusions coronaires brèves pouvant mener à la fibrillation ventriculaire. Dans le présent travail, nous démontrons que la réduction de la fréquence cardiaque induite par l'IVA s'accompagne d'une moindre dégradation cardiomyocytaire et en particulier d'une conservation de la structure mitochondriale assurant ainsi un maintien de la fourniture d'énergie au myocarde.

Plusieurs études ont démontré un développement de lésions mitochondriales lors d'une tachycardie induite par de l'administration de triiodothyronine [Venditti, Bari *et al.*, 2008] ou par l'application d'un pacing auriculaire associé à une surcharge calcique [Liem, Honda *et al.*, 2007; Zhong, Zhang *et al.*, 2007] qui est responsable de l'ouverture des pores de transition membranaire des mitochondries conduisant à une dysfonction électromécanique ou à la mort cellulaire [Dong, Saikumar *et al.*, 2006; Moshal, Metreveli *et al.*, 2008]. De plus, Couvreur *et al.*, ont récemment rapportés un effet protecteur de la baisse de la fréquence cardiaque après administration d'IVA sur la dysfonction ventriculaire secondaire à l'ischémie myocardique, cet effet était corrélé à une augmentation de l'expression d'une protéine qui régule le couplage excitation-contraction et prévient la fuite

de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique dans les premières minutes de l'ischémie myocardique [Couvreur, Tissier *et al.*, 2010]. Ainsi, la réduction de la fréquence cardiaque pourrait expliquer l'effet protecteur contre l'apparition des lésions mitochondriales secondaires à une tachycardie.

Par ailleurs, la préservation de l'ultrastructure cardiomyocytaire et mitochondriales dans notre étude, pourrait participer au maintien du métabolisme énergétique cardiaque rapportés par Ceconi *et al.* Ces auteurs ont démontré que l'IVA préservait plus particulièrement les réserves d'ATP tissulaire et l'état rédox après ischémie/reperfusion sur un cœur isolé et perfusé de lapin [Ceconi, Cargnoni *et al.*, 2009].

Enfin, les séquences répétées d'ischémie/fibrillation ventriculaire n'ont pas induit d'apoptose, ce qui s'explique probablement par le temps d'ischémie court [Li, Lang *et al.*, 2008; Sodha, Clements *et al.*, 2008].

Fréquence cardiaque et perfusion myocardique

Malgré le nombre limité d'animaux dans le second protocole (dû à la complexité de la procédure de tomographie par émission de positon : TEP), cette étude démontre que d'une baisse de la fréquence cardiaque induite soit par une stimulation vagale, soit par l'administration aigue d'IVA, résulte une augmentation du flux sanguin myocardique régional (FSMR) dans la zone myocardique soumise à l'ischémie à la reperfusion. A notre connaissance, le recours à la TEP dans l'évaluation pré, per et post ischémique du FSMR lors des modifications de la fréquence cardiaque en situation ischémique aigue est une première du genre. D'autres auteurs ont rapporté des résultats similaires lors d'ischémies myocardiques prolongées mais avec des techniques de mesures invasives [Indolfi and Ross, 1993; Monnet, Ghaleh *et al.*, 2001; Monnet, Colin *et al.*, 2004; Heusch, Skyschally *et al.*,

2008]. La perfusion myocardique, assurée par le débit coronaire, s'effectue lors de la diastole et permet un apport adapté en oxygène et substrats nécessaire au fonctionnement cardiaque. Ainsi, l'IVA en réduisant la fréquence cardiaque par augmentation spécifique du temps de diastole, suggèrent la présence d'un microenvironnement cellulaire meilleur. Ces résultats pourraient expliquer en partie l'effet bénéfique sur la structure mitochondriale et la baisse de la propension à la fibrillation ventriculaire observé dans l'étude précédente.

L'équipe de Monnet [Monnet, Ghaleh *et al.*, 2001] précise que la baisse de la fréquence cardiaque induite par l'IVA est associée à une amélioration de flux sanguin subendocardique qui est abolit lors d'une stimulation auriculaire. Par ailleurs, Indolfi *et al.* ont évalué le flux sanguin myocardique régional sous pacing auriculaire à différentes fréquences cardiaques lors d'une ischémie myocardique et ont démontré qu'une baisse de la fréquence cardiaque mène à une amélioration de la perfusion subendocardique sans changement de la perfusion subépicardique [Indolfi, Guth *et al.*, 1991]. Ces auteurs rapportent également qu'une réduction de la fréquence cardiaque est responsable d'une redistribution de la perfusion myocardique.

De plus, un résultat semblable à celui obtenu avec l'IVA a été décrit avec les bêta-bloquants qui était associés à une réduction de l'impact de l'ischémie/reperfusion [Danchin and Aly, 2004]. Cependant, contrairement à l'IVA, l'emploi des bêta-bloquants étaient également associés à une perte de la fonction contractile myocardique. Par ailleurs, l'application d'un pacing auriculaire, pour abolir la baisse de la fréquence cardiaque induite par les bêta-bloquants, s'accompagnait d'une réduction du FSMR [Guth, Heusch *et al.*, 1987] conséquence de l'effet vasoconstricteur alpha-adrénergique [Simon, Ghaleh *et al.*, 1995; Heusch, Baumgart *et al.*, 2000].

Dans notre étude, l'application d'une stimulation auriculaire chez les animaux ayant reçu de l'IVA induit un retour de la fréquence cardiaque et du FSMR à des valeurs dites basales. Ceci renforce l'idée que l'amélioration de la perfusion myocardique s'explique principalement par la réduction de la fréquence cardiaque chez ces animaux. En revanche, l'arrêt de la stimulation vagale n'est pas suivi d'un retour à la normale de la perfusion myocardique régionale, ce qui pourrait s'expliquer par l'effet vasodilatateur persistant du peptide vaso-intestinal libéré lors de la stimulation vagale [Henning and Sawmiller, 2001].

Conclusion

Ainsi, la présente étude démontre que des séquences d'ischémie / fibrillation et reperfusion conduisent à des altérations morphologiques et fonctionnelles cardiaques en partie prévenues par l'IVA. L'hypothèse de l'effet protecteur de la baisse de la fréquence cardiaque dans la préservation ultrastructurale et dans l'amélioration de la perfusion myocardique peut être émise, mais elle n'exclue pas d'autres mécanismes. L'influence éventuelle de la baisse de la fréquence cardiaque sur l'évolution des composés phosphorés riche en énergie lors de l'ischémie myocardique pourrait constituer un autre mécanisme protecteur dans la réduction de la propension à la fibrillation ventriculaire.

4. ÉTUDE 3 : Impact de la fréquence cardiaque sur la propension à la fibrillation ventriculaire : rôle du métabolisme énergétique

4.1 Objectifs

L'étude précédente nous a permis de démontrer l'effet bénéfique de la baisse de la fréquence cardiaque *via* l'IVA sur la structure cardiomyocytaire et plus précisément mitochondriale. Ainsi, les objectifs du présent protocole étaient d'évaluer les effets de cette baisse de la fréquence cardiaque sur le statut énergétique myocardique afin d'expliquer les effets bénéfiques de l'IVA sur la propension à la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique. Les effets de l'IVA ont été comparés à ceux d'un bêta-bloquant couramment utilisé en clinique, le propranolol (PROPRA). Ainsi, dans cette troisième étude, différents paramètres ont été analysés :

- l'évolution des paramètres électrophysiologiques (FCs, dMAPc et TDFV) et hémodynamiques (PAs, PAd, PAm et dp/dt_{\max} VG) comme décrit dans les études précédentes,
- le statut énergétique par mesure des phosphates à haute énergie sur des échantillons myocardiques terminaux prélevés dans la région soumise à l'ischémie,
- l'activité enzymatique cardiaque (phosphorylase, succino-déshydrogénase, ATPases).

Une première partie de cette étude 3 a été destinée à l'évaluation de l'impact de l'administration des produits (saline, IVA et PROPRA) sur un cœur sain normoxique sur les réserves énergétiques et l'activité enzymologique liée aux mécanismes énergétiques myocardiques.

Dans une seconde partie de cette étude 3, nous avons étudié la récupération à une ischémie ayant mené à la fibrillation ventriculaire, après administration des produits (saline, IVA et PROPRA) également d'un point de vue énergétique.

Enfin, dans une dernière partie, deux séquences d'ischémie suivie de fibrillation ventriculaire (avant et après administration des produits : saline et IVA) ont été étudiées.

Les différents traitements (solution saline, IVA et PROPRA) ont été administrés après stabilisation des animaux comme ceci :

- solution saline à un volume identique à celui de l'IVA,
- IVA à la dose de 0,25 mg/kg,
- PROPRA à la dose de $2,48 \pm 0,18$ mg/kg + 10 µg/kg/min ajusté pour chaque animal afin d'obtenir une baisse de la fréquence cardiaque sinusale semblable à celle obtenue avec l'IVA.

4.2 Protocoles d'études

Afin de nous approcher des conditions physiologiques, nous nous sommes intéressés à un autre critère d'évaluation de la propension à la fibrillation ventriculaire : le temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire. Pour cela, l'occlusion a été réalisée jusqu'à obtention de la fibrillation ventriculaire sans application d'une stimulation ventriculaire, et nous avons mesuré le temps avant le déclenchement de la fibrillation ventriculaire.

Dans cette étude 3, différents protocoles ont été réalisés afin de comprendre au mieux le rôle joué par la fréquence cardiaque sur la propension à la fibrillation ventriculaire d'origine et l'implication du métabolisme énergétique.

4.2.1 Impact des traitements sur un cœur sain en normoxie : étude 3, protocole 1

Dans ce protocole 1 (Figure 36), nous nous sommes intéressés à l'impact de chacun des traitements (solution saline, IVA et PROPRA) sur un cœur sain d'un point de vue fonctionnel et énergétique. Ainsi, ces traitements ont été administrés après stabilisation des animaux selon les doses décrites précédemment.

Les paramètres électrophysiologiques et hémodynamiques ont été suivis pendant 30 min après administration de la solution saline (*Groupe 1*) et d'IVA (*Groupe 2*), et 60 min après l'administration de PROPRA (*Groupe 3*). Les différentes durées d'étude ont été fixées selon l'effet stable obtenu pour chaque traitement.

À la fin de l'expérimentation, des échantillons myocardiques ont été prélevés dans la région ischémique pour l'évaluation des réserves énergétiques et des niveaux d'activité enzymatique impliquées dans le processus énergétique.

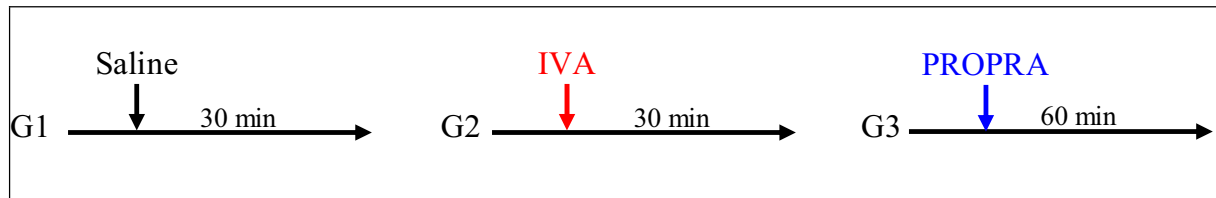


Figure 51 : Impact des traitements sur un cœur sain normoxique (étude 3, protocole 1).

Saline : groupe 1; IVA : groupe 2 et PROPRA : groupe 3.

4.2.2 Impact de l'administration des traitements à la reperfusion d'une ischémie/fibrillation ventriculaire : étude 3, protocole 2

Ici, l'objectif a été d'étudier l'impact de l'administration des molécules après la réalisation d'une ischémie ayant mené à la fibrillation ventriculaire. Pour cela, l'ischémie a été réalisée sous stimulation auriculaire rapide (de période 300 ms, c'est-à-dire 200 bpm) jusqu'à obtention de la fibrillation ventriculaire. La stimulation auriculaire à la période de 300 ms a été choisie afin d'abolir toutes variations inter-individuelles et d'être en situation tachycarde.

Les différents traitements (solution saline : *Groupe 4* ; IVA : *Groupe 5* ; PROPRA : *Groupe 6* ; Figure 37) ont été administrés 15 min après défibrillation (temps nécessaire à la récupération de l'animal) selon les mêmes conditions que précédemment (dose et durée d'enregistrement des paramètres). À la fin de l'expérimentation, des prélèvements myocardiques ont été effectués pour le dosage des réserves énergétiques et l'étude histoenzymologique.

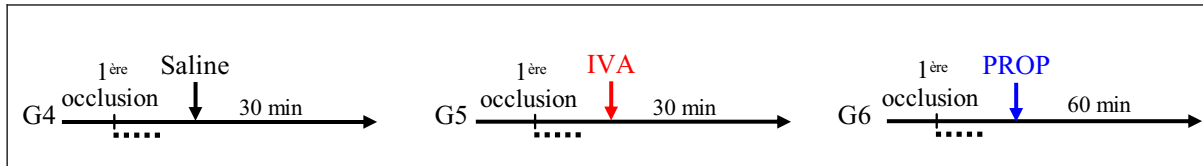


Figure 52 : Impact de l'administration des différents traitements après une séquence d'ischémie - fibrillation ventriculaire (étude 3, protocole 2).

Saline : groupe 4; IVA : groupe 5 et PROPRA : groupe 6.

■ ■ ■ ■ ■ pacing auriculaire

4.2.3 Impact de l'administration des traitements à la reperfusion - rôle de la fréquence cardiaque : étude 3, protocole 3

Plusieurs protocoles ont été effectués afin de tester l'impact de la fréquence cardiaque sur la survenue de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique et sur le statut énergétique myocardique.

4.2.3.1 Étude 3, Protocole 3a

L'impact de l'administration des traitements (solution saline, *Groupe 7*; IVA, *Groupe 8* et PROPRA, *Groupe 9*; aux doses indiquées précédemment) à la reperfusion de la première séquence d'ischémie – fibrillation ventriculaire a été étudié (Figure 38).

La première occlusion a été réalisée comme décrit précédemment (stimulation auriculaire de période 300 ms). Les molécules ont ensuite été administrées 15 min après défibrillation et les paramètres enregistrés pendant 30 à 60 min (selon les produits).

La deuxième ischémie a été réalisée jusqu'à l'apparition de la fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque spontanée. Les échantillons myocardiques destinés à l'étude

énergétique et histoenzymologique ont été prélevés dès l'apparition de la fibrillation ventriculaire.

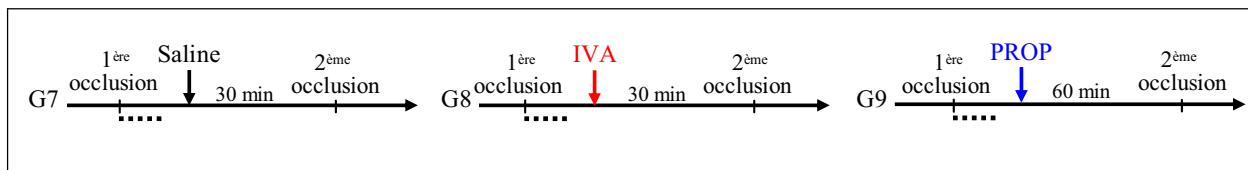


Figure 53 : Impact de l'administration des traitements sur la survenue de la fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque spontanée (étude 3, protocole 3a).

Saline : groupe 7 ; IVA : groupe 8 et PROPRA : groupe 9.

■ ■ ■ ■ ■ pacing auriculaire

4.2.3.2 Étude 3, Protocole 3b

Enfin, dans ce dernier protocole, la baisse de la fréquence cardiaque induite par l'IVA a été abolie à différents moments clé du protocole par l'application d'une stimulation auriculaire rapide (Figure 40) :

- dans le premier groupe, aucune stimulation auriculaire n'a été appliquée après administration d'IVA : *Groupe 8*,
- une stimulation auriculaire rapide a été appliquée uniquement lors de la seconde occlusion coronarienne pour annuler la baisse de la fréquence cardiaque à ce moment précis : *Groupe 10*,
- une stimulation auriculaire a été appliquée dès l'administration d'IVA et pendant les 30 min d'enregistrement des paramètres et a été stoppée au moment d'effectuer la seconde ischémie, afin d'abolir la réduction de la fréquence cardiaque pendant ces 30 min : *Groupe 11*
- dans le dernier groupe, une stimulation auriculaire a été appliquée dès l'injection d'IVA et pendant la seconde occlusion jusqu'à obtention de la fibrillation ventriculaire, ceci afin d'abolir complètement l'effet de la baisse de la fréquence cardiaque : *Groupe 12*.

Les prélèvements ventriculaires destinés à la mesure des composés énergétiques et de l'activité enzymatique liée au métabolisme énergétique ont été effectués au déclenchement de la fibrillation ventriculaire terminale.

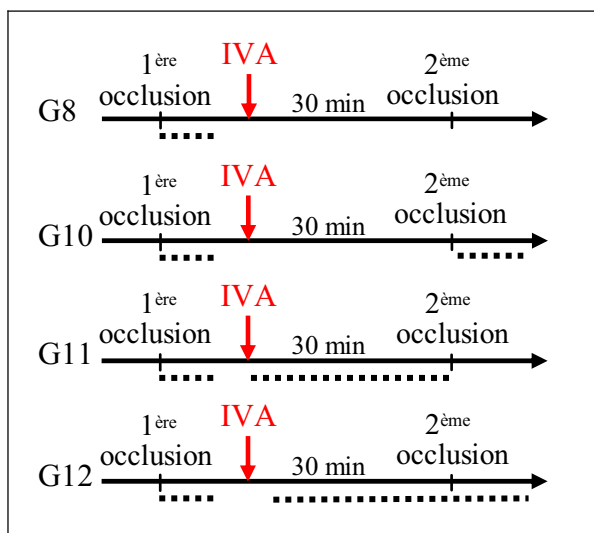


Figure 54 : Impact de l'administration d'IVA sur la survenue de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique, à différentes fréquences cardiaques (étude 3, protocole 3b).

■ ■ ■ ■ ■ pacing auriculaire

4.3 Matériel et méthodes spécifiques de l'étude 3

4.3.1 Évaluation de temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique

Le temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire (TDFV) est la durée au bout de laquelle la fibrillation ventriculaire apparaît après réalisation de l'occlusion coronaire. Dans ce modèle, l'ischémie a été réalisée par occlusion de l'artère interventriculaire antérieure comme décrit précédemment pour le SEFV et selon les conditions expérimentales exposées ci-dessus. Nous nous sommes intéressés au TDFV afin de nous approcher d'avantage en conditions physiologiques en comparaison au SEFV. Après la première fibrillation, l'animal a bénéficié d'une défibrillation par choc électrique externe à 360 Joules. A la fin de l'expérimentation, l'euthanasie, pour chaque animal, était obtenue en ne pratiquant pas de défibrillation après la dernière fibrillation ventriculaire.

4.3.2 Évaluation de l'activité enzymatique myocardique

Le principe de cette technique est basé sur l'introduction d'un substrat spécifique à l'intérieur de la cellule. Si l'enzyme est présente et/ou si une certaine activité enzymatique persiste, la molécule finale est reconstituée et est révélée par une réaction colorée. L'importance de l'activité enzymatique peut-être quantifiée par l'intensité des réactions colorées. Cependant, cette évaluation n'est que subjective, le score ne pouvant s'exprimer que par une échelle semi quantitative de type « activité nulle (0), faible (1), moyenne (2), forte (3) et très forte (4) ».

L'activité enzymatique de trois enzymes qui rendent compte de l'activité métabolique myocardique :

- **la phosphorylase** qui reflète une activité glycolytique accrue. La phosphorylase est la première de la dégradation du glycogène en glucose 6-phosphate (G-6-P). L'activité de cette enzyme est augmentée lors notamment d'ischémie myocardique [King and Opie, 1998].
- **la succino-déshydrogénase (SDH)** qui reflète l'activité du cycle de Krebs. La SDH est une enzyme du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette enzyme assure les réactions d'oxydoréduction et est ainsi considérée comme un bon marqueur de la capacité oxydative mitochondriale [Linderholm, Essen-Gustavsson *et al.*, 1990; Chalmers, Roy *et al.*, 1992]. La production adéquate d'ATP peut être évaluée par l'estimation de l'activité enzymatique SDH.
- **l'ATPase myofibrillaire Ca^{2+} -dépendante** qui reflète la consommation d'énergie. Elle permet de maintenir la consommation d'énergie via la transformation d'ADP en ATP au niveau de la membrane myofibrillaire. L'ATPase transforme l'ATP en ADP en présence d' O_2 (métabolisme aérobie) alors qu'elle transforme l'ADP en ATP en cas d'ischémie myocardique (métabolisme anaérobie). Une diminution de cette activité a été rapporté lors d'insuffisance cardiaque, d'infarctus du myocarde [Wang, Liu *et al.*, 2002; Wang, Guo *et al.*, 2004] ou encore de cardiomyopathies diabétiques [Pierce and Dhalla, 1985]. Une réduction de la force de contraction cardiaque a également été associée à une baisse de l'activité ATPase [Maddika, Elimban *et al.*, 2009].

Les échantillons myocardiques prélevés dans la zone ischémique à la fin de chaque expérimentation, ont été immédiatement congelés dans l'isopentane placé dans l'azote liquide (-80°C). Cette méthode a permis une congélation quasi instantanée, sans formation de bulle d'air autour du fragment, afin de préserver au mieux l'activité enzymatique. Ensuite, ces échantillons ont été coupés au cryotome Leica CM 3050S d'épaisseur de 10µm. Après la réaction histoenzymologique les coupes ont fait l'objet d'une double lecture en aveugle par le Dr. Alain Tabib (laboratoire de médecine légale, Faculté de médecine, Lyon Grange-Blanche) et M. Nicolas Gadot (chargé d'études, ANIPATH - Centre d'Histopathologie du Petit Animal de laboratoire, Faculté de Médecine RTH Laënnec) à l'aide d'un Microscope Nikon eclips E 400, muni d'une caméra Sony DXC 390P et d'un système d'imagerie Alphylys®.

4.3.2.1 Évaluation de l'activité phosphorylase

4.3.2.1.1 Technique

Les coupes ont été incubées pendant 1 h à 37°C dans une solution comportant 10 ml de tampon acétate de Na (pH 5,5), 10 mg d'adénosine 5' monophosphate, 50 mg de glucose-1-phosphate, Glycogène III, 4 ml d'éthanol 100°, 10 ml d'eau distillée. Après incubation les coupes ont été immergées pendant 10 min dans du Lugol fort à 1%. Enfin, elles ont été montées au glycergel.

4.3.2.1.2 Résultats recherchés

L'apparition de granulations noires/jaunes (de formazan couvrant les mitochondries) en quantité proportionnelle à l'activité phosphorylase représente l'activité enzymatique recherchée. La Figure 55 représente une activité phosphorylase considérée comme importante

(A), moyenne (B) et faible voire nulle avec des aires entières sont dépourvues de granulation (C). Une activité considérée comme faible, voire nulle, signifie que le cœur travaille donc essentiellement en aérobie. À l'inverse, une activité phosphorylase importante signifie que le cœur travaille principalement en conditions anaérobiques.

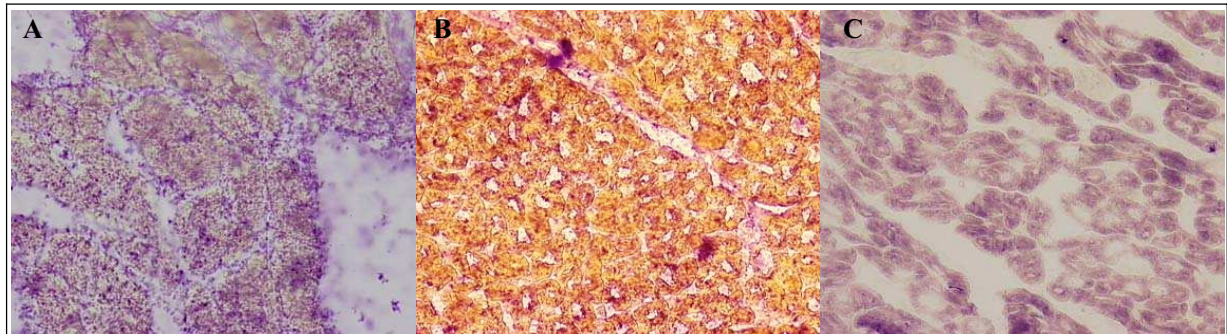


Figure 55 : Activité phosphorylase appréciée par la condensation des granulations qui coiffent les mitochondries.

Coupes transversales x200.

4.3.2.2 Évaluation de l'activité succino-déshydrogénase

4.3.2.2.1 Technique

Les coupes ont été séchées pendant 20 min à température ambiante. Elles ont ensuite été incubées pendant 2h à 37°C dans une solution comportant du tampon phosphate (0,2M, pH 7.4), de l'acide succinique (0,2M), du nitro-bleu de tétrazolium (20mg/ml). Par la suite les coupes ont été rincées avec une solution de NaCl 9%, et post-fixées dans une du formol neutre pendant 10 min. Les coupes ont été lavées avec de l'alcool 15° (5 min) puis rincées à l'eau distillée. Enfin, elles ont été montées au glycergel.

4.3.2.2.2 Résultats recherchés

La Figure 56 représente une activité SDH considérée comme importante (A), moyenne (B) et faible voire nulle avec des aires entières sont dépourvues de granulation (C). Une

activité considérée comme faible, voire nulle, signifie atteste d'une capacité oxydative mitochondriale réduite.

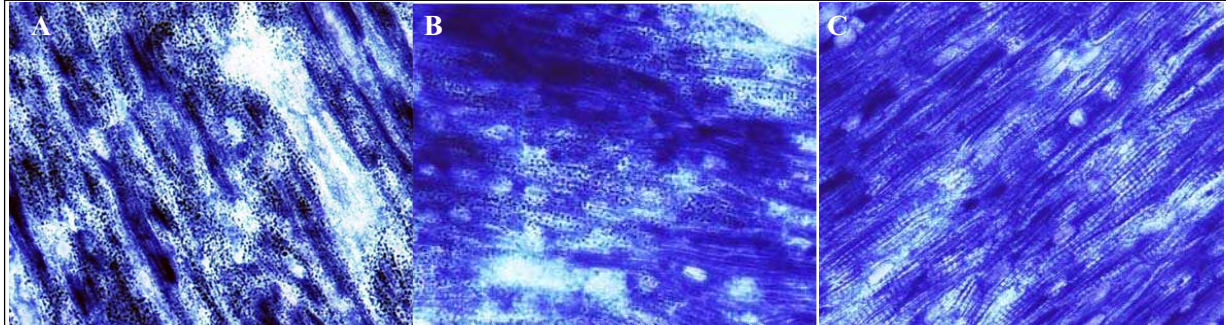


Figure 56 : Activité SDH appréciée par la condensation des granulations bleues qui coiffent les mitochondries.

Coupes longitudinales x200.

4.3.2.3 Évaluation de l'activité ATPase myofibrillaire Ca^{2+} -dépendante

4.3.2.3.1 Technique

L'évaluation de l'activité ATPase a été réalisée d'après l'étude de Padykula [Padykula and Herman, 1955]. Les coupes ont été séchées à température ambiante. Une pré-incubation a été effectuée dans une solution comportant du chlorure de calcium (10 ml à 0,18 M), du barbital sodique (20 ml à 0,1 M) et de l'eau distillée (70 ml). Les coupes ont ensuite été incubées pendant 20 min à 37°C dans une solution comportant de l'ATP (150 mg), du CaCl_2 (10 ml) ; du barbital sodique (20 ml) et de l'eau distillée (70 ml). Par la suite les coupes ont été rincées 3 fois 10 min avec de l'eau distillée, puis immergées dans une solution de chlorure de cobalt à 2%. Les coupes ont ensuite été rincées 3 fois 1 min à l'eau distillée suivi d'un passage dans une solution de sulfure d'ammonium à 1% pendant 20 secondes. Un dernier rinçage a été effectué à l'eau distillée 3 fois 1 min suivie d'une déshydratation par passage dans l'alcool 95° puis 100°. Enfin le montage des lames a été fait.

4.3.2.3.2 Résultats recherchés

La Figure 57 représente une activité ATPase considérée comme importante (A), moyenne (B) et faible voire nulle avec des aires entières sont dépourvues de granulation (C).

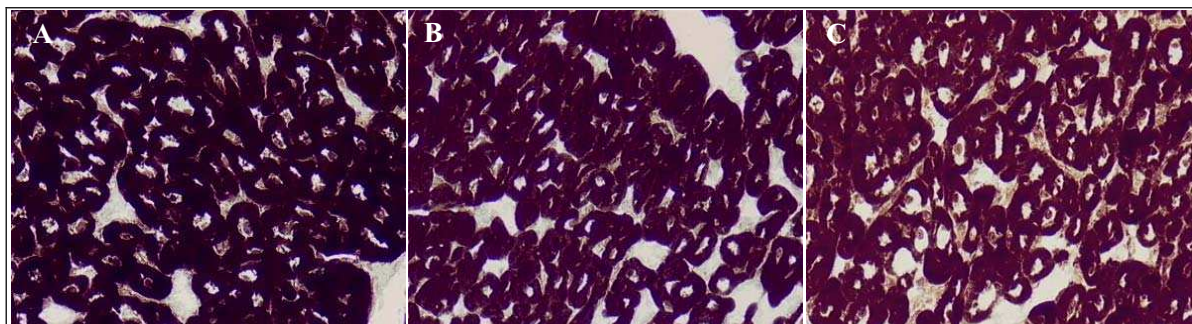


Figure 57 : Activité ATPase myofibrillaire Ca^{2+} -dépendante appréciée par la condensation des granulations bleues qui coiffent les mitochondries.
Coupes transversales x200

4.3.3 Évaluation des concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie

Les concentrations en composés énergétiques ont été déterminées par la technique enzymatique et par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore 31 (^{31}P). Ces dosages ont été réalisés par le laboratoire du Dr. Baverel (Métabolomique et Maladies métaboliques, INSERM U820, Lyon, France).

4.3.3.1 Prélèvement des échantillons myocardiques

A la fin des différents protocoles, dès déclenchement de la dernière fibrillation ou l'euthanasie de l'animal dans les groupes où une fibrillation terminale n'était pas attendue, plusieurs échantillons de cœur ont été prélevés successivement. Ces prélèvements ont été effectués très rapidement (en moins de 20 secondes) par carottage. Afin d'obtenir une

congélation instantanée, aussitôt après le prélèvement, chaque échantillon a été plongé dans l'isopentane contenu dans une coupelle, elle-même refroidie par de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

4.3.3.2 Traitement des échantillons

Les échantillons ont été dissous dans 2 ml de 4% d'acide perchlorique (HClO₄) par gramme de poids frais afin de faciliter la dissolution des échantillons. Ils ont ensuite été broyés par ultra-turrax et centrifugés pour séparer le culot du surnageant perchlorique qui a été alors neutralisé par du 20% (poids/volume) d'hydroxyde de potassium. 1/5 du volume du surnageant neutralisé a été conservé pour le dosage de l'ATP et de la PCr par méthodes enzymatiques, les 4/5 restant ont été lyophilisés afin d'être utilisés pour la mesure des dérivés phosphorés par spectroscopie RMN au ³¹P. Le lyophilisat a été repris dans 550 µl d'un tampon (pH 7,38 : imidazole 100 mM ; oxyde de deutérium 40%, azide de sodium 0,02M). Après centrifugation pour éliminer le précipité de sels, le surnageant de chaque tube a été placé dans un tube RMN de 5 mm de diamètre.

4.3.3.3 Mesure des phosphates à haute énergie par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire

Chaque tube de RMN a été placé dans le spectromètre RMN. Les données ont été enregistrées avec un appareil Bruker AM-500WB en utilisant une sonde pour tubes de 5 mm de diamètre, thermostatée à 20 ± 0,5°C. Le programme de mesure du ³¹P a permis d'obtenir un spectre RMN composé d'une succession de pics de telle sorte que chaque atome de phosphore était représenté par un pic. La position sur le spectre dépendait de la nature de la molécule à laquelle il appartenait et de sa position à l'intérieur de la molécule. L'attribution

des pics (correspondance entre pic et atome de phosphore concerné) a été effectuée en utilisant les données de la littérature complétées par une vérification consistant à ajouter le métabolite supposé et à rechercher si la surface du pic concerné augmentait, ce qui confirmait alors l'attribution initiale.

La surface de chacun des pics est proportionnelle à la quantité des noyaux concernés. La spectroscopie RMN donne une surface (identique aux erreurs expérimentales près) pour chacun des atomes de phosphore de l'ATP qui, de plus, a été vérifiée par dosage enzymatique : nous pouvons ainsi établir un facteur de conversion valable pour chacun des pics de phosphore qui permet de traduire leur surface en μmoles . Une vérification de la qualité de la mesure RMN a été obtenue en comparant les quantités de PCr obtenues par dosage enzymatique et par spectroscopie RMN.

Ainsi, la spectroscopie RMN du ^{31}P a permis calculer la concentration myocardique des composés phosphorés étudiés (l'ATP, l'ADP, l'AMP, la PCr et le Pi) permettant ainsi l'évaluation d'un bilan énergétique myocardique.

Les rapports PCr/ATP et ATP/ADP ont été calculés à partir des concentrations déterminées en RMN. Le rapport PCr/ATP s'est avéré être un bon index du métabolisme énergétique cardiaque et une valeur inférieure à 1,6 a été rapportée comme indice prédictif de mortalité cardiovasculaire chez les patients présentant une cardiomyopathie dilatée [Scolletta and Biagioli, 2010]. Le rapport ATP/ADP est indicateur de l'état de phosphorylation myocardique et de la demande en énergie [Schwartz, Reimer *et al.*, 2007]. Il a été rapporté qu'une ischémie même modérée était corrélée à une diminution de ce rapport menant à une augmentation de la glycolyse [Salem, Stanley *et al.*, 2004].

4.3.4 Analyse statistique

L'ensemble des paramètres électrophysiologiques a été analysé par une ANOVA à deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni lorsque l'analyse de variance était significative, afin d'étudier l'effet temps et traitement.

Les paramètres histoenzymatiques ont été mesurés de façon semi-quantitative. Ainsi, une analyse non paramétrique a été réalisée (test t non pairé de Mann-Whitney ou une analyse de variance Kruskal-Wallis selon le nombre de groupes étudiés).

Les concentrations en phosphates à hautes énergie ont été analysées soit par une ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Bonferroni, soit par un test t non pairé selon le nombre de groupes étudié.

4.4 Résultats

4.4.1 Impact de l'administration des traitements sur un cœur sain en normoxie : étude 3, protocole 1

4.4.1.1 Évaluation des paramètres physiologiques

4.4.1.1.1 Paramètres électrophysiologiques

Ces groupes avaient pour objectif d'évaluer l'effet de l'administration des traitements sur un cœur sain en conditions normoxiques. L'analyse montre que l'administration d'IVA (0,25 mg/kg, G2) et de PROPRA (2,48 ± 0,18 mg/kg + 10 µg/kg/min, G3) a induit une réduction significative (***) p<0,001 IVA ; * p<0,05 PROPRA) de la fréquence cardiaque en comparaison au groupe contrôle (G1) (Figure 58), sans modification de la durée du potentiel d'action monophasique corrigée (Tableau 14).

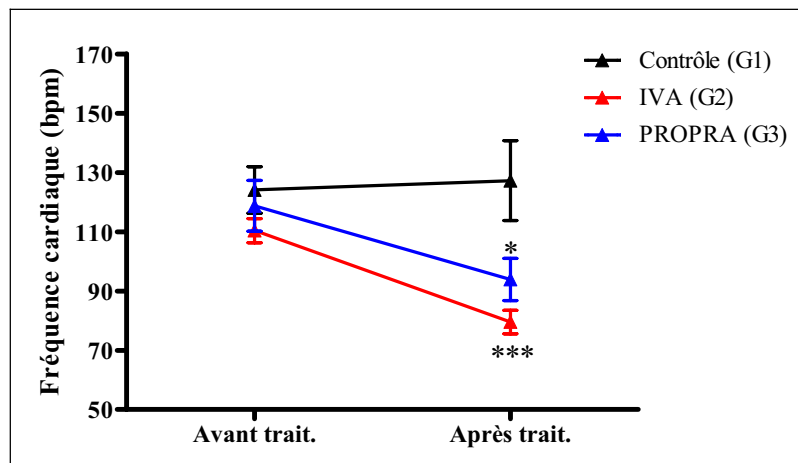


Figure 58 : Impact de l'administration des traitements sur la fréquence cardiaque sur un cœur sain en normoxique.

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM. * p<0,05 et *** p<0,001 vs. contrôle.

Tableau 14 : Impact de l'administration des traitements sur la durée du potentiel d'action monophasique corrigée, sur un cœur sain en conditions normoxiques.

	Avant traitement	Après traitement
dMAPc		
Contrôle (G1)	12,0 ± 0,6	12,3 ± 0,6
IVA (G2)	11,2 ± 0,5	11,0 ± 0,6
PROPRA (G3)	11,4 ± 0,7	12,0 ± 0,6

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

4.4.1.1.2 Paramètres hémodynamiques

L'administration d'IVA ou de PROPRA n'a induit aucune modification de la contractilité myocardique (Figure 59). Cependant le PROPRA contrairement à l'IVA, est responsable d'une augmentation significative des pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne (***) $p < 0,001$ vs. contrôle) (Tableau 15) dans nos conditions normoxiques.

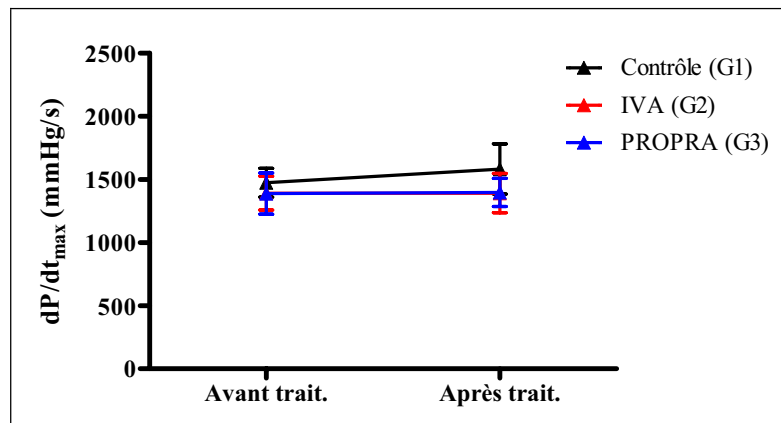


Figure 59 : Impact de l'administration des traitements sur la contractilité myocardique sur un cœur sain en normoxie.

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

Tableau 15 : Impact de l'administration des traitements sur la fonction hémodynamique, sur un cœur sain en conditions normoxiques

	Avant traitement	Après traitement
PAs (mmHg)		
Contrôle (G1)	93 ± 2	95 ± 6
IVA (G2)	96 ± 3	103 ± 2
PROPRA (G3)	105 ± 4	120 ± 6***
PAd (mmHg)		
Contrôle (G1)	68 ± 3	73 ± 6
IVA (G2)	64 ± 4	63 ± 3
PROPRA (G3)	79 ± 5	91 ± 6*
PAm (mmHg)		
Contrôle (G1)	79 ± 3	83 ± 6
IVA (G2)	78 ± 4	81 ± 3
PROPRA (G3)	91 ± 4	104 ± 6

PAs, pression artérielle systolique ; PAd, pression artérielle diastolique ; PAm, pression artérielle moyenne. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

* p<0,05 et *** p<0,001 vs. contrôle (G1).

4.4.1.2 Évaluation des paramètres enzymatiques

L'analyse de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique que nous avons étudiées (SDH, ATPase et phosphorylase) ne révèle aucune différence significative entre les animaux contrôles et ceux ayant reçu de l'IVA ou du PROPRA.

Tableau 16 : Impact de l'administration des traitements sur l'activité enzymatique myocardique d'un cœur sain, en conditions normoxiques.

	Contrôle (G1)	IVA (G2)	PROPRA (G3)
SDH	1 (1 ; 1)	3 (3 ; 3)	3 (2 ; 3)
ATPase	1 (1 ; 1)	3 (3 ; 3)	3 (2 ; 3)
Phosphorylase	1 (1 ; 2)	2 (2 ; 3)	2,5 (1 ; 3)

Les valeurs sont représentées en médiane (25ème ; 75ème percentile).

4.4.1.3 Évaluation des paramètres énergétiques

Dans ces conditions normoxiques, seul le PROPRA accuse une chute significative des concentrations en PCr (** p<0,01 vs. contrôle) associée à une baisse du rapport PCr/ATP (* p<0,05 vs. contrôle) et une augmentation du rapport Pi/PCr (** p<0,01 vs. contrôle). Par ailleurs, le PROPRA induit une chute du rapport ATP/ADP (* p<0,05) en comparaison au groupe contrôle. Malgré une tendance à la baisse des concentrations en PCr après administration d'IVA, aucune modification significative n'est rapportée (Tableau 17 et Figure 60).

Tableau 17 : Impact de l'administration des traitements sur les concentrations en phosphates à haute énergie myocardiques d'un cœur sain, en conditions normoxiques.

Phosphates à haute énergie	Contrôle (G1)	IVA (G2)	PROPRA (G3)
ATP (μmol/gww)	3,69 ± 0,13	3,2 ± 0,15	2,45 ± 0,31*
ADP (μmol/gww)	0,54 ± 0,09	0,59 ± 0,06	0,57 ± 0,05
AMP (μmol/gww)	0,22 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,15 ± 0,03
PCr (μmol/gww)	2,69 ± 0,44	1,83 ± 0,29	1,02 ± 0,19**
Pi (μmol/gww)	7,1 ± 0,60	6,3 ± 0,60	6,88 ± 1,02
PCr/ATP	0,83 ± 0,13	0,57 ± 0,08	0,41 ± 0,04*
Pi/PCr	3,68 ± 0,90	3,93 ± 0,67	8,05 ± 1,35**,#
ATP/ADP	6,44 ± 0,70	5,7 ± 0,57	4,24 ± 0,40*

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

* p<0,05 et ** p<0,01 vs. contrôle (G1) ; # p<0,05 vs. IVA (G2).

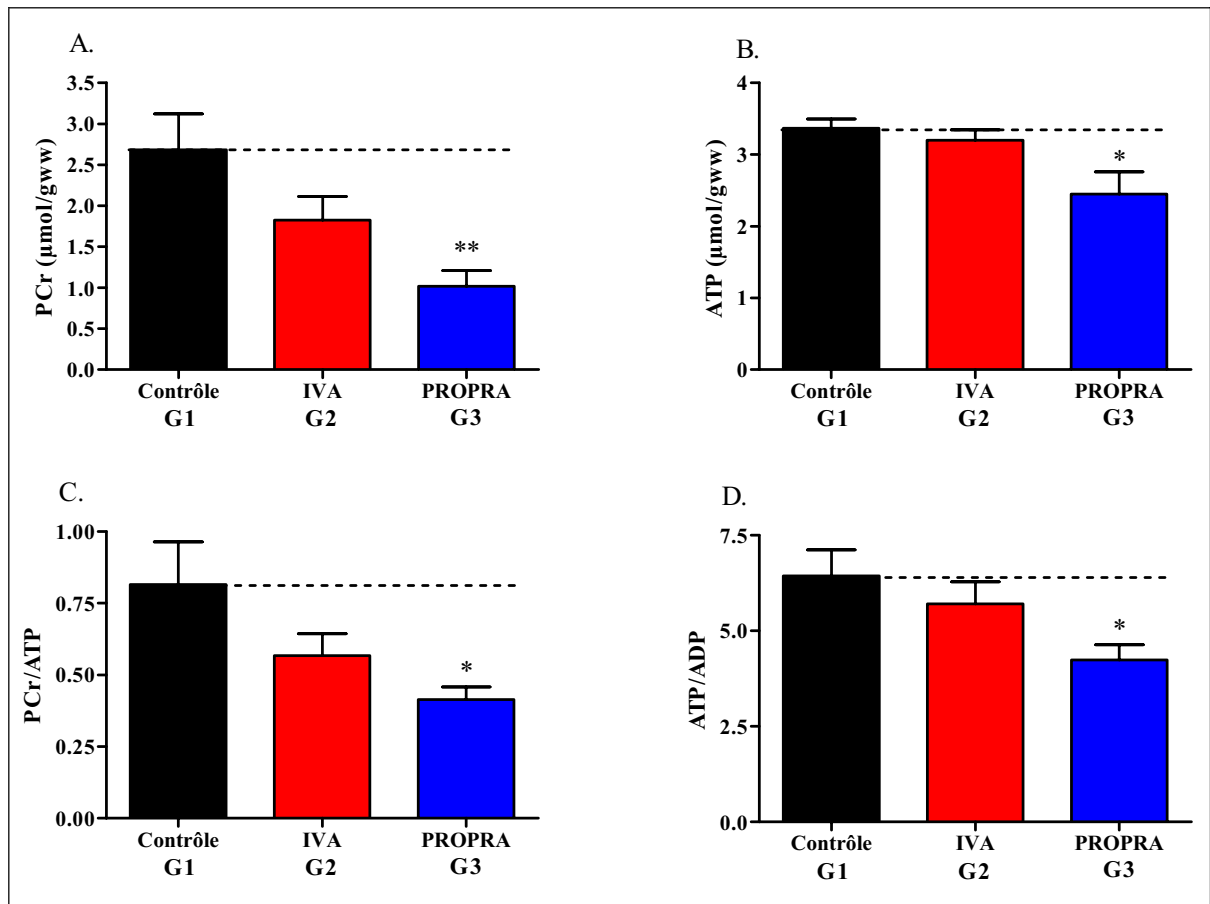


Figure 60 : Impact de l'administration des traitements sur les concentrations en PCr (A), les rapports ATP (B), PCr/ATP (C) et ATP/ADP (D) d'un cœur sain, en conditions normoxiques.

Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ vs. contrôle (G1).

4.4.2 Impact de l'administration des traitements à la reperfusion d'une ischémie / fibrillation ventriculaire : étude 3, protocole 2

4.4.2.1 Évaluation des paramètres physiologiques

4.4.2.1.1 Paramètres électrophysiologiques

L'administration d'IVA et de PROPRA a entraîné une réduction de la fréquence cardiaque semblable de l'ordre de 25% (\$\$\$ $p < 0,001$ après traitement vs. avant traitement) (Figure 61), sans modification de la durée du potentiel d'action monophasique corrigée (Tableau 18).

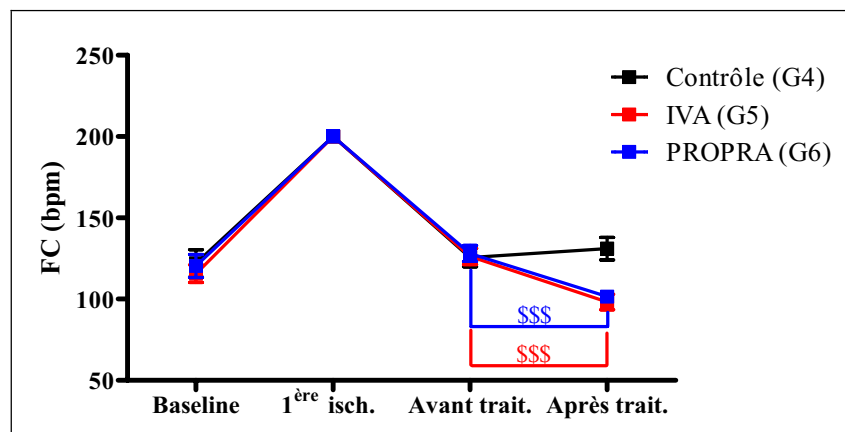


Figure 61 : Impact de l'administration des traitements sur la fréquence cardiaque après une séquence d'ischémie/fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque rapide.

Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM. \$\$\$ $p < 0,001$ après traitement vs. avant traitement.

Tableau 18 : Impact de l'administration des traitements sur la durée du potentiel d'action monophasique corrigée après une séquence d'ischémie/fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque rapide.

	Baseline	1 ^{ère} ischémie	Avant traitement	Après traitement
dMAPc				
Contrôle (G4)	12,1 ± 0,5	11,7 ± 0,5	11,8 ± 0,3	11,8 ± 0,5
IVA (G5)	12,2 ± 0,4	11,7 ± 0,6	12,5 ± 0,4	12,2 ± 0,5
PROPRA (G6)	11,7 ± 0,3	11,5 ± 0,3	12,3 ± 0,3	12,5 ± 0,6

dMAPc, durée du potentiel d'action monophasique corrigée. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM.

4.4.2.1.2 Paramètres hémodynamiques

Aucune différence significative n'est rapportée entre les différents groupes et dans le temps, malgré une tendance à la baisse de la dp/dt_{max} après administration du PROPRA (Figure 62). Par ailleurs, l'administration de PROPRA est responsable d'une augmentation significative des pressions artérielles. (Tableau 19) La dose de PROPRA a été ajustée pour chaque animal afin d'obtenir une réduction de la fréquence cardiaque semblable à celle obtenue avec l'IVA. La dose de PROPRA administrée pourrait donc être trop élevée et expliquer cette augmentation des pressions artérielles.

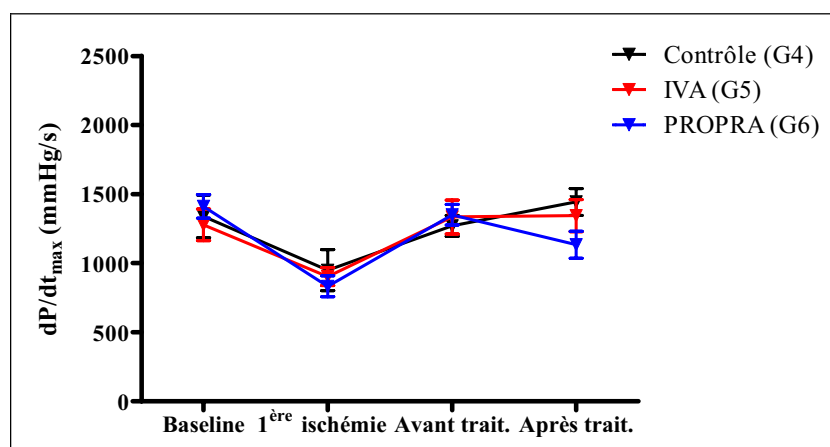


Figure 62 : Impact de l'administration des traitements sur la contractilité myocardique après une séquence d'ischémie/fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque rapide.

Tableau 19 : Impact de l'administration des traitements sur la fonction hémodynamique après une séquence d'ischémie/fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque rapide.

	Baseline	1 ^{ère} ischémie	Avant traitement	Après traitement
PAs (mmHg)				
Contrôle (G4)	98 ± 4	75 ± 6	91 ± 3	92 ± 3
IVA (G5)	96 ± 4	76 ± 3	96 ± 3	95 ± 5
PROPRA (G6)	100 ± 6	74 ± 6	94 ± 5	112 ± 4§§
PAd (mmHg)				
Contrôle (G4)	74 ± 4	52 ± 5	68 ± 4	69 ± 2
IVA (G5)	69 ± 4	49 ± 3	70 ± 3	65 ± 4
PROPRA (G6)	73 ± 5	57 ± 6	72 ± 4	90 ± 3§§§
PAm (mmHg)				
Contrôle (G4)	86 ± 4	60 ± 5	78 ± 4	79 ± 2
IVA (G5)	81 ± 4	58 ± 3	82 ± 3	78 ± 5
PROPRA (G6)	84 ± 6	64 ± 6	82 ± 5	101 3§§

PAs, pression artérielle systolique ; PAd, pression artérielle diastolique ; PAm, pression artérielle moyenne. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

§§ p<0,01 vs. avant traitement ; §§§ p<0,001 vs. avant traitement.

4.4.2.2 Évaluation des paramètres enzymatiques

Aucune différence significative n'est rapportée en ce qui concerne l'activité enzymatique myocardiques entre les différents traitements administrés (Tableau 20).

Tableau 20 : Impact de l'administration des traitements sur les fonctions enzymatiques myocardiques après une séquence d'ischémie/fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque rapide.

	Contrôle (G4)	IVA (G5)	PROPRA (G6)
SDH	0 (0 ; 0)	2 (2 ; 2)	1 (1 ; 1)
ATPase	0,5 (0 ; 1)	3 (2,5 ; 3)	1 (0,5 ; 1,5)
Phosphorylase	1 (0 ; 1)	4 (3,5 ; 4)	2 (2 ; 3)

Les valeurs sont représentées en médiane (25^{ème} ; 75^{ème} percentile).

4.4.2.3 Évaluation des paramètres énergétiques

L'évaluation des concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie n'a révélée aucune différence significative entre les différents traitements administrés (solution saline, IVA ou PROPRA) (Tableau 21). Les animaux semblent donc récupérer indépendamment du traitement administré, de la première séquence d'ischémie/fibrillation ventriculaire réalisée à fréquence rapide (200 bpm).

Tableau 21 : Impact de l'administration des traitements sur les concentrations en phosphates à haute énergie myocardiques après une séquence d'ischémie/fibrillation ventriculaire.

	Contrôle (G4)	IVA (G5)	PROPRA (G6)
ATP ($\mu\text{mol/gww}$)	2,99 \pm 0,23	3,41 \pm 0,20	3,06 \pm 0,31
ADP ($\mu\text{mol/gww}$)	0,59 \pm 0,08	0,56 \pm 0,08	0,51 \pm 0,05
AMP ($\mu\text{mol/gww}$)	0,13 \pm 0,05	0,11 \pm 0,04	0,08 \pm 0,03
PCr ($\mu\text{mol/gww}$)	1,98 \pm 0,37	2,44 \pm 0,37	2,48 \pm 0,19
Pi ($\mu\text{mol/gww}$)	7,47 \pm 0,81	7,29 \pm 0,98	6,56 \pm 1,02
PCr/ATP	0,68 \pm 0,13	0,72 \pm 0,10	0,82 \pm 0,04
Pi/PCr	4,41 \pm 0,79	3,44 \pm 0,58	3,07 \pm 1,35
ATP/ADP	5,23 \pm 0,43	6,47 \pm 0,49	6,24 \pm 0,47

Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM.

4.4.3 Impact de l'administration des traitements à la reperfusion - rôle de la fréquence cardiaque : étude 3, protocole 3

Plusieurs protocoles ont été effectués afin d'évaluer l'impact de la fréquence cardiaque sur la survenue de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique et le rôle joué par le statut énergétique myocardique.

4.4.3.1 Étude 3, Protocole 3a

4.4.3.1.1 Évaluation des paramètres physiologiques

4.4.3.1.1.1 Paramètres physiologiques

L'administration d'IVA et de PROPRA après la première séquence d'ischémie / fibrillation ventriculaire a induit une augmentation significative du temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire à fréquence cardiaque spontanée. De façon intéressante, cette augmentation est significativement plus importante avec l'IVA que le PROPRA (Figure 63). Cet effet bénéfique est corrélé à une réduction de la fréquence cardiaque qui est semblable entre ces deux traitements (Figure 64), sans modification de la durée du potentiel d'action monophasique corrigée (Tableau 22).

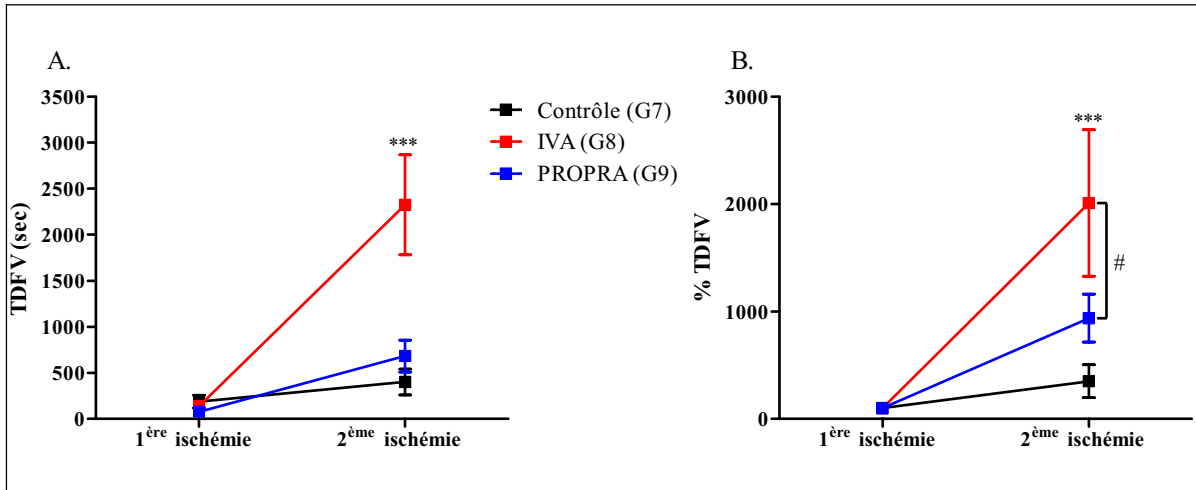


Figure 63 : Impact des différents traitements sur le temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique, exprimé en sec (A) ou en pourcentage (B).

*** $p < 0,001$ vs. groupe contrôle (G7) ; # $p < 0,05$ vs. IVA (G8).

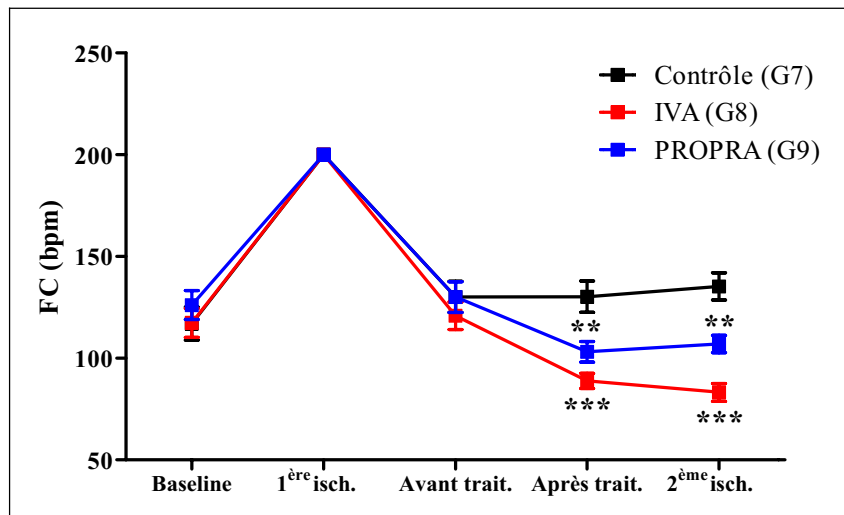


Figure 64 : Impact des différents traitements sur la fréquence cardiaque en conditions ischémiques.

** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ vs. groupe contrôle (G7).

Tableau 22 : Impact des différents traitements sur la durée du potentiel d'action monophasique corrigée en conditions ischémiques.

	Baseline	1 ^{ère} ischémie	Avant traitement	Après traitement	2 ^{ème} ischémie
dMAPc					
Contrôle (G7)	11,3 ± 0,4	11,6 ± 0,3	11,2 ± 0,4	11,8 ± 0,4	11,6 ± 0,1
IVA (G8)	12,0 ± 0,4	11,7 ± 0,3	12,3 ± 0,4	12,7 ± 0,3	12,4 ± 0,3
PROPRA (G9)	12,7 ± 0,2	12,2 ± 0,4	12,8 ± 0,3	12,2 ± 0,6	11,5 ± 0,7

dMAPc, durée du potentiel d'action monophasique corrigée. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

4.4.3.1.1.2 Paramètres hémodynamiques

L'analyse n'a montré aucune différence inter-groupe. Cependant, une baisse significative du dP/dt_{max} VG est observée dans le groupe saline (# $p < 0.05$) et PROPRA (### $p < 0.001$) lors de la 2^{ème} ischémie par rapport à la valeur obtenue avant administration des drogues. Aucune modification significative n'est observée sous IVA (Figure 65).

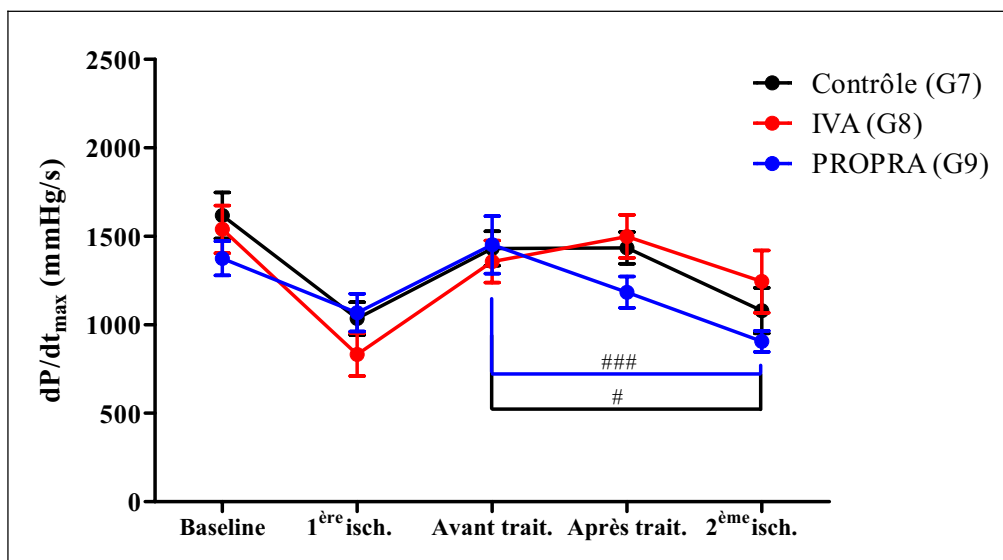


Figure 65 : Impact des différents traitements sur la contractilité myocardique en conditions ischémiques.

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

$p < 0,05$ vs. avant traitement ; ### $p < 0,001$ vs. avant traitement.

Tableau 23 : Impact des différents traitements la fonction hémodynamique en conditions ischémiques.

	Baseline	1 ^{ère} ischémie	Avant traitement	Après traitement	2 ^{ème} ischémie
PAs (mmHg)					
Contrôle (G7)	106 ± 5	81 ± 5	93 ± 4	97 ± 6	75 ± 7§§§
IVA (G8)	101 ± 5	71 ± 5	90 ± 7	89 ± 6	86 ± 5
PROPRA (G9)	101 ± 4	84 ± 2	106 ± 7	109 ± 9	89 ± 7§§
PAd (mmHg)					
Contrôle (G7)	82 ± 5	65 ± 5	71 ± 2	77 ± 7	54 ± 6§§§
IVA (G8)	82 ± 5	58 ± 6	68 ± 8	61 ± 6	62 ± 6
PROPRA (G9)	75 ± 4	54 ± 2	83 ± 6	85 ± 9	70 ± 7 §
PAm (mmHg)					
Contrôle (G7)	94 ± 5	72 ± 5	80 ± 3	86 ± 6	62 ± 7§§§
IVA (G8)	90 ± 5	64 ± 5	77 ± 7	74 ± 6	74 ± 5
PROPRA (G9)	85 ± 4	64 ± 2	94 ± 7	96 ± 8	78 ± 7§§

PAs, pression artérielle systolique ; PAd, pression artérielle diastolique ; PAm, pression artérielle moyenne. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM.

* p<0,05 ; *** p<0,001 vs. groupe contrôle (G7) ; § p<0,05 ; §§ p<0,01 ; §§§ p<0,001 vs. avant traitement.

4.4.3.1.2 Évaluation des paramètres enzymologiques

Dans ces conditions où les prélèvements terminaux ont été effectués au déclenchement de la fibrillation ventriculaire après administration des traitements, aucune différence n'est rapportée pour l'activité enzymatique de la SDH, ATPase et phosphorylase (Tableau 24).

Tableau 24 : Impact des différents traitements sur l'activité enzymatique en conditions ischémiques.

	Contrôle (G7)	IVA (G8)	PROPRA (G9)
SDH	0 (0 ; 1)	1 (1 ; 1)	2 (1 ; 2)
ATPase	0 (0 ; 1)	1 (1 ; 2)	2 (1,5 ; 3)
Phosphorylase	2 (1,5 ; 3)	2 (1,5 ; 2)	1 (1 ; 2)

Les valeurs sont représentées en médiane (25^{ème} ; 75^{ème} percentile).

4.4.3.1.3 Évaluation des paramètres énergétiques

En ce qui concerne les paramètres énergétiques, aucune modification n'est observée pour les concentrations en ATP, AMP, PCr, et les rapports Pi/PCr et ATP/ADP. En revanche, après l'administration d'IVA, les concentrations d'ADP myocardiques sont significativement plus basses (* $p < 0,05$) et le rapport PCr/ATP significativement augmenté (* $p < 0,05$) que dans les groupes ayant reçu de la saline ou du PROPRA. Il semble donc que l'IVA prévienne l'augmentation de la concentration d'ADP et la chute du rapport PCr/ATP qui sont secondaires à l'ischémie (Tableau 25 et Figure 66).

Tableau 25 : Impact des différents traitements sur les concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie, en conditions ischémiques.

	Contrôle (G7)	IVA (G8)	PROPRA (G9)
ATP ($\mu\text{mol/gww}$)	1,67 \pm 0,23	0,94 \pm 0,29	1,35 \pm 0,28
ADP ($\mu\text{mol/gww}$)	1,18 \pm 0,15	0,63 \pm 0,14*	1,15 \pm 0,09#
AMP ($\mu\text{mol/gww}$)	0,58 \pm 0,09	0,35 \pm 0,09	0,51 \pm 0,07
PCr ($\mu\text{mol/gww}$)	0,21 \pm 0,04	0,25 \pm 0,08	0,16 \pm 0,10
Pi ($\mu\text{mol/gww}$)	12,95 \pm 0,94	11,56 \pm 2,22	10,93 \pm 0,96
PCr/ATP	0,12 \pm 0,03	0,36 \pm 0,09*	0,08 \pm 0,04#
Pi/PCr	61,86 \pm 11,47	108,65 \pm 31,60	75,63 \pm 19,96
ATP/ADP	1,41 \pm 0,05	1,47 \pm 0,45	1,12 \pm 0,20

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Contrôle (G7) ; # $p < 0,05$ vs. IVA (G8).

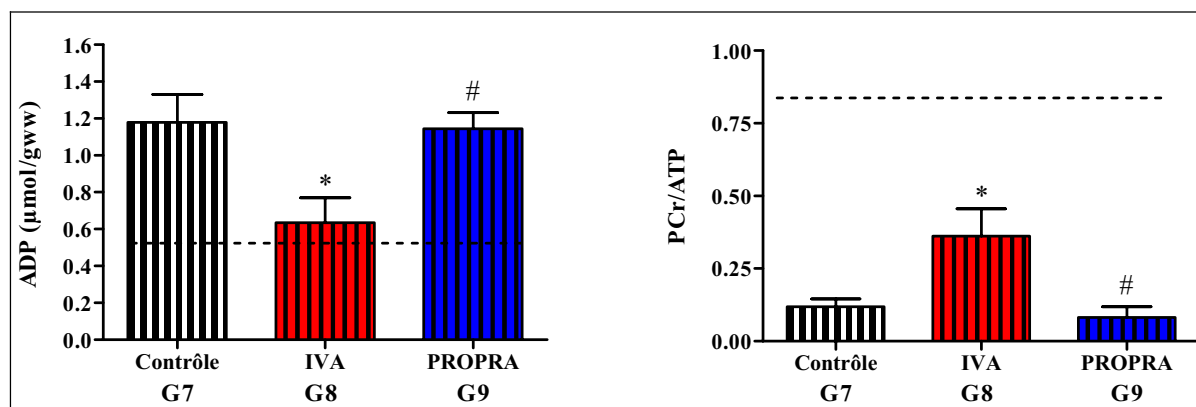


Figure 66 : Représentation des concentrations myocardiques en ADP et du rapport PCr/ATP.
Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. contrôle (G7) ; # $p < 0,05$ vs. IVA (G8).

4.4.3.2 Étude 3, Protocole 3b

Dans ce dernier protocole, la réduction de la fréquence cardiaque a été abolie par l'application d'une stimulation auriculaire rapide afin d'étudier le rôle de la fréquence cardiaque à différents moments clés du protocole.

4.4.3.2.1 Évaluation des paramètres physiologiques

Ces résultats démontrent que l'IVA retarde le déclenchement de la fibrillation ventriculaire (**p<0,001 vs. groupes 10, 11 et 12) lorsque que la baisse de la fréquence cardiaque est maintenue. Cependant, son effet bénéfique est complètement abolit lors de l'application d'un pacing auriculaire rapide pendant l'occlusion coronaire. Lorsque ce pacing auriculaire rapide est appliqué pendant les 30 min d'action de l'IVA mais stoppé pendant l'occlusion coronaire, le temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire est également augmenté (*p<0,05 vs. groupes 10 et 12) mais de façon moindre (**p<0,001 vs. groupe 8). À ceci, n'est associée aucune modification de la durée du potentiel d'action monophasique corrigée (Tableau 26).

Ainsi, nos résultats démontrent que l'IVA exerce son effet bénéfique sur la fibrillation ventriculaire via la baisse de la fréquence cardiaque plus particulièrement lors de l'occlusion coronaire.

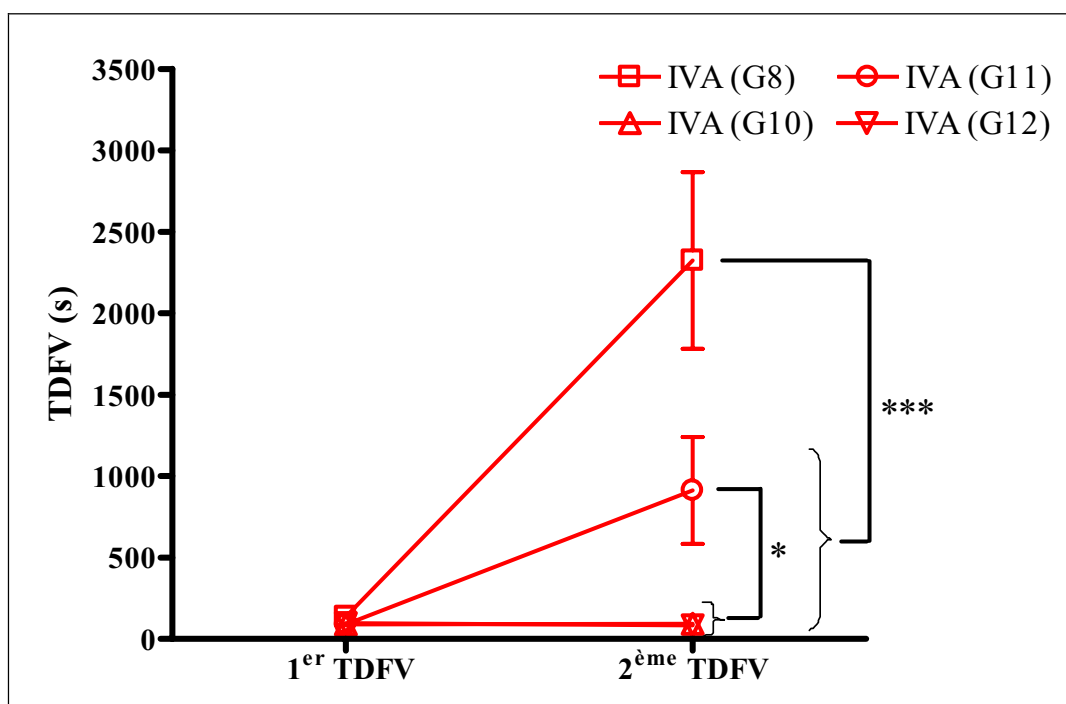


Figure 67 : Impact de la réduction de la fréquence cardiaque induite par l'ivabradine sur le TDFV. Valeurs représentées en moyenne \pm SEM. * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

Tableau 26 : Impact de la réduction de la fréquence cardiaque induite par l'ivabradine sur la fréquence cardiaque et la durée du potentiel d'action monophasique corrigée.

	Baseline	1 ^{ère} ischémie	Avant traitement	Après traitement	2 ^{ème} ischémie
FCs (bpm)					
IVA (G8)	117 \pm 7	200 \pm 0	121 \pm 7	89 \pm 4###	83 \pm 4###
IVA (G10)	134 \pm 9	200 \pm 0	141 \pm 9	96 \pm 9###	200 \pm 0
IVA (G11)	108 \pm 3	200 \pm 0	127 \pm 12	200 \pm 0	105 \pm 10#
IVA (G12)	130 \pm 10	200 \pm 0	135 \pm 10	200 \pm 0	200 \pm 0
dMAPc					
IVA (G8)	12,0 \pm 0,4	11,7 \pm 0,3	12,3 \pm 0,4	12,7 \pm 0,3	12,4 \pm 0,3
IVA (G10)	11,6 \pm 0,4	11,5 \pm 0,2	11,5 \pm 0,3	11,2 \pm 0,3	11,3 \pm 0,3
IVA (G11)	11,7 \pm 0,4	11,9 \pm 0,4	12,4 \pm 0,4	12,0 \pm 0,5	12,2 \pm 0,5
IVA (G12)	11,2 \pm 0,3	12,3 \pm 0,4	12,1 \pm 0,4	12,7 \pm 0,5	12,2 \pm 0,5

FCs, fréquence cardiaque sinusale ; dMAPc, durée du potentiel d'action monophasique corrigée. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM. # $p<0,05$ et ### $p<0,001$ vs. avant administration de l'IVA.

Tableau 27 : Impact de l'administration d'IVA en fonction de la fréquence cardiaque sur la fonction hémodynamique.

	Baseline	1 ^{ère} ischémie	Avant traitement	Après traitement	2 ^{ème} ischémie
PAs (mmHg)					
IVA (G8)	101 ± 5	71 ± 5	90 ± 7	89 ± 6	86 ± 5
IVA (G10)	108 ± 6	79 ± 6	99 ± 17	105 ± 5	89 ± 4
IVA (G11)	99 ± 4	72 ± 6	94 ± 5	88 ± 6	84 ± 5
IVA (G12)	93 ± 2	76 ± 3	84 ± 2	99 ± 2	84 ± 5
PAd (mmHg)					
IVA (G8)	82 ± 5	58 ± 6	68 ± 8	61 ± 6	62 ± 6
IVA (G10)	85 ± 7	62 ± 6	77 ± 7	77 ± 5	75 ± 5
IVA (G11)	75 ± 5	52 ± 4	68 ± 6	64 ± 7	65 ± 4
IVA (G12)	71 ± 2	49 ± 2	64 ± 2	64 ± 3	57 ± 4
PAm (mmHg)					
IVA (G8)	90 ± 5	64 ± 5	77 ± 7	74 ± 6	74 ± 5
IVA (G10)	96 ± 7	60 ± 10	88 ± 6	90 ± 5	80 ± 5
IVA (G11)	86 ± 4	59 ± 5	80 ± 6	73 ± 6	73 ± 4
IVA (G12)	81 ± 2	59 ± 3	72 ± 2	80 ± 3	65 ± 4

PAd : pression artérielle diastolique, PAm : pression artérielle moyenne, PAs : pression artérielle systolique. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM.

4.4.3.2.2 *Évaluation des paramètres enzymatiques*

Aucune différence significative n'est rapportée en ce qui concerne l'activité des enzymes ATPase, SDH et phosphorylase entre les traitements (contrôle, IVA et PROPRA) (Tableau 28).

Tableau 28 : Impact de l'administration d'IVA en fonction de la fréquence cardiaque sur l'activité enzymatique myocardique de la SDH, ATPase et phosphorylase.

	IVA (G8)	IVA (G10)	IVA (G11)	IVA (G12)
SDH	1 (1 ; 1)	2 (1,5 ; 2)	2 (2 ; 3)	1,5 (1 ; 2)
ATPase	1 (1 ; 2)	3 (2,5 ; 3)	1,5 (1 ; 3)	1,5 (1 ; 2,5)
Phosphorylase	2 (1,5 ; 2)	3 (2 ; 3)	2 (2 ; 2,5)	2 (2 ; 2)

Les valeurs sont représentées en médiane (25^{ème} ; 75^{ème} percentile).

4.4.3.2.3 Évaluation des paramètres énergétiques

Ces résultats démontrent que les concentrations d'ATP sont réduites lorsqu'aucun pacing auriculaire n'est appliqué, en comparaison aux animaux où un pacing auriculaire à fréquence rapide était appliqué pendant la seconde occlusion (G10) ou dès l'administration d'IVA et ce jusqu'à la fin du protocole (G12). Cependant, il ne faut pas oublier que les animaux du G8 (fréquence cardiaque spontanée dès l'administration d'IVA) ont fibrillé beaucoup plus tardivement que les autres animaux. Cet effet sur la concentration myocardique en ATP pourrait s'expliquer par le TDFV élevé.

De plus, le rapport PCR/ATP myocardique est mieux conservé dans ce G8 lorsque la réduction de la fréquence cardiaque est maintenue en comparaison aux groupes où la seconde ischémie était réalisée à fréquence cardiaque rapide (G10 et G12). L'application du pacing rapide dès l'administration d'IVA mais pas lors de la seconde occlusion se traduit par un rapport PCr/ATP intermédiaire. Ainsi, comme pour le TDFV, il semble que la baisse de la fréquence cardiaque soit principalement bénéfique lors de l'occlusion coronaire.

Tableau 29 : Impact de l'administration d'IVA en fonction de la fréquence cardiaque sur les concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie.

	IVA (G8)	IVA (G10)	IVA (G11)	IVA (G12)
ATP ($\mu\text{mol/gww}$)	0,94 \pm 0,29	1,95 \pm 0,13*	1,47 \pm 0,29	2,05 \pm 0,14*
ADP ($\mu\text{mol/gww}$)	0,63 \pm 0,14	1,30 \pm 0,03**	1,09 \pm 0,22	1,43 \pm 0,10**
AMP ($\mu\text{mol/gww}$)	0,35 \pm 0,09	0,53 \pm 0,05	0,36 \pm 0,04	0,38 \pm 0,05
PCr ($\mu\text{mol/gww}$)	0,25 \pm 0,08	0,14 \pm 0,04	0,24 \pm 0,07	0,24 \pm 0,04
Pi ($\mu\text{mol/gww}$)	11,56 \pm 2,22	11,15 \pm 0,40	11,99 \pm 1,02	13,46 \pm 0,24
PCr/ATP	0,36 \pm 0,09	0,07 \pm 0,02*	0,19 \pm 0,06	0,12 \pm 0,02*
Pi/PCr	109 \pm 32	58 \pm 7	75 \pm 17	68 \pm 11
ATP/ADP	1,47 \pm 0,45	1,49 \pm 0,09	1,42 \pm 0,17	1,45 \pm 0,09

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ vs. G8.

4.5 Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié les effets de l'IVA et du PROPRA sur la fréquence cardiaque et le statut énergétique myocardique par évaluation des concentrations en composés phosphorés riches en énergie. Nous avons démontré que :

L'ivabradine retarde le temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire via la réduction de la fréquence cardiaque.

Dans les précédentes études nous avons démontré l'augmentation du seuil électrique de fibrillation ventriculaire après administration de l'IVA. Cette étude s'intéresse à l'évaluation du temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique qui accuse une hausse significative avec l'IVA confirmant l'effet favorable de cette molécule. L'ensemble travaux réalisés démontre que cet effet protecteur est essentiellement dû à la réduction de la fréquence cardiaque laquelle n'est associée à aucune modification de la dMAPc, comme nous l'avions rapporté lors d'études précédentes sur le seuil électrique de fibrillation ventriculaire [Vaillant, Timour *et al.*, 2008]. L'effet bénéfique de l'IVA sur le temps de déclenchement de la fibrillation ventriculaire est complètement abolit lors de l'application d'un pacing auriculaire rapide (200 bpm). De façon intéressante, cet effet bénéfique n'est que partiellement abolit lorsque que le pacing est appliqué dès l'administration l'IVA mais pas lors de la seconde occlusion coronaire. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'action bénéfique de la réduction de la fréquence cardiaque a lieu principalement lors de l'ischémie myocardique.

Par ailleurs, nous démontrons que, pour une réduction comparable de la fréquence cardiaque, l'administration d'un bêta-bloquant, le PROPRA en l'occurrence, retarde

également le déclenchement de la fibrillation ventriculaire, mais de façon moindre en comparaison à l'IVA. Cette étude souligne donc l'efficacité de l'IVA et, dans une moindre mesure, celle du PROPRA dans la lutte contre la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique.

L'ivabradine permet une meilleure préservation des réserves en phosphates à haute énergie.

D'un point de vue énergétique, ce travail démontre un effet favorable de l'IVA sur le statut énergétique myocardique dans un modèle *in vivo* d'ischémie / fibrillation ventriculaire. En effet, l'administration d'IVA a permis une meilleure préservation du rapport PCr/ATP myocardique, malgré des concentrations en ATP plus basses. Il est intéressant de noter que les concentrations en PCr sont fortement réduites au déclenchement de la FV, que se soit après administration d'IVA, de PROPRA ou de saline dans le groupe témoin. Ce résultat atteste d'une réserve énergétique nulle à l'apparition de la FV. Ces changements n'étaient pas accompagnés de modification de l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique (SDH, phosphorylase et ATPase), probablement du fait de la limite d'évaluation de ces activités qui n'est que qualitative.

L'occlusion coronaire aiguë chez le porc comme chez d'autres gros animaux, est suivie de modifications des paramètres physiologiques et métaboliques qui apparaissent dans les secondes suivant l'interruption du flux sanguin [Kloner and Jennings, 2001a; Kloner and Jennings, 2001b]. Par exemple, le métabolisme énergétique passe d'un métabolisme aérobie vers une glycolyse anaérobie au bout de seulement de 8 secondes. Dans la mesure où les besoins énergétiques des myocytes dépassent largement les apports de la glycolyse anaérobie et des réserves de phosphates riches en énergie, l'ATP tissulaire diminue progressivement

[Jennings, Reimer *et al.*, 1983; Wu, Zhang *et al.*, 2008] et l'ADP commence à s'accumuler [Liu, Wang *et al.*, 2001]. La PCr, qui est une source majeure de phosphates à haute énergie, diminue très rapidement et est épuisée à 90% au bout de 30 secondes d'ischémie [Vogt, Elsasser *et al.*, 2005; Wu, Zhang *et al.*, 2008].

Par ailleurs, la littérature souligne que la fonction du myocarde dans des conditions d'ischémie est étroitement liée à la variation de ses concentrations en phosphates à haute énergie [Schaefer, Schwartz *et al.*, 1990]. En effet, une diminution du rapport PCr/ATP et une augmentation du rapport Pi/PCr apparaissent au cours d'une réduction même faible du débit sanguin myocardique, caractérisant ainsi la présence d'un phénomène ischémique [Schaefer, Schwartz *et al.*, 1990; Wu, Zhang *et al.*, 2008].

Il a été démontré que la détermination du rapport PCr/ATP cardiaque était un meilleur indice de mortalité cardiovasculaire que la fraction d'éjection ventriculaire habituellement utilisé en clinique humaine [Neubauer, 1998]. En effet, la baisse du rapport PCr/ATP implique une stimulation de la phosphorylation oxydative mitochondriale du fait de l'accroissement du niveau d'ADP et/ou de Pi afin de maintenir la « driving force » pour la production d'ATP [Zhang, Liem *et al.*, 2008]. A terme, sa baisse serait une des causes de l'installation d'une insuffisance cardiaque. Par ailleurs, l'augmentation du rapport PCr/ATP (ainsi que la baisse d'ADP) indiquent une meilleure conservation des réserves énergétiques disponibles pour le myocarde, ce qui pourrait réduire le risque de mortalité lors d'affections cardiaques ischémiques. L'augmentation du rapport PCr/ATP observée dans la présente étude avec l'IVA indique donc une certaine conservation des phosphates à haute énergie et pourrait prédire une baisse de morbi-mortalité cardiovasculaire avec l'utilisation de l'IVA associée à une ischémie myocardique aigüe.

Schwartz *et al.*, rapportent qu'une augmentation du rapport Pi/ PCr est associée à une baisse de la capacité de raccourcissement des fibres myocardiques et donc une inhibition de la contractilité cardiaque au cours de l'ischémie myocardique [Schwartz, Reimer *et al.*, 2007]. En effet, il a été évoqué que l'augmentation des concentrations cytoplasmiques en Pi conduit à une réduction de la « calcium-activated tension » et à la baisse de l'activité de l'ATPase dans les myofibrilles [Schmidt-Ott, Bletz *et al.*, 1990]. La stimulation de l'activité ATPasique pourrait ainsi aboutir à un effet inverse. Dans cette étude, nous n'avons pas observé de baisse de dp/dt_{max} VG sous ischémie lors de l'administration d'IVA contrairement aux animaux ayant reçu une solution saline ou du PROPRA, ce qui pourrait indiquer une préservation de l'activité contractile et donc, à priori du débit cardiaque. Cependant, nous n'avons observé aucune augmentation de l'activité ATPasique sous ischémie à fréquence spontanée après administration d'IVA.

L'effet anti-ischémique de l'IVA en termes de modulation de l'état énergétique myocardique a été souligné récemment par Ceconi *et al.*, 2009 [Ceconi, Cargnoni *et al.*, 2009]. Ces auteurs ont rapportés que l'IVA induisait une réduction de la consommation énergétique cardiaque et préservait le potentiel d'oxydoréduction lors de l'ischémie, permettant ainsi une amélioration de la récupération lors de la reperfusion. Ils ont démontré que l'IVA protégeait le cœur contre les effets délétères de l'ischémie-reperfusion en cœur isolé perfusé en mode Langendorff. Selon ces auteurs, l'IVA permet de conserver le métabolisme énergétique cardiaque grâce à l'augmentation des concentrations d'ATP. Ils démontrent par ailleurs, l'existence d'une corrélation significative entre la PCr cardiaque et les niveaux d'ATP à la fin de l'ischémie. Dans notre étude nous avons obtenu des effets similaires qui sont probablement liés à la réduction de la fréquence cardiaque consécutive à l'administration de l'IVA puisque ces ne sont plus observés lors de l'application d'un pacing auriculaire rapide.

Dans le présent travail, nous rapportons aussi que le rapport ATP/ADP est préservé, démontrant le bon statu énergétique du myocarde. La réduction de la demande énergétique qui est assimilée à une augmentation du rapport ATP/ADP dans le sarcoplasme, est un élément essentiel du mécanisme de la cardioprotection dans le myocarde préconditionné ou traité par certaines substances hyperglycémiantes comme le diazoxide. Il est effectivement estimé que le préconditionnement ou le recours à un traitement pharmacologique efficace, empêche la dégradation de l'ATP par l'ATPase mitochondriale, ce qui permet le maintien des taux d'ATP et donc de l'énergie disponible [Schwartz, Reimer *et al.*, 2007]. De plus, il est admis que pendant une ischémie sévère, c'est surtout la consommation d'ATP pendant l'ischémie, plus que sa production par glycolyse anaérobie, qui conditionne la récupération ultérieure du myocarde [Cargnoni, Ceconi *et al.*, 1996]. La préservation de l'activité ATPasique pourrait expliquer la restauration de composés phosphorés riches en énergie après une séquence d'ischémie/fibrillation [Cargnoni, Ceconi *et al.*, 1996].

Le propranolol n'exerce qu'un effet limité sur le statut énergétique myocardique.

Contrairement à l'IVA, le PROPRA n'induit pas de modification du rapport PCr/ATP. Nos résultats n'indiquent aucune amélioration significative de la concentration myocardique en phosphates à haute énergie ou de l'activité enzymatique après administration de PROPRA sous ischémie à fréquence cardiaque spontanée.

De plus, nous avons démontré que le PROPRA a une action qui semble défavorable sur un cœur sain, en l'absence d'occlusion coronaire. En effet, l'administration de PROPRA sur un cœur sain en conditions normoxiques entraîne une diminution des concentrations en PCr et du rapport PCr/ATP associés à une augmentation du rapport Pi/PCr. Cependant, ceci

pourrait s'expliquer par l'élévation de la pression artérielle moyenne rapportée après l'administration du PROPRA dans ces conditions de normoxie. Il est intéressant de noter qu'une fois le cœur soumis à un stress, comme ici lors de l'application d'une séquence d'ischémie / fibrillation ventriculaire, l'administration de PROPRA n'est plus « délétère » puisque les concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie reviennent à des valeurs basales, c'est-à-dire semblable à un cœur sain en conditions normoxiques.

Conclusion

Peu de travaux ont été effectués *in vivo* afin d'évaluer les modifications des concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie lors du déclenchement de la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique. Notre étude démontre pour la première fois que l'administration d'IVA lors d'une ischémie aigue permet de préserver le statut énergétique expliquant en partie le retard de déclenchement de la fibrillation ventriculaire. Ces effets, qui sont annulés lors de l'application d'un pacing auriculaire à fréquence rapide, démontrent le rôle essentiel joué par la réduction de la fréquence cardiaque induite par l'IVA sur ce statut énergétique.

Cette étude souligne donc l'importance du maintien du statut énergétique lors de l'ischémie myocardique aigue dans la prévention contre la fibrillation ventriculaire d'origine ischémique, susceptible d'améliorer la récupération des réserves énergétiques à la suite d'un accident cardiaque. D'un point de vue thérapeutique, il semble important, en plus de réduire la demande en énergie [Bottomley, Wu *et al.*, 2009], d'améliorer les conditions tissulaires et de réduire la perte de substrats après infarctus du myocarde. L'IVA plus encore que le PROPRA semble répondre à cette attente.

**DEUXIEME PARTIE : Rôle de la
fréquence cardiaque sur le métabolisme
énergétique d'un cœur sain en conditions
normoxiques**

Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'impact d'une réduction de la fréquence cardiaque induite par l'IVA sur la sélection des substrats pour la production énergétique sur un cœur sain en conditions normoxiques. Pour ceci, nous avons utilisé un modèle de cœurs isolés et perfusés en mode travaillant semi-recirculant, avec des concentrations physiologiques de substrats, hormones et co-facteurs mimant ainsi la composition sanguine. Cette technique permet l'évaluation de la fonction cardiaque sans influence neuro-hormonale.

Afin d'étudier l'impact de l'administration aigue d'IVA, les cœurs ont été perfusés avec des substrats marqués au carbone 13 (^{13}C) pour mesurer les flux métaboliques en présence ou en absence d'IVA afin d'induire une réduction de la fréquence cardiaque d'environ 20-30%.

1. Matériel et Méthodes

1.1 Protocole

Dans un premier temps, les cœurs de souris ont été perfusés i) sans IVA (groupe contrôle), ii) avec IVA à la dose de 3 μM selon les doses rapportées dans la littérature [Heusch, 2008; Ceconi, Cargnoni *et al.*, 2009] (groupe IVA) et iii) avec IVA soumis à une stimulation auriculaire afin d'abolir la réduction de la fréquence de la fréquence cardiaque (groupe IVA + pacing). La dose d'IVA de 3 μM a été choisie après une étude contrôle basée sur les données de la littérature.

Ensuite, afin de mieux comprendre les effets de l'IVA et de confirmer l'implication de la réduction de la fréquence cardiaque, nous avons tenté d'obtenir une baisse de la fréquence cardiaque comparable grâce à l'ajout d'un bêta-bloquant sélectif pour les récepteur bêta-1 adrénergiques, très utilisé en clinique, le métoprolol (METO) aux doses de 4 à 40 μM , selon les données rapportées dans la littérature [Di Verniero, Hocht *et al.*, 2007; Wang, Zaragoza *et al.*, 2007; Sharma, Dhillon *et al.*, 2008].

Enfin, une dernière série de cœurs a été perfusés et soumis à un pacing seul afin d'évaluer l'impact de ce pacing sur le métabolisme énergétique.

1.2 Animaux

Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique animale locale selon les lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux.

Des souris mâles C57Bl/6 (3 mois, Charles River) ont été hébergées à température et humidité constantes avec accès à l'eau et la nourriture *ad libitum*. Les animaux ont été anesthésiés avec du thiopental sodique (60 mg/kg, *i.p.*) et héparinés (5000 U/kg, *s.c.*) 15 min avant la chirurgie.

Une thoracotomie a été réalisée afin de dégager le cœur, après l'insertion rapide d'une canule 18-G dans l'aorte, ils ont été excisés et placés sur le système de perfusion et sont alors perfusés de manière rétrograde, dite de Langendorff, par un tampon Krebs-Henseleit modifié. Le tampon Krebs-Henseleit modifié (119 mM NaCl ; 4,8 mM KCl ; 2,5 mM CaCl₂ ; 1,2 mM KH₂PO₄ ; 1,2 mM MgSO₄ ; 25 mM NaHCO₃ ; 0,1 mM EDTA) contenant des concentrations physiologiques de substrats (11 mM glucose ; 0,8 nM insuline ; 50 μM L-carnitine ; 1,5 mM lactate ; et 0,2 mM pyruvate) et oxygéné par un mélange de O₂ 95% - CO₂ 5% (pH 7,4) et thermostaté à 37,5°C. Le lactate et le pyruvate ont été administrés en concentrations physiologiques et dans un rapport permettant de maintenir l'état rédox de la cellule.

Durant la perfusion rétrograde, un cathéter de polyéthylène (PE-50) a été introduit via l'orifice d'abouchement des veines pulmonaires dans le ventricule gauche, ancré à l'apex du cœur par une extrémité cannelée, et connecté à un transducteur de pression permettant le monitoring continu des pressions intra-ventriculaires (Digi-Med Heart Performance Analyzer, Micro-Med). Enfin, l'oreillette gauche a été connectée au réservoir de précharge par canulation de l'orifice d'abouchement des veines pulmonaires avec une canule 16-G (Figure 68 et Figure 69).

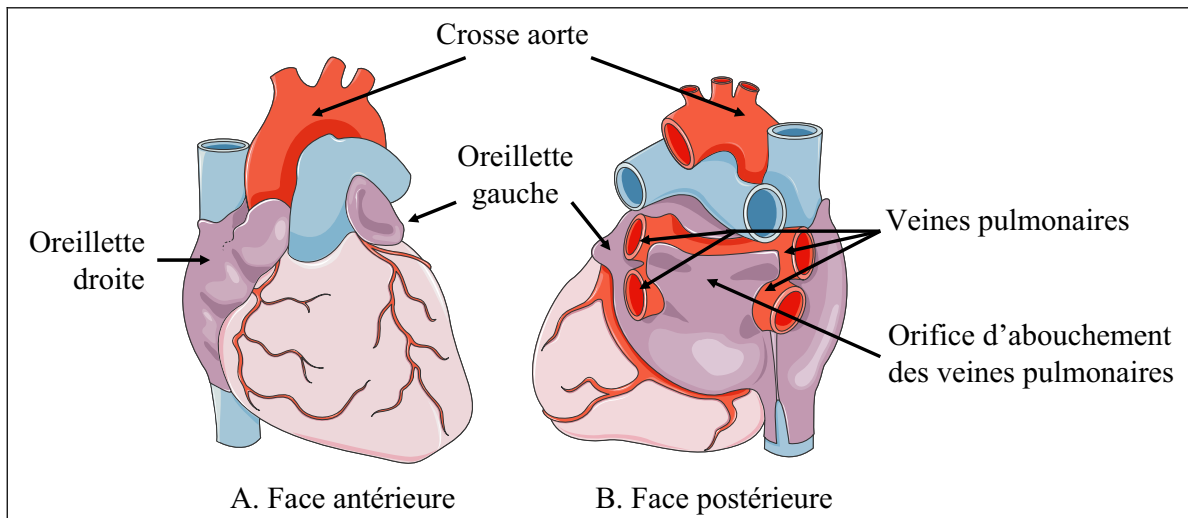


Figure 68 : Schéma anatomique pour le cœur isolé et perfusé.

A. Face antérieure ; B. face postérieure.

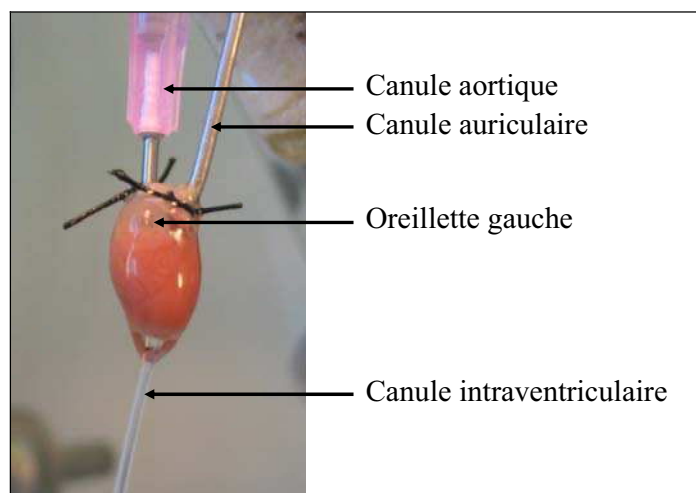


Figure 69 : Photographie représentant un cœur isolé et perfusé *in situ*.

Lors du passage au travail, les cœurs sont alors perfusés en mode semi-recirculant par voie antérograde via la canule auriculaire avec du tampon Krebs-Henseleit contenant du glucose (11mM), du lactate (1,5 mM), du pyruvate (0,2 mM) et de l'oléate (0,4 mM) complexé à de l'albumine 3% (voir protocole de perfusion). Pour chaque perfusion, un de ces deux substrats non marqués a été remplacé par son équivalent marqué : le [U-¹³C]oléate (à un pourcentage d'enrichissement molaire initial – PEM – de 35%) et le [U-¹³C]glucose (à une PEM initial de 50%).

1.3 Modèle de cœur isolé perfusé travaillant en mode semi-recirculant

Le système de perfusion de cœurs de souris travaillant en mode semi-recirculant est illustré par la Figure 70. Contrairement à un système recirculant, notre système semi-recirculant permet la collecte des effluents coronaires qui contiennent divers métabolites libérés par le cœur de façon continue. Ainsi, seule la sortie aortique est remise en circulation dans le réservoir de Krebs. Les précharge et postcharge ont été fixées et maintenues respectivement à 15 mmHg et 50 mmHg et monitorées tout au long des perfusions par deux capteurs de pression (Digi-Med Blood Pressure Analyzer and Low Pressure Analyzer, Micro-Med), ainsi aucune adaptation n'a été possible.

Plusieurs paramètres physiologiques ont été enregistrés de façon continue :

- i)* débit cardiaque et aortique (débitmètres, Carolina Medical Electronics) ;
- ii)* fonction ventriculaire gauche (mesurées par la canule intra-ventriculaire reliée à un capteur de pression (Digi-Med Heart Performance Analyzer, Micro-Med) :
 - la fréquence cardiaque (FC),
 - le maximum de pression ventriculaire systolique gauche (PSVG),
 - la pression minimale (P-min),
 - la valeur maximale de la dérivée première de la pression ventriculaire gauche (dP/dt_{max}) : index de la contractilité myocardique,
 - la valeur minimale de la dérivée première de la pression ventriculaire gauche (dP/dt_{min}) : index de la relaxation isovolumique,
 - la pression développée ventriculaire gauche (PDVG) ;
- iii)* température cardiaque.

Par ailleurs, des paramètres biochimiques tels que PO_2 (pour la quantification de la consommation d'oxygène : MVO_2), PCO_2 , pH, Ca^{2+} , K^+ , bicarbonates ont été évalués par un analyseur des gaz du sang, électrolytes et pH (ABL 77, Radiometer Copenhagen) dans l'influent auriculaire et l'effluent coronaire collectés toutes les 10 min.

Le mesure des ces paramètres nous a permis d'évaluer le volume d'éjection systolique (VES), l'efficacité et la puissance cardiaque selon les formules suivantes :

- **volume d'éjection systolique** : il s'agit du ratio débit cardiaque/fréquence cardiaque. Le volume d'éjection systolique est étroitement dépendant de la charge (selon la loi de Starling, le VES augmente si la précharge augmente), de l'inotropisme (le VES augmente si l'inotropisme augmente à charge constante) et de la postcharge (le VES diminue si la postcharge diminue),
- **puissance cardiaque** : est le travail par unité de temps,
- **efficacité cardiaque** : il s'agit de la puissance cardiaque rapportée à la consommation d'oxygène.

Enfin, des échantillons d'effluents coronaires ont été prélevés toutes les 10 min afin d'évaluer la libération de lactate déshydrogénase (LDH), un index de nécrose tissulaire, par dosage standard de l'activité enzymatique (appareil Cobas Fara, Roche).

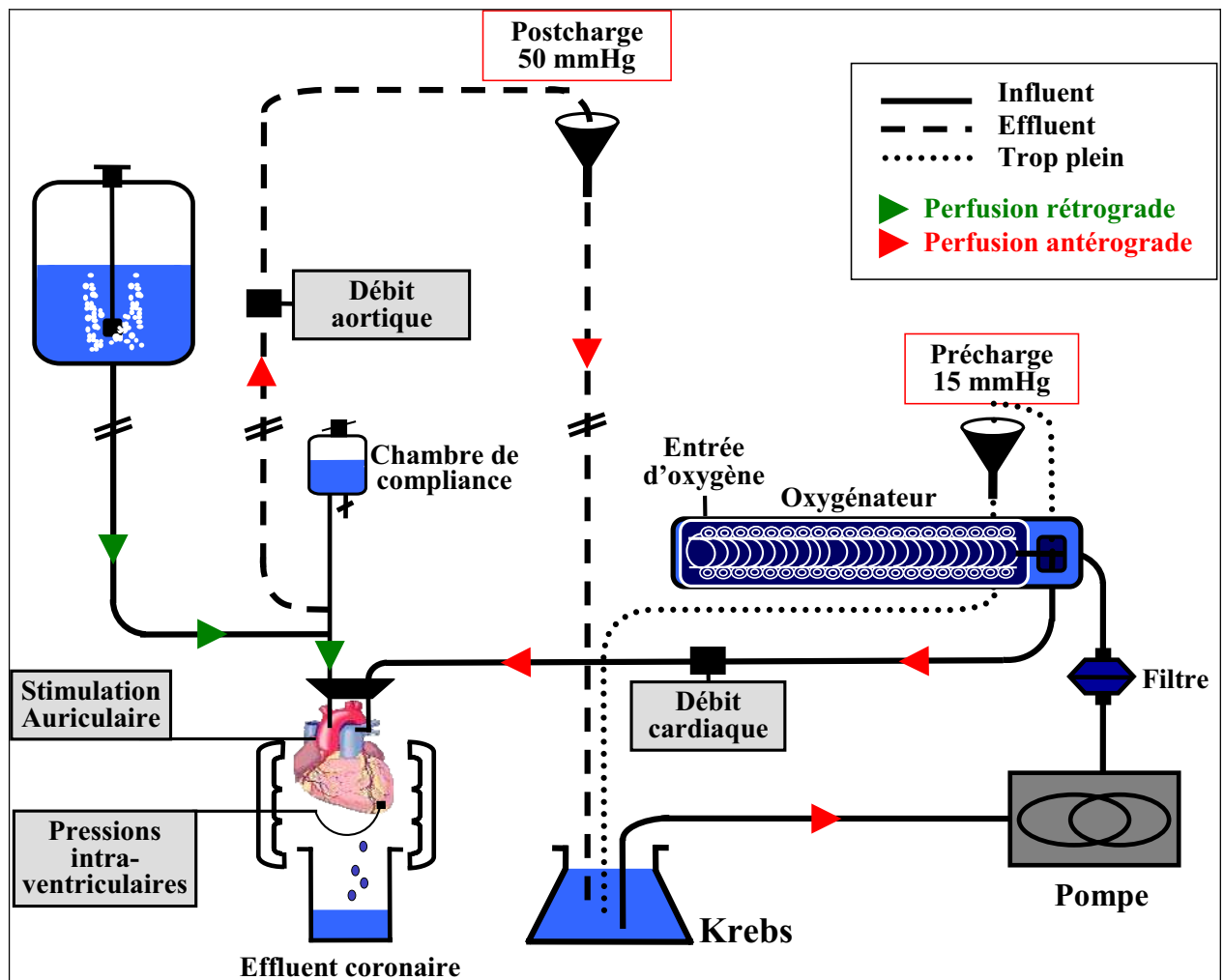


Figure 70 : Schéma représentant le système de cœur isolé perfusé en mode travaillant semi-recirculant.

1.4 Mesure des flux métaboliques : utilisation de traceurs isotopiques stables

Cette étude est basée sur l'utilisation des traceurs isotopiques afin d'évaluer le métabolisme cardiaque un paradigme expérimental qui a été précédemment décrit en détails [Khairallah, Labarthe *et al.*, 2004]. Le traceur est un outil permettant de suivre le devenir métabolique d'une molécule dans l'organisme. Une fois introduit dans un compartiment cellulaire donné, le devenir métabolique du traceur est identique à celui de la molécule tracée dans la plupart des cas.

Les isotopes d'un atome ont un numéro atomique identique (nombre de protons) et des nombres de masse différents, c'est-à-dire qu'ils diffèrent que par leur nombre de neutrons. Les isotopes stables diffèrent des isotopes radioactifs de par leur stabilité énergétique, c'est-à-dire qu'ils n'émettent pas de radiations, ce qui les rendent sécuritaires pour l'administration chez l'humain. Les isotopes stables sont présents naturellement en faible proportion.

Il existe une nomenclature simple qui permet de nommer de façon précise les molécules tracées fabriquées commercialement, par exemple, concernant le [U-¹³C]oléate et le [U-¹³C]glucose, la lettre « U », pour « Uniformément », signifie que tous les atomes de carbone de la molécule sont marqués et le chiffre 13 représente le nombre de neutrons. De plus, on appelle isotopomères de position les molécules qui possèdent des compositions isotopiques globales identiques mais qui diffèrent par la position des atomes lourds. Le premier chiffre indique alors le numéro de l'atome marqué. Ainsi, le [1-¹³C]pyruvate et le [3-¹³C]pyruvate sont des isotopomères de position. Les isotopomères de masse sont des molécules qui diffèrent par leur nombre d'atomes lourds et ayant donc des poids moléculaires différents. Ainsi, le [1-¹³C]pyruvate, le [1,2-¹³C₂]pyruvate et le [U-¹³C]pyruvate sont des isotopomères de masse. Dans le langage de la spectrométrie de masse ces molécules sont

appelées respectivement M+1, M+2 et M+3 pyruvate ou plus simplement M1, M2 et M3 pyruvate [Vincent, 2003].

Il est possible d'identifier et/ou mesurer les isotopes stables par spectrométrie de masse ou par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN). Depuis les années 70, l'introduction sur le marché de modèles moins coûteux de Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectrométrie de Masse (CGSM) a permis l'utilisation à grande échelle des isotopes stables pour les études métaboliques *in vivo*. Plusieurs études ont démontré que l'utilisation des isotopes stables couplée à l'analyse d'isotopomères de masse est un outil puissant d'investigations métaboliques [Kien, Murray *et al.*, 1996; Comte, Vincent *et al.*, 1997a; Comte, Vincent *et al.*, 1997b; Hazey, Yang *et al.*, 1997; Large, Brunengraber *et al.*, 1997; Labarthe, Gelinas *et al.*, 2008].

Dans notre étude, nous avons utilisé des substrats marqués au ^{13}C : le $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ oléate et le $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose ; et le principe d'analyse des isotopomères de masse par CGSM. L'utilisation du $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose permet de mesurer la glycolyse et la contribution du glucose à la formation d'acétyl-CoA, et l'utilisation du $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ oléate permet la mesure de la contribution de l'oléate à la formation d'acétyl-CoA. Au final, ces données nous permettent d'évaluer de la production d'ATP cytosolique et mitochondriale. La Figure 71 est un schéma représentatif du devenir du $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose dans la cellule myocardique, afin d'évaluer son utilisation pour la production d'énergie par le cycle de Krebs.

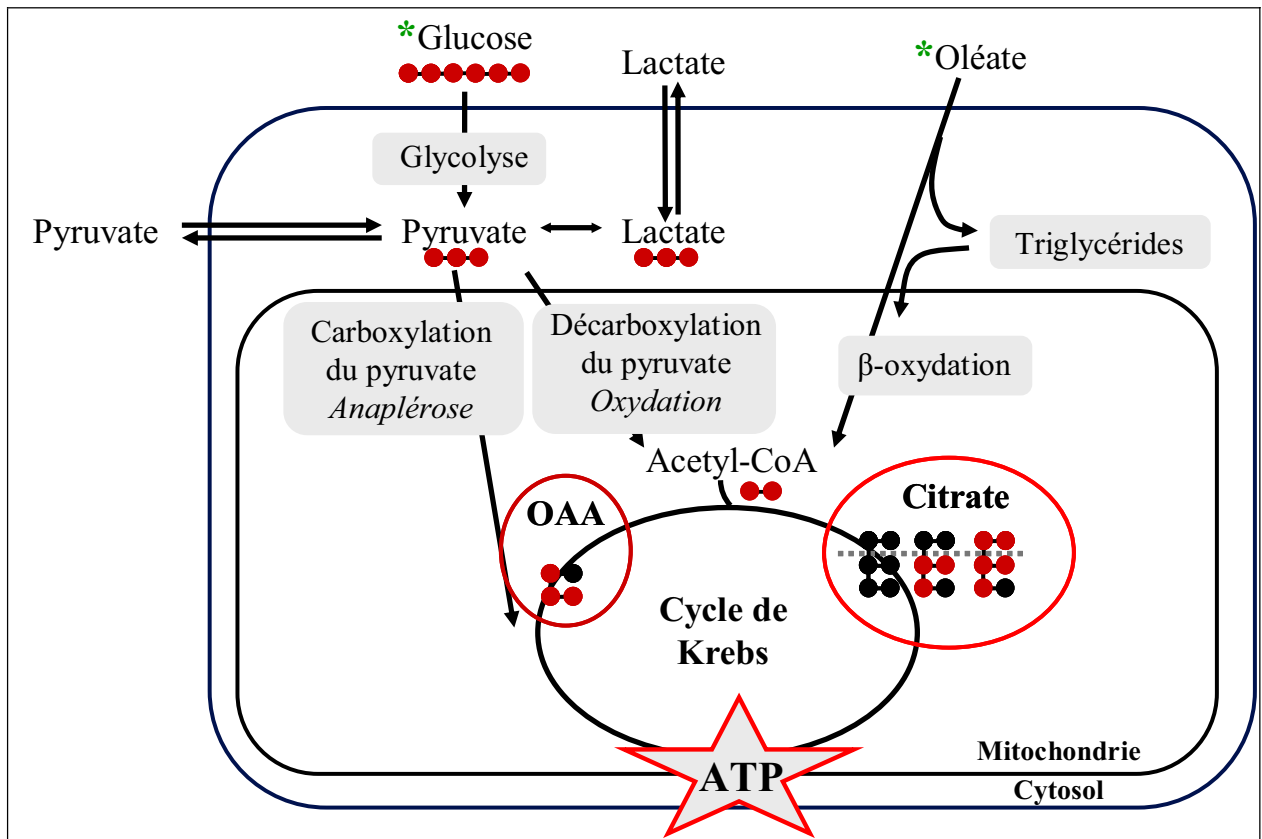


Figure 71 : Schéma représentatif du métabolisme cardiaque en présence de glucose marqué au ^{13}C .

Les sphères noires représentent les atomes de carbone non marqués (^{12}C) et les sphères rouges représentent les atomes de carbone marqués (^{13}C).

1.4.1 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM) : les aspects techniques

Le métabolisme peut être étudié par de nombreuses techniques dont la spectroscopie RMN [Clarke and Willis, 1987; Malloy, Sherry *et al.*, 1988; Chatham and Blackband, 2001; Vincent, 2003], la tomographie à émission de positrons (TEP) [Henze, Schelbert *et al.*, 1982] et la CGSM [Comte, Vincent *et al.*, 1997a; Hazey, Yang *et al.*, 1997; Vincent, 2003]. La technique de CGSM combine le haut pouvoir de résolution de la chromatographie en phase gazeuse et la haute sensibilité et spécificité de détection ionique du spectromètre de masse. Il est ainsi possible d'identifier et de quantifier avec précision des composés chimiques présents dans un mélange complexe [Rocchiccioli, Lepetit *et al.*, 1989; Vincent, 2003]. Utilisée en combinaison avec des substrats marqués aux isotopes stables et l'analyse d'isotopomères de masse, la CGSM s'avère être une technique plus puissante que les techniques radio-isotopiques classiques et plus sensible que la RMN, tout en étant sécuritaire pour l'investigation métabolique tant dans l'organe isolé que chez l'humain [Comte, Vincent *et al.*, 1997a; Comte, Vincent *et al.*, 1997b; Vincent, Khairallah *et al.*, 2003].

L'analyse par CGSM d'un produit organique au sein d'un milieu biologique nécessite au préalable un traitement de l'échantillon afin d'obtenir un dérivé volatil stable [Rocchiccioli, Lepetit *et al.*, 1989]. Tous les métabolites étudiés lors de cette recherche ont été analysés sous la forme dérivée au tert-butyldiméthylsilyl (TBDMS).

1.4.1.1 La chromatographie en phase gazeuse

Le chromatographe utilisé lors de cette étude correspond au modèle Hewlett Packard 5890 Série II Plus. Brièvement, les molécules en solution sont introduites dans l'injecteur du chromatographe chauffé à haute température (250-300°C). Les molécules vaporisées pénètrent dans la colonne de chromatographie, laquelle est parcourue continuellement par un flux du gaz vecteur, l'hélium. Ce dernier circule dans la colonne avec un débit constant de 0,6-0,7 ml/min. La colonne est tapissée par une phase liquide non volatile, de structure et de polarité variables selon les composés à analyser. Les molécules se répartissent entre la phase liquide stationnaire et la phase gazeuse mobile en fonction de leur solubilité relative entre les deux phases. Le temps de rétention de la molécule influencé par la température ainsi que la longueur de la colonne, est d'autant plus long que le composé est soluble dans la phase liquide stationnaire et donc retenu par la colonne. Les différentes espèces moléculaires qui sortent du chromatographe passent dans le spectromètre de masse suivant un ordre constant, avec des temps de rétention spécifiques et reproductibles. Ainsi, la séparation des molécules d'intérêts est effectuée par la chromatographie en phase gazeuse [Vincent, 2003].

1.4.1.2 La spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse utilisé dans cette étude correspond au modèle Hewlett Packard 5972. Cet appareil est muni d'un détecteur composé de trois éléments : une chambre d'ionisation, un analyseur de masse et un détecteur à multiplicateur d'électrons. Le spectromètre de masse est utilisé comme détecteur sensible, sélectif et spécifique d'une molécule purifiée par le chromatographe.

À la sortie du chromatographe, les différentes molécules sont ionisées et fragmentées dans la chambre d'ionisation, communément appelée la source. L'ionisation se fait par impact électronique ou par ionisation chimique produisant ainsi des ions positifs et négatifs. L'abondance relative et le rapport masse sur charge (m/z) des ions détectés constituent le spectre de masse de la molécule. Le processus de fragmentation est spécifique à la structure chimique de la molécule et les ions (ou fragments) observés constituent en quelque sorte son "empreinte digitale".

La molécule M, éluée sous forme gazeuse de la colonne chromatographique, est ionisée par un faisceau d'électrons avec formation de l'ion moléculaire M^+ . Cet ion est instable et se fragmente ensuite en ions de plus faibles masses, lesquels sont séparés au niveau du quadripôle du spectromètre de masse.

L'analyseur de masse permet de disperser le faisceau d'ions moléculaires et de fragments obtenus dans la chambre d'ionisation en faisceaux d'ions caractérisés par leur rapport m/z . Ainsi, les ions sont transmis par un filtre dans l'ordre croissant ou décroissant des valeurs m/z .

Le détecteur est constitué d'un collecteur qui recueille le signal ionique produisant un courant d'électrons proportionnel à l'abondance de chaque ion. Ce courant électronique est amplifié par un multiplicateur d'électrons, puis transformé en un signal logique, utilisable par un ordinateur. Ainsi, les valeurs des rapports m/z sont proportionnelles aux amplitudes des voltages enregistrés et sont calculées par rapport à un calibrage électronique préalablement réalisé au moyen de composés de référence présentant des espèces ioniques connues dans toute la gamme des masses étudiées. Il est ainsi possible d'identifier les molécules marquées par le nombre et la position d'atome(s) lourd(s).

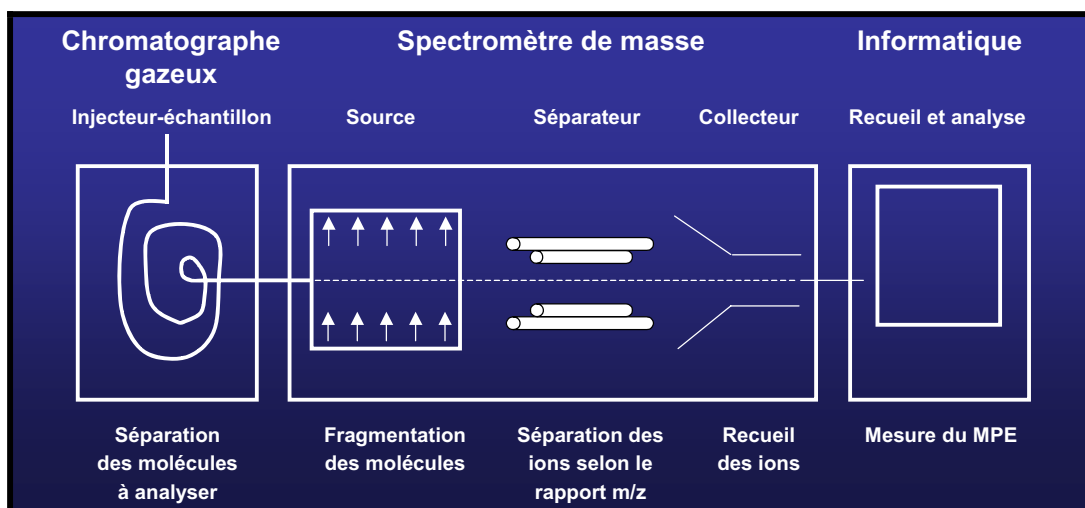


Figure 72 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse couplé à une chromatographie en phase gazeuse.

Figure issue de Vincent *et al.* [Vincent, 2003].

1.4.2 L'analyse du profil des isotopomères de masse

L'enrichissement isotopique d'une molécule marquée par le métabolisme d'un traceur est exprimé en termes de pourcentage d'enrichissement molaire (MPE). Ceci représente la proportion de molécules enrichies avec un nombre donné d'isotopes lourds par rapport à la totalité des autres molécules. Le MPE absolu de chaque isotopomère de masse marqué au ^{13}C (M_i) d'un métabolite donné, se calcule de la façon suivante :

$$\text{MPE}(M_i) = \% A_{M_i} / [A_M + \sum A_{M_i}]$$
 où A_M et A_{M_i} représente l'aire sous la courbe du pic chromatographique corrigée pour l'abondance isotopique naturelle, correspondant aux isotopomères de masses non marqués (M) et marqués au ^{13}C (M_i) respectivement où "i" représente le nombre d'atomes de carbone présents dans la molécule ou dans le fragment analysé.

Quelle que soit la façon d'exprimer l'enrichissement isotopique d'une substance, il faut déduire l'abondance naturelle des isotopes lourds. Plusieurs méthodes [Des Rosiers, Montgomery *et al.*, 1988; Mamer, 1988; Fernandez, Des Rosiers *et al.*, 1996] permettent

d'effectuer cette correction. Le principe de la méthode de correction utilisée dans cette étude, soit celle développée par Mamer [Mamer, 1988] et Des Rosiers [Des Rosiers, Montgomery *et al.*, 1988], est de résoudre une série de "n" équations à "n" inconnues, où "n" est égal au nombre d'ions analysés par CGSM.

1.4.3 Calcul de la contribution relative des diverses voies métaboliques.

La contribution relative des voies métaboliques permettant la formation d'oxaloacétate (OAA) et d'acétyl-CoA, les deux substrats de la citrate synthase, est déterminée par l'analyse des cœurs perfusés en présence de divers mélanges de substrats marqués au carbone 13 (le U-¹³C]oléate et le [U-¹³C]glucose), lorsque l'équilibre isotopique est atteint, soit après 20 minutes de perfusion.. Le calcul de la contribution relative des diverses voies métaboliques nécessite la détermination, par analyses en CGSM, de la distribution des isotopomères de masse du pyruvate ainsi que de la portion acétyl et OAA de la molécule de citrate.

La contribution à la formation d'acétyl-CoA du i) glucose via la décarboxylation du pyruvate et de ii) l'oléate via la bêta-oxydation sont exprimées en synthèse relative de citrate et sa partie oxaloacétate à partir de laquelle nous extrapolons la partie du citrate.

La glycolyse, c'est à dire la production de lactate et pyruvate, a été évaluée par le produit du débit coronaire et des concentrations de lactate et pyruvate dans les perfusats issus de l'influent et effluent coronaires par CGSM et méthodes enzymatiques.

Tous les calculs permettant de déterminer la contribution relative des diverses voies métaboliques sont décrits en détails dans l'article de Comte *et al.* [Comte, Vincent *et al.*, 1997a].

1.4.4 Calcul de la production d'ATP cytosolique et mitochondriale

Les productions d'ATP cytosolique et mitochondriale sont déterminées respectivement à partir de i) la glycolyse et de ii) la MVO₂ en supposant un rendement énergétique ATP produit/oxygène de 2,83 [Khairallah, Labarthe *et al.*, 2004].

1.4.5 Métabolites myocardiques

Les concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie, ATP, ADP, AMP et PCr, ont été évaluées en chromatographie liquide à haute performance (HPLC), technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou un mélange de composés. Ces dosages ont été réalisés par l'équipe du Dr. G. Brownsey du laboratoire « Biochemistry and Molecular Biology, Life Sciences Institute, University » (Colombie Britannique, Vancouver, Canada) [Allard, Parsons *et al.*, 2007].

1.5 Analyse statistique

Les résultats physiologiques ont été comparés grâce à une analyse ANOVA à 2 voies suivie d'un post-test de Bonferroni lorsque l'analyse de variance était significative. Les paramètres métaboliques ont été étudiés par une analyse ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Bonferroni a été réalisée ou un test-t non pairé pour l'effet du pacing en comparaison au groupe contrôle.

2. Résultats

2.1 Phénotypage fonctionnel

Les paramètres physiologiques des cœurs isolés et perfusés en mode travaillant ont été comparés après 40 min de perfusion en conditions normoxiques, et absence (groupe contrôle) ou en présence d'IVA à la dose de 3 μ M (groupes IVA) sans ou avec stimulation auriculaire (groupe IVA + pacing).

L'analyse montre que l'ajout d'IVA au liquide de perfusion a induit une réduction de la fréquence cardiaque de l'ordre de 35% (** $p < 0,001$ à 40 min vs. groupe contrôle ; Figure 73) et en une augmentation du volume d'éjection systolique d'environ 39% (** $p < 0,01$ à 40 min vs. groupe contrôle ; Figure 74). De plus, le débit coronaire global reste inchangé tout au long des perfusions (Figure 75A) alors que le débit coronaire rapporté par battement cardiaque est significativement augmenté dans le groupe IVA (** $p < 0,001$ à 40 min vs. groupe contrôle ; Figure 75B), suggérant une meilleure perfusion myocardique.

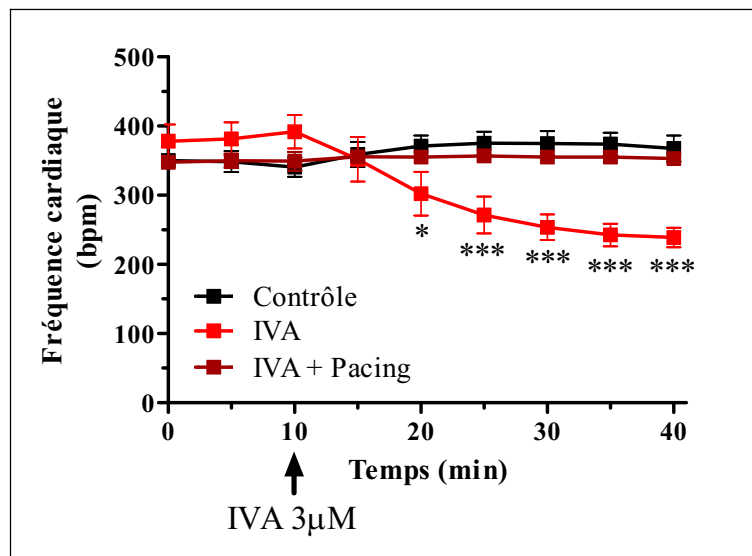


Figure 73 : Impact de l'IVA (3 μ M) sur la fréquence cardiaque.

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. contrôle.

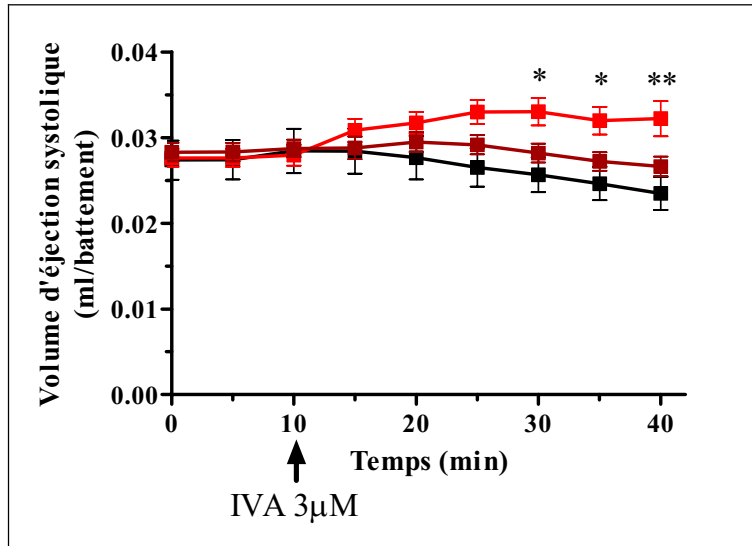


Figure 74 : Impact de l'IVA (3µM) sur le volume d'éjection systolique.

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. contrôle.

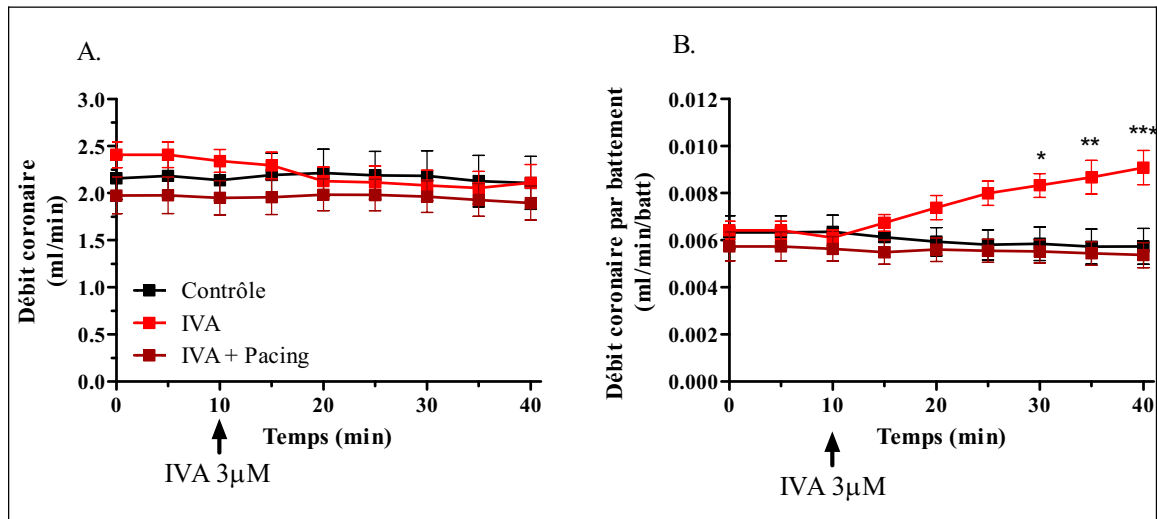


Figure 75 : Impact de l'IVA sur le débit coronaire exprimé en ml/min (A) ou en ml/batt (B).

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. contrôle ; \$ $p < 0,05$ T : 40 min vs. T : 10 min.

Par ailleurs, il est important de noter que la pression développée ventriculaire gauche (PDVG) ainsi que la contractilité et relaxation myocardique ($dp/dt_{\min/\max}$) restent inchangées après administration d'IVA avec ou sans pacing auriculaire (Tableau 1).

Enfin, il est intéressant de noter que dans notre modèle de cœur isolé *ex vivo* où la compliance et les pré- et postcharge étaient fixées tout au long des expérimentations sans adaptation possible, la consommation d'oxygène globale (MVO_2) n'est pas modifiée par l'ajout d'IVA et est augmentée lorsqu'elle est rapportée par battement cardiaque (MVO_2 /battement) (***) $p < 0,001$ vs. contrôle ; Tableau 30). Ceci est en concordance avec l'augmentation du volume d'éjection systolique et du débit coronaire exprimé par battement cardiaque.

Tableau 30 : Impact de l'IVA avec ou sans pacing auriculaire sur les paramètres physiologiques et fonctionnels de cœurs isolés perfusés en mode travaillant.

Effet traitement (40 min ; vs. contrôle)	Contrôle	IVA (3 μ M)	IVA (3 μ M) + Pacing
FC (bpm)	368 \pm 19	239 \pm 14 ***	368 \pm 19
PSVG (mmHg)	95 \pm 4	107 \pm 5	100 \pm 3
P-min (mmHg)	-1,09 \pm 0,02	-3,61 \pm 0,02	-4,52 \pm 0,02
PDVG (mmHg)	86 \pm 4	97 \pm 6	92 \pm 4
+dP/dt _{max} (mmHg.s ⁻¹)	5168 \pm 381	5446 \pm 625	5412 \pm 222
-dP/dt _{min} (mmHg.s ⁻¹)	-3672 \pm 324	-4056 \pm 418	-4112 \pm 218
Produit pression-fréquence (mmHg/batt/min)	31242 \pm 2260	22884 \pm 2303	32432 \pm 1407
Débit aortique (ml/min)	6,32 \pm 0,67	5,44 \pm 0,52	7,24 \pm 0,48
Débit aortique/battement (ml/min/batt)	0,018 \pm 0,002	0,023 \pm 0,001	0,021 \pm 0,001
Débit coronaire (ml/min)	2,06 \pm 0,26	2,11 \pm 0,19	1,90 \pm 0,18
Débit coronaire/battement (ml/min/batt)	0,006 \pm 0,001	0,009 \pm 0,001 ***	0,005 \pm 0,001
Débit cardiaque (ml/min)	8,38 \pm 0,77	7,55 \pm 0,69	9,39 \pm 0,42
Volume d'éjection systolique (ml/batt)	0,023 \pm 0,002	0,032 \pm 0,002 **	0,027 \pm 0,001
Puissance cardiaque (mWatts/batt)	0,005 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001	0,005 \pm 0,000
Efficacité cardiaque (mWatts/mmolO ₂ /min/batt)	0,004 \pm 0,001	0,005 \pm 0,000	0,005 \pm 0,001
MVO ₂ (μ mol/min)	1,3 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1
MVO ₂ /battement (μ mol/batt)	0,004 \pm 0,000	0,006 \pm 0,000 ***	0,004 \pm 0,000
LDH (mU/min)	24,1 \pm 3,5	35,3 \pm 7,3	20,0 \pm 3,4

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$ vs. groupe contrôle. FC, fréquence cardiaque ; LDH : lactate déshydrogénase ; PSVG, pression systolique ventriculaire gauche ; PDVG, pression développée ventriculaire gauche ; MVO₂, consommation d'oxygène.

Tous les effets de l'IVA mentionnés ci-dessus ont été abolis par l'application d'une stimulation auriculaire qui avait pour objectif le retour à une fréquence cardiaque initiale. Ceci indique que les effets de l'IVA observés ici sont uniquement dus à la réduction de la fréquence cardiaque qu'elle induit.

2.2 Résultats métaboliques

2.2.1 Flux métaboliques

La Figure 76 illustre les flux métaboliques nécessaires à la production d'énergie qui ont été évalués dans des cœurs isolés de souris perfusés en mode travaillant. Les effets de l'IVA sur la contribution de l'oléate et du glucose à la formation d'acétyl-CoA pour la production de citrate ont été évalués.

L'administration aigue d'IVA au milieu de perfusion, avec ou sans pacing, n'a induit aucune modification de la contribution de l'oléate ($19,7 \pm 1,2\%$ dans le groupe IVA vs. $19,9 \pm 2,9\%$ dans le groupe contrôle) et du glucose ($28,3 \pm 3,9\%$ dans le groupe IVA vs. $30,2 \pm 1,2\%$ dans le groupe contrôle) à la formation d'acétyl-CoA pour la synthèse de citrate et du glucose à la production énergétique. De plus, aucune différence n'est observée en ce qui concerne le taux de la glycolyse évaluée à partir de la production de lactate et pyruvate marqués au ^{13}C .

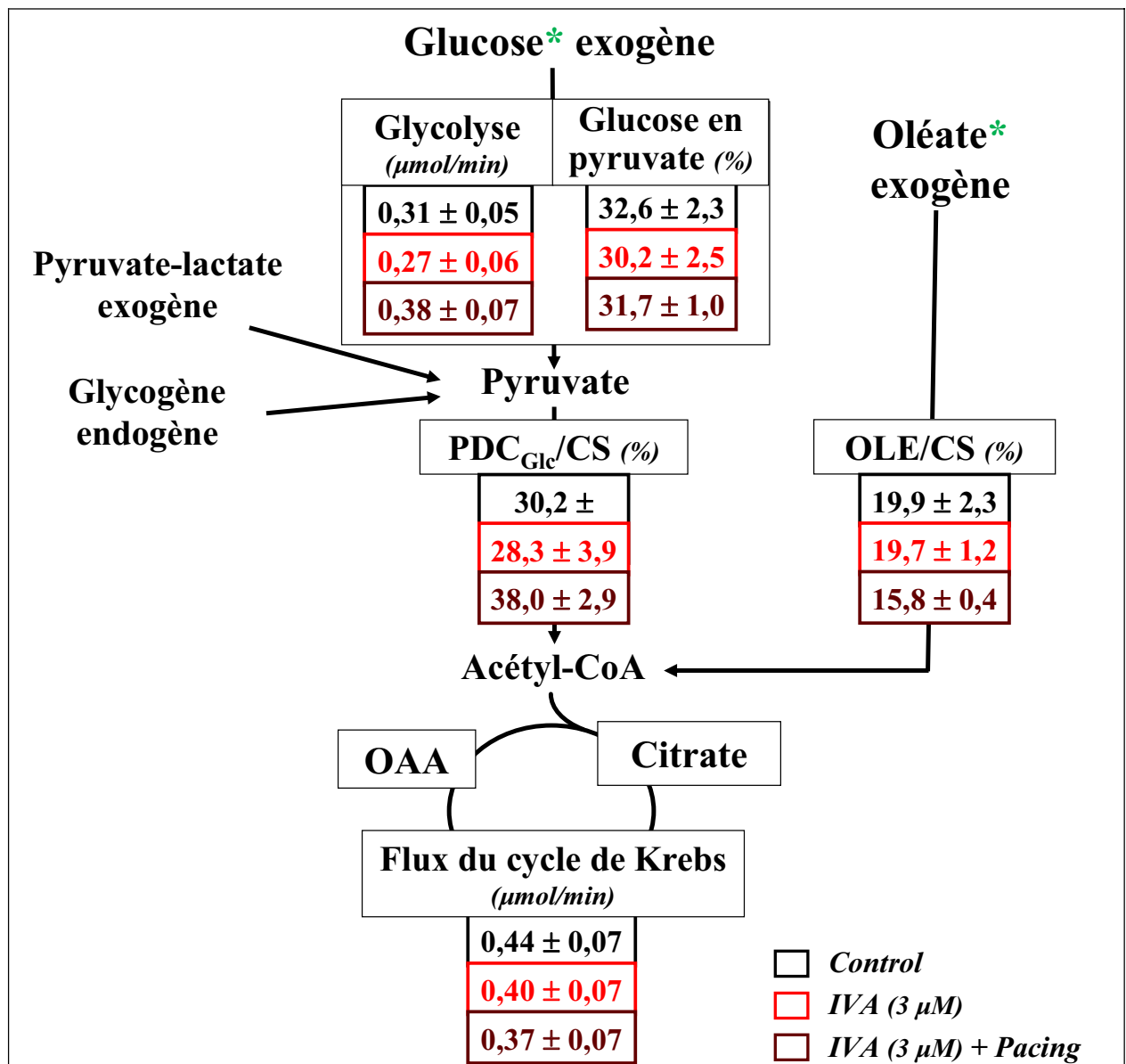


Figure 76 : Contribution relative du glucose et de l'oléate à la production d'acétyl-CoA mitochondriale pour la synthèse de citrate et flux de la glycolyse.

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

La contribution à la formation d'acétyl-CoA du i) glucose via la décarboxylation du pyruvate (PDC_{Glc}) et de ii) l'oléate (OLE) via la bêta-oxydation sont exprimées en synthèse relative de citrate (CS) et sa partie oxaloacétate (OAA) à partir de laquelle nous extrapolons la partie du citrate.

2.2.2 Production énergétique

Les productions d'ATP cytosolique et mitochondriale sont déterminées respectivement à partir de i) la glycolyse et de ii) la MVO_2 en supposant un rapport ATP/oxygène de 2,83.

L'analyse démontre que la production d'ATP cytosolique et mitochondriale d'un point de vue global, c'est-à-dire exprimée par minute, est inchangée quelque soit les conditions (groupe contrôle, IVA ou IVA + Pacing) (Figure 77). Cependant, lorsque ces productions sont rapportées par battement cardiaque, elles sont significativement augmentées dans le groupe ayant été perfusé avec de l'IVA (* $p < 0,05$ vs. contrôle). L'application du pacing auriculaire a entraîné un retour de ces productions à une valeur semblable au groupe contrôle (Figure 78).

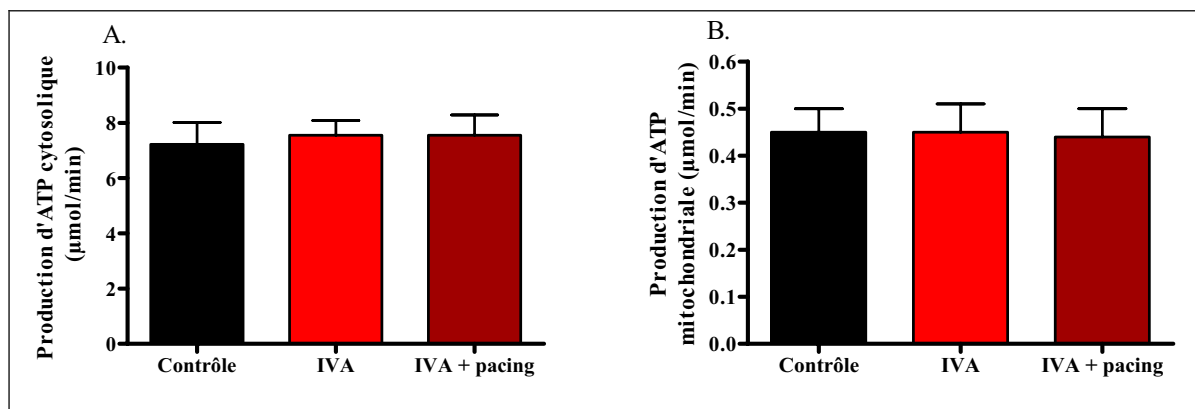


Figure 77 : Production d'ATP cytosolique (A) et mitochondriale (B) exprimée par minute.

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. contrôle.

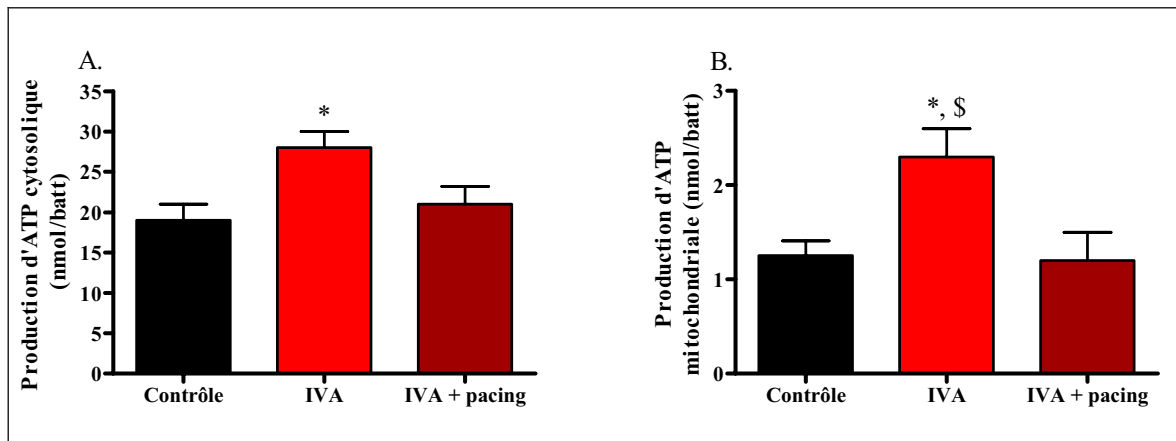


Figure 78 : Production d'ATP cytosolique (A) et mitochondriale (B) exprimée par battement cardiaque. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. contrôle et \$ $p < 0,05$ vs. IVA + Pacing.

2.2.3 Statut énergétique

Enfin, le dosage des phosphates à haute énergie (PCr, ATP, ADP et AMP) n'a révélé aucune différence significative suite à l'administration d'IVA (Tableau 3). Le dosage n'a été réalisé que dans le groupe IVA car l'objectif principal était d'étudier l'effet métabolique de l'administration aiguë d'IVA au milieu de perfusion. Ces résultats suggèrent que l'IVA n'induit aucune modification du statut énergétique myocardique.

Tableau 31 : Concentration des phosphates myocardique à haute énergie dans des cœurs isolés perfusés en mode travaillant.

Phosphates à haute énergie ($\mu\text{mol/gww}$)	Contrôle	IVA (3 μM)
Créatine	3,12 \pm 0,38	3,44 \pm 0,20
Phosphocréatine	0,92 \pm 0,16	1,16 \pm 0,11
AMP	0,28 \pm 0,06	0,33 \pm 0,05
ADP	0,43 \pm 0,03	0,49 \pm 0,02
ATP	0,88 \pm 0,15	1,03 \pm 0,12

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que dans un cœur sain normoxique, l'ajout d'IVA au milieu de perfusion, avec ou sans stimulation auriculaire donc avec ou sans réduction de la fréquence cardiaque, n'affecte pas la sélection des substrats pour la production énergétique ainsi que le statut énergétique global cardiaque.

2.2.4 Impact métabolique du pacing seul

Dans un autre groupe, nous avons évalué l'impact du pacing seul. Pour cela, la stimulation auriculaire a été effectuée 10% au dessus de la fréquence cardiaque afin d'être en rythme sinusal. La stimulation auriculaire seule tend à diminuer la glycolyse ($0,47 \pm 0,07$ vs. $0,67 \pm 0,14$ groupe contrôle, n.s.) et l'oxydation du glucose.

Tableau 32 : Impact du pacing sur la sélection des substrats pour la production énergétique.

	Contrôle	Pacing
Glycolyse ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	$0,67 \pm 0,14$	$0,47 \pm 0,07$
Glucose en pyruvate (%)	$32,60 \pm 2,31$	$36,89 \pm 0,29$
Glucose en acétyl-CoA (%)	$30,22 \pm 1,90$	$36,81 \pm 1,49$
Oléate en acétyl-CoA (%)	$41,67 \pm 4,78$	$33,09 \pm 2,60$
Glycolyse/Flux cycle de Krebs	$1,83 \pm 0,35$	$1,17 \pm 0,08$

2.3 Le métoprolol

2.3.1 Phénotypage fonctionnel

Dans cette étude, nous avons tenté d'obtenir une réduction de la fréquence cardiaque similaire à celle obtenue avec l'IVA, par administration de METO à la dose de 4 μ M, mais sans résultat. En effet, l'administration de METO à la dose de 4 μ M n'a induit aucune réduction significative de la fréquence cardiaque (Figure 79) et aucune modification du volume d'éjection systolique (Figure 80). Par ailleurs, aucune autre modification de la fonction cardiaque n'est observée après l'ajout de METO 4 μ M au liquide de perfusion (Tableau 33).

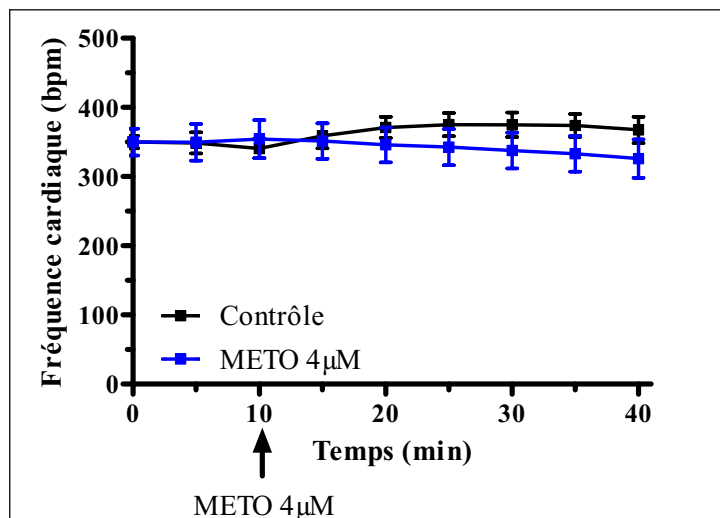


Figure 79 : Impact du METO 4 μ M sur la fréquence cardiaque.

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

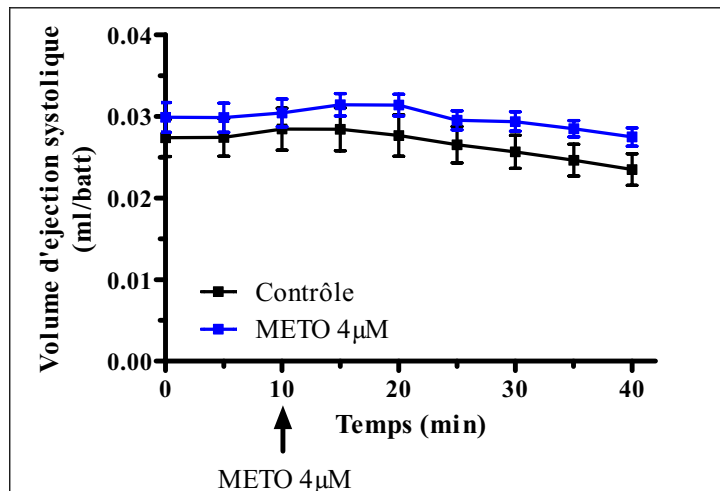


Figure 80 : Impact du METO 4 µM sur le volume d'éjection systolique.

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM.

Afin de tenter d'obtenir une réduction de la fréquence cardiaque semblable à celle obtenue avec l'IVA la dose de METO a été augmentée jusqu'à 40 µM (N=3). Cependant, cette forte dose n'est pas sans effet délétère. En effet, le METO à 40 µM a réduit la fréquence cardiaque d'environ 20% (n.s. car beaucoup de variabilité ; Figure 81), mais a également induit une altération importante :

- i) de la contractilité de -36% (\$\$ p<0,01 T : 40 min vs. T : 10 min), et la relaxation myocardique de +47% (\$\$\$ p<0,001 T : 40 min vs. T : 10 min) (Figure 83),
- ii) du débit cardiaque -48,5% (\$\$\$ p<0,001 T : 40 min vs. T : 10 min ; Figure 82.A),
- iii) du volume d'éjection systolique de -34,5% (\$\$ p<0,01 T : 40 min vs. T : 10 min ; Figure 82.B).

Ces modifications fonctionnelles importantes sont apparues avant la baisse de la fréquence cardiaque (Figure 81 et Tableau 33).

Ainsi, à la dose de 40 µM, les cœurs isolés et perfusés en mode travaillant ont une fonction cardiaque instable rendant difficile la mesure des flux métaboliques.

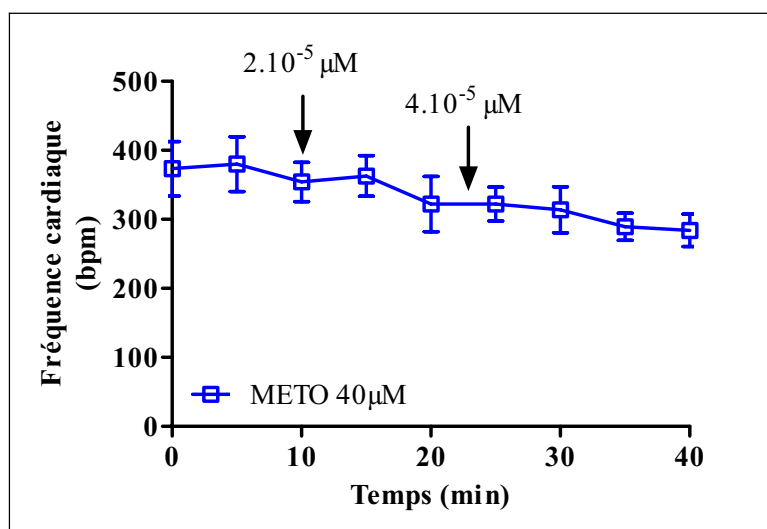


Figure 81 : Impact du METO 40 μM sur la fréquence cardiaque de cœurs isolés et perfusés en mode travaillant.
Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

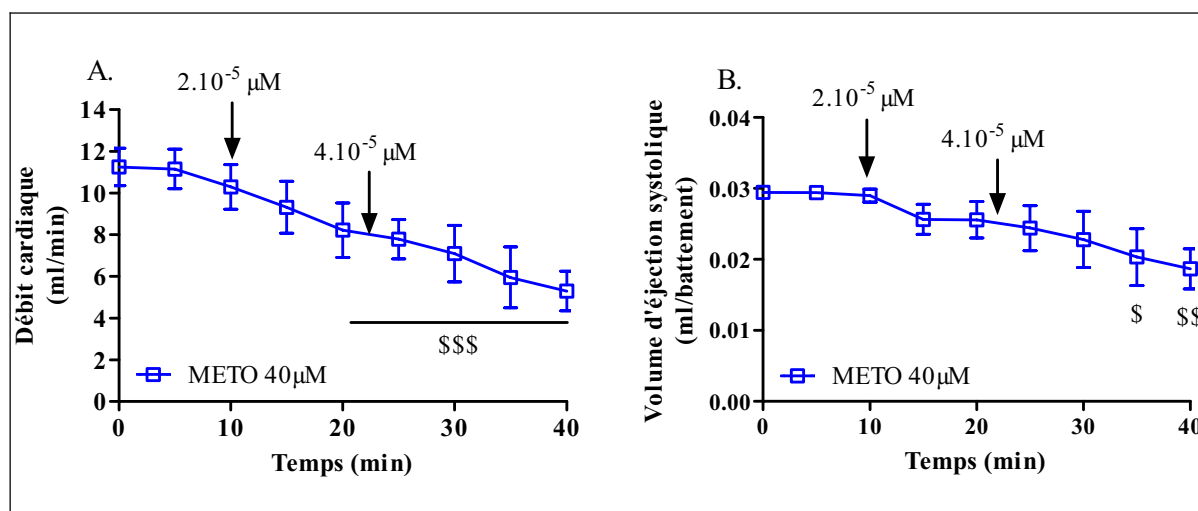


Figure 82 : Impact du METO 40 μM sur le débit cardiaque (A) et le volume d'éjection systolique (B) de cœurs isolés et perfusés en mode travaillant.
Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.
\$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$ et \$\$\$ $p < 0,001$ T : 40 min vs. T : 10 min.

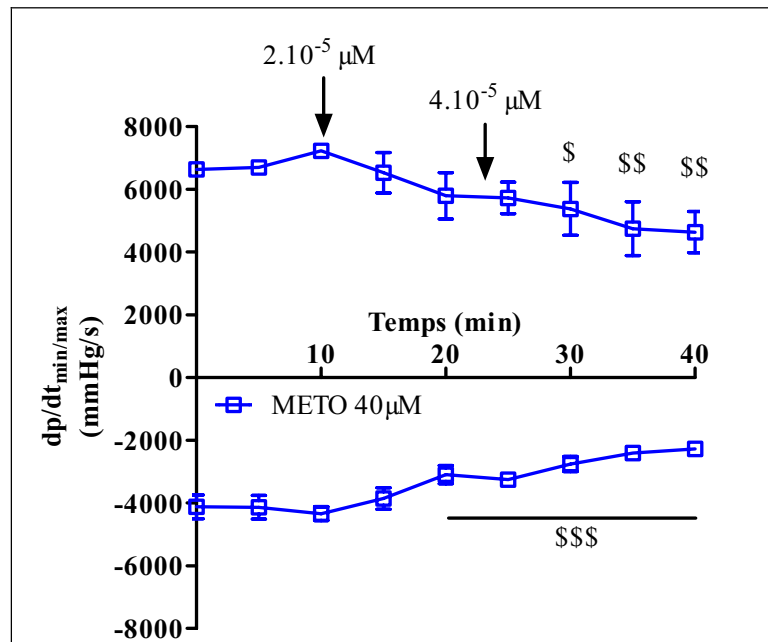


Figure 83 : Impact du METO 40 µM sur la contractilité et la relaxation myocardique de cœurs isolés et perfusés en mode travaillant.

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \$ p<0,05 et \$\$ p<0,01 T : 40 min vs. T : 10 min.

Tableau 33 : Impact de l'administration du METO à 4 et 40 µM sur les paramètres physiologiques des cœurs isolés et perfusé en mode travaillant.

Effet traitement (T : 40 min vs. contrôle)	Contrôle	METO (4 µM)	METO (40 µM)
FC (bpm)	368 ± 19	326 ± 28	284 ± 24
PSVG (mmHg)	95 ± 4	99 ± 4	89 ± 5
P-min (mmHg)	-1,09 ± 0,02	-1,45 ± 1,26	3,63 ± 0,51
PDVG (mmHg)	86 ± 4	89 ± 5	76 ± 8
+dp/dt _{max} (mmHg.s ⁻¹)	5168 ± 381	4650 ± 399	4634 ± 658
-dp/dt _{min} (mmHg.s ⁻¹)	-3672 ± 324	-3511 ± 257	2277 ± 118
Produit pression-fréquence (mmHg/batt/min)	31242 ± 2260	28912 ± 2732	21882 ± 3457
Débit aortique (ml/min)	6,32 ± 0,67	3,92 ± 0,61	3,37 ± 0,96
Débit aortique/battement (ml/min/batt)	0,018 ± 0,002	0,021 ± 0,001	0,012 ± 0,003
Débit coronaire (ml/min)	2,06 ± 0,26	2,04 ± 0,26	1,94 ± 0,39
Débit coronaire/battement (ml/min/batt)	0,006 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,002
Débit cardiaque (ml/min)	8,38 ± 0,77	8,86 ± 0,69	5,30 ± 0,95
Volume d'éjection systolique (ml/batt)	0,023 ± 0,002	0,027 ± 0,001	0,019 ± 0,003
Puissance cardiaque (mWatts/batt)	0,005 ± 0,001	0,018 ± 0,003	0,003 ± 0,001
Efficacité cardiaque (mWatts/mmO ₂ /min/batt)	0,004 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,003 ± 0,001
MVO ₂ (µmol/min)	1,3 ± 0,20	1,26 ± 0,10	3,74 ± 0,18
MVO ₂ /battement (µmol/batt)	0,004 ± 0,000	0,004 ± 0,001	0,004 ± 0,001
LDH (mU/min)	24,1 ± 3,5	38,9 ± 8,3	40,5 ± 10,1

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. * p<0,05 et *** p<0,001 vs. contrôle.

2.3.2 Phénotypage métabolique

D'un point de vue métabolique, l'administration de METO à faible dose (4 μ M) n'induit aucune modification significative sur la sélection des substrats pour la production énergétique, malgré une tendance à la baisse de la contribution en oléate exogène (20%, non significatif) pour la formation d'acétyl-CoA.

Cependant, des modifications importantes apparaissent après l'ajout du METO à forte dose (40 μ M) au liquide de perfusion. En effet, une diminution significative de la glycolyse (***) $p < 0,001$ vs. contrôle) est observée. En outre, le METO à forte dose tend à réduire la proportion de glucose transformé en pyruvate et en acétyl-CoA mais de façon non significative qui s'explique par le faible échantillon (N=3) (Tableau 34).

Tableau 34 : Impact du METO à 4 μ M et 40 μ M sur la sélection des substrats pour la production énergétique.

	Contrôle	METO 4 μ M	METO 40 μ M
Glycolyse (μ mol/min)	0,67 \pm 0,16	0,45 \pm 0,09	0,17 \pm 0,07***
Glucose en pyruvate (%)	32,6 \pm 2,3	31,1 \pm 2,1	18,3 \pm 7,2
Glucose en acétyl-CoA (%)	30,2 \pm 2,1	29,2 \pm 4,1	23,9 \pm 8,0
Oléate en acétyl-CoA (%)	19,9 \pm 2,3	15,8 \pm 2,9	N/D
Glycolyse/flux du cycle de Krebs	1,86 \pm 0,35	1,15 \pm 0,18	0,46 \pm 0,16*

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ vs. contrôle. N.D. : non déterminé.

3. Discussion

Cette étude avait pour objectif l'évaluation de l'impact métabolique d'une réduction de la fréquence cardiaque induite par l'IVA sur un cœur sain en conditions normoxiques. Pour cela, le modèle de cœurs isolés et perfusés *ex vivo* en mode travaillant par des substrats marqués au ^{13}C , modèle bien établi au laboratoire du Dr. Ch. DES ROSIERS, a été utilisé. Grâce à ce modèle, les effets de l'IVA sur le métabolisme et la fonction cardiaque ont été étudiés en l'absence de toute influence neuro-hormonale et sans adaptation possible de la compliance artérielle périphérique (fixée par la chambre de compliance). Des cœurs sains de souris (3 mois) ont été perfusés par un mélange de substrats en concentration physiologique mimant ainsi la composition sanguine, et à pré- et postcharge fixes.

La dose de 3 μM d'IVA a été choisie d'après les données de la littérature et une étude pilote à été réalisées *in vitro* afin d'obtenir une réduction de la fréquence cardiaque de l'ordre de 20% [Ceconi, Cargnoni *et al.*, 2009]. Cependant, avec notre modèle *ex vivo*, la réduction de la fréquence cardiaque obtenue était de l'ordre de 35%, donc supérieure à la cible clinique recherchée.

Toutefois, nos données sont en accords avec les études antérieures [Ferrari, Cargnoni *et al.*, 2006; Heusch, Skyschally *et al.*, 2008]. En effet, nous rapportons que l'IVA est responsable d'une augmentation du volume d'éjection systolique s'expliquant par l'augmentation du temps de diastole et donc de la période de remplissage. Cet effet est associé à une augmentation du débit coronaire par battement cardiaque ce qui reflète une meilleure perfusion myocardique. De manière intéressante les autres paramètres fonctionnels n'ont pas été affectés par l'ajout d'IVA au milieu de perfusion. De plus, nos résultats démontrent que l'effet de l'IVA sur le volume d'éjection systolique et la perfusion myocardique sont

directement liés à la réduction de la fréquence cardiaque car ils sont abolis par l'application d'une stimulation auriculaire ramenant la fréquence cardiaque à une valeur initiale.

Les effets observés de l'IVA sur la perfusion coronaire explique au moins en partie, son action anti-ischémique [Vaillant, Timour *et al.*, 2008; Ceconi, Cargnoni *et al.*, 2009], puisque dans ces conditions, l'apport en oxygène aux cardiomyocytes est amélioré. Ceci pourrait réduire le risque d'hétérogénéité fonctionnelle et électrophysiologique, un indice de dysfonction de canaux ioniques et de la durée du potentiel d'action [Indolfi, Guth *et al.*, 1991; Stoll, Quentin *et al.*, 2008]. Un tel effet pourrait également être bénéfique lors d'un pontage coronarien en améliorant la perfusion globale myocardique.

En accord avec l'augmentation du volume d'éjection systolique et du débit coronaire par battement cardiaque, nous avons observé également une augmentation de la consommation d'oxygène exprimée par battement, alors qu'aucune modification n'est rapportée pour la consommation d'oxygène exprimée par minute. Cela semble contradictoire avec les résultats rapportés dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque [Mulder and Thuillez, 2006] dans lequel la l'IVA a permis une réduction de la consommation d'oxygène cardiaque (exprimé par minute). Toutefois, il est important de considérer que le cœur isolé et dénervé est perfusé avec une solution cristalline qui possède une capacité plus faible que le sang pour le transport de l'oxygène, et que les pré-, postcharge et la compliance sont fixes tout au long des expérimentations, ne permettant aucune adaptation fonctionnelle. Dans un modèle de cœur isolé tel que celui-ci, le débit coronaire ainsi que la consommation d'oxygène varie en réponse à des changements de la postcharge [Labarthe, Khairallah *et al.*, 2005]. Or, *in vivo*, le cœur est également contrôlé par le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) modifiant les conditions de charge cardiaque, ce qui explique l'effet de l'IVA sur la consommation en oxygène.

D'un point de vue métabolique, nos données de flux relatifs obtenues grâce au modèle de cœur isolé perfusé démontrent qu'une réduction de la fréquence cardiaque d'environ 35% induite par l'IVA n'induit aucune modification i) de la sélection des substrats pour la production d'énergie, ii) du rendement de la glycolyse ou iii) du statut énergétique objectivé par le dosage des phosphates à haute énergie dont on sait qu'ils subissent une altération lors d'hypertrophie ou d'insuffisance cardiaque [Neubauer, 2007].

De plus, le taux de production d'ATP tel qu'évalué au niveau i) cytosolique à partir du rendement de la glycolyse mesuré (1 mole d'ATP par mole de lactate produit, ce qui représente généralement 5 à 10% de la production totale d'ATP cellulaire) et ii) mitochondriale à partir de la consommation d'oxygène mesurée en considérant un ratio ATP/O théorique de 2,83 [Khairallah, Labarthe *et al.*, 2004] ne diffèrent pas entre les groupes lorsqu'ils sont exprimés par minute. Cependant, cette production est significativement augmentée dans le groupe IVA lorsqu'elle est exprimée par battement cardiaque. Ceci est en accord avec l'augmentation du volume d'éjection systolique rapporté ci-dessus et supporte un bon couplage entre l'apport et la demande énergétique.

Par ailleurs, l'application d'une stimulation auriculaire dans les cœurs isolés ayant été perfusé avec de l'IVA permet un retour à des valeurs basales des paramètres fonctionnels. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes réalisées sur des modèles animaux *in vivo* et *ex vivo* [Colin, Ghaleh *et al.*, 2002; Colin, Ghaleh *et al.*, 2003; Ceconi, Cargnoni *et al.*, 2009].

Dans notre étude, l'application de la stimulation auriculaire sur des cœurs sains normoxiques en absence d'IVA, à une fréquence physiologique de 400 bpm (non différent de la fréquence cardiaque des contrôles) a eu des effets marginaux sur les paramètres

fonctionnels et énergétiques. Ces résultats soulignent l'importance d'étudier dans des travaux futurs, l'impact d'une stimulation auriculaire seule.

Métoprolol

Dans cette étude, nous avons également comparé les effets de l'IVA à ceux du métoprolol (METO), bêta-bloquant largement utilisé en clinique. Tout d'abord, nous avons testé des concentrations de METO de 4 à 40 μM , selon les données rapportées dans la littérature [Di Verniero, Hocht *et al.*, 2007; Wang, Zaragoza *et al.*, 2007]. À la dose de 4 μM nous n'avons observé que des effets marginaux et non significatifs tant sur la fréquence cardiaque que sur les flux métaboliques.

Par la suite, la dose de METO a été augmentée à 40 μM afin d'obtenir une réduction de la fréquence cardiaque semblable à celle obtenue avec l'IVA. Cependant, seule une réduction marginale de la fréquence cardiaque a été observée dans notre modèle. En outre, cette concentration élevée de METO est responsable d'une altération de la fonction cardiaque dont une chute importante de la contractilité et du débit cardiaque. De plus, l'analyse des flux métaboliques a révélé une diminution de la glycolyse en accord avec les résultats rapportés par l'équipe de Sharma *et al.* [Sharma, Dhillon *et al.*, 2008]. Cependant, le métabolisme énergétique cardiaque est étroitement lié à la fonction cardiaque, ainsi nous ne pouvons exclure la possibilité que les modifications induites par l'administration de METO sur la sélection des substrats pour la production d'énergie ne soient secondaires aux altérations de la fonction cardiaque.

Afin d'expliquer les différences rapportées entre l'IVA et le METO sur la contractilité et le débit cardiaque dans notre modèle de cœur isolé et perfusé, plusieurs facteurs sont à prendre en compte. Tout d'abord, l'efficacité de ces molécules *in vivo* a principalement été démontrée en conditions d'augmentation de la fréquence cardiaque, comme par exemple lors d'une stimulation sympathique, d'un exercice physique ou de conditions pathologiques [Kalaycioglu, Sinci *et al.*, 1999; Abbott, Broadstone *et al.*, 2005; Gordon, Arsenault *et al.*, 2006; Di Verniero, Silberman *et al.*, 2008]. Cependant, notre modèle de cœur isolé et perfusé en mode travaillant est dépourvu de toute influence neuro-hormonale à l'exception d'une libération locale de noradrénaline issues de stocks cardiaque endogènes. De plus, les effets de l'IVA et du METO ont été testés en conditions basales c'est à dire sans augmentation de la fréquence cardiaque spontanée.

Du fait de l'action spécifique de l'IVA sur le nœud sinusal et donc la fréquence cardiaque, elle demeure efficace en conditions *ex vivo*. Les bêta-bloquants, quant à eux, exercent principalement leurs effets via des mécanismes extrinsèques au cœur qui sont donc inexistant dans nos conditions *ex vivo*. Par ailleurs, le METO est un bêta-bloquant spécifique des récepteurs beta-1. Ainsi, l'impact majoritaire du METO sur la contractilité myocardique avant la fréquence cardiaque pourrait s'expliquer par la proportion plus importante de récepteurs bêta-1 que de bêta-2 dans le myocarde (~4) par rapport au nœud sinusal [Rohrer, Desai *et al.*, 1996].

Conclusion

L'ensemble de nos résultats démontrent que, contrairement au METO, l'administration aigue d'IVA à des cœurs sains isolés et perfusés en mode travaillant en conditions normoxiques induit une réduction sélective de la fréquence cardiaque tout en préservant la sélection des substrats pour la production énergétique et l'équilibre entre la demande et les besoins énergétiques. En effet, les modifications physiologiques rapportées à la suite de l'administration d'IVA ont été abolies par l'application du pacing auriculaire démontrant ainsi sa spécificité sur la fréquence cardiaque.

Ainsi, il semble important d'étudier l'impact de l'IVA sur le métabolisme énergétique dans des modèles d'athérosclérose ou de diabète, pathologies reconnues comme étant responsable d'altérations métaboliques dont des modifications de la sélection des substrats, de la glycolyse, et/ou des altérations des concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie [Stanley, Recchia *et al.*, 2005; Neubauer, 2007].

Conclusion générale et perspectives

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif d'étudier l'impact métabolique, structurel et fonctionnel d'une baisse de la fréquence cardiaque induite par un nouvel agent thérapeutique, l'ivabradine, inhibiteur sélectif du courant I_f et de comparer ses effets à ceux obtenus avec un bêta-bloquant. Nos travaux démontrent l'effet spécifique de l'ivabradine sur la fréquence cardiaque puisqu'aucune autre modification électrophysiologique, hémodynamique ou métabolique directe, n'a été rapportée ni dans un modèle *in vivo* d'ischémie myocardique aigue ni dans un modèle *ex vivo* en conditions normoxiques, contrairement aux bêta-bloquants.

La première partie de ce travail réalisée *in vivo* démontre pour la première fois, que l'ivabradine diminue la propension à la fibrillation ventriculaire induite par une ischémie myocardique aigue et que cet effet cardioprotecteur est principalement lié à la baisse de la fréquence cardiaque. De plus, l'augmentation spécifique de la durée de diastole induite par l'ivabradine s'accompagne d'un maintien de la durée des potentiels d'action monophasique corrigée et d'une amélioration de la perfusion myocardique ce qui explique, du moins en partie, la moindre altération de l'ultrastructure cardiomyocytaire principalement mitochondriale ainsi que des concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie lors d'ischémie aigue.

La deuxième partie de ce travail confirme la spécificité d'action de l'ivabradine sur la fréquence cardiaque dans notre modèle *ex vivo* de cœur travaillant perfusé en conditions normoxiques, donc dépourvu de toute influence neuro-hormonale. L'administration aigue d'ivabradine au milieu de perfusion n'était accompagnée d'aucune modification de la sélection des substrats pour la production d'énergie ou des concentrations myocardiques en phosphates à haute énergie, confirmant ainsi les résultats rapportés précédemment *in vivo*. Cependant, il reste à étudier sur notre modèle de cœur isolé et perfusé, l'impact de l'apport de l'ivabradine sur le métabolisme énergétique dans des modèles d'athérosclérose ou de diabète. Ces pathologies sont reconnues comme étant responsables d'altérations métaboliques telles que modifications de la sélection des substrats, de la glycolyse, et/ou des altérations des concentrations myocardiques en phosphates à haut potentiel en énergie [Stanley, Recchia *et al.*, 2005; Neubauer, 2007]. De telles altérations limitent d'ailleurs l'emploi de certains médicaments, bêta-bloquants, par exemple.

Sur le plan thérapeutique, lors d'ischémie myocardique ou après infarctus du myocarde, trois objectifs principaux sont à atteindre : i) une diminution de la demande en énergie [Bottomley, Wu *et al.*, 2009] ; ii) une amélioration des conditions tissulaires et iii) une réduction de la perte de substrats. L'ivabradine, plus encore que les bêta-bloquants, semble répondre à cette attente. Enfin, son effet spécifique sur l'automatisme sinusale lui confère la possibilité d'être efficace non seulement en prévention primaire mais également secondaire de l'infarctus du myocarde.

Bibliographie

- Abbott JA, Broadstone RV, Ward DL and Pyle RL. "Hemodynamic effects of orally administered carvedilol in healthy conscious dogs." *Am J Vet Res* **66**(4): 637-641, 2005.
- Ahn JY, Lee DS, Lee JS, Kim SK, Cheon GJ, Yeo JS, Shin SA, Chung JK and Lee MC. "Quantification of regional myocardial blood flow using dynamic H₂(15)O PET and factor analysis." *J Nucl Med* **42**(5): 782-787, 2001.
- Allard MF, Parsons HL, Saeedi R, Wambolt RB and Brownsey R. "AMPK and metabolic adaptation by the heart to pressure overload." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(1): H140-148, 2007.
- Angelos MG, Griffith RF, Beckley PD, Rath DP and Little CM. "Myocardial metabolic changes during reperfusion of ventricular fibrillation: a ³¹P nuclear magnetic resonance study in swine." *Crit Care Med* **23**(4): 733-739, 1995.
- Angelos MG, Torres CA, Waite MD, Rath DP, Zhu H, Beckley PD, Palmer BS and Robitaille PM. "Left ventricular myocardial adenosine triphosphate changes during reperfusion of ventricular fibrillation: the influence of flow and epinephrine." *Crit Care Med* **28**(5): 1503-1508, 2000.
- Angelos MG, Ward KR and Beckley PD. "Norepinephrine-induced hypertension following cardiac arrest: effects on myocardial oxygen use in a swine model." *Ann Emerg Med* **24**(5): 907-914, 1994.
- Antman EM and Berlin JA. "Declining incidence of ventricular fibrillation in myocardial infarction. Implications for the prophylactic use of lidocaine." *Circulation* **86**(3): 764-773, 1992.
- Aramendi E, de Gauna SR, Irusta U, Ruiz J, Arcocha MF and Ormaetxe JM. "Detection of ventricular fibrillation in the presence of cardiopulmonary resuscitation artefacts." *Resuscitation* **72**(1): 115-123, 2007.

- Araujo LI, Lammertsma AA, Rhodes CG, McFalls EO, Iida H, Rechavia E, Galassi A, De Silva R, Jones T and Maseri A. "Noninvasive quantification of regional myocardial blood flow in coronary artery disease with oxygen-15-labeled carbon dioxide inhalation and positron emission tomography." *Circulation* **83**(3): 875-885, 1991.
- Aupetit JF, Frassati D, Bui-Xuan B, Freysz M, Faucon G and Timour Q. "Efficacy of a beta-adrenergic receptor antagonist, propranolol, in preventing ischaemic ventricular fibrillation: dependence on heart rate and ischaemia duration." *Cardiovasc Res* **37**(3): 646-655, 1998.
- Aupetit JF, Timour Q, Larbre JP, Loufoua-Moundanga J, Kioueh I, Lopez M and Faucon G. "Arrhythmogenicity of antiarrhythmic drugs and intraventricular conduction disorders: possible aggravation by myocardial ischemia--study in the porcine in situ heart." *Cardiovasc Drugs Ther* **7**(2): 217-223, 1993.
- Aupetit JF, Timour Q, Loufoua-Moundanga J, Barral-Cadiere L, Lopez M, Freysz M and Faucon G. "Profibrillatory effects of lidocaine in the acutely ischemic porcine heart." *J Cardiovasc Pharmacol* **25**(5): 810-816, 1995.
- Avkiran M. "Basic biology and pharmacology of the cardiac sarcolemmal sodium/hydrogen exchanger." *J Card Surg* **18 Suppl 1**: 3-12, 2003.
- Azbel M. "Universal biological scaling and mortality." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12453-12457, 1994.
- Bangalore S, Parkar S, Grossman E and Messerli FH. "A meta-analysis of 94,492 patients with hypertension treated with beta blockers to determine the risk of new-onset diabetes mellitus." *Am J Cardiol* **100**(8): 1254-1262, 2007.
- Baruscotti M, Bucchi A and Difrancesco D. "Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current." *Pharmacol Ther* **107**(1): 59-79, 2005.
- Bassiouny HS, Zarins CK, Kadowaki MH and Glagov S. "Hemodynamic stress and experimental aortoiliac atherosclerosis." *J Vasc Surg* **19**(3): 426-434, 1994.
- Berg JT, JL; Stryer L. Biochemistry, 5th edition, 2008.

- Bertuglia S and Giusti A. "Microvascular oxygenation, oxidative stress, NO suppression and superoxide dismutase during postischemic reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**(3): H1064-1071, 2003.
- Bertuglia S and Giusti A. "Microvascular oxygenation and oxidative stress during postischemic reperfusion. PO₂, ROS, and NO during reperfusion." *Adv Exp Med Biol* **566**: 23-29, 2005.
- Biel M, Schneider A and Wahl C. "Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation." *Trends Cardiovasc Med* **12**(5): 206-212, 2002.
- Boengler K, Schulz R and Heusch G. "Loss of cardioprotection with ageing." *Cardiovasc Res* **83**(2): 247-261, 2009.
- Bois P and Lenfant J. "Isolated cells of the frog sinus venosus: properties of the inward current activated during hyperpolarization." *Pflugers Arch* **416**(3): 339-346, 1990.
- Borer JS, Fox K, Jaillon P and Lerebours G. "Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I(f) inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial." *Circulation* **107**(6): 817-823, 2003.
- Bottomley PA, Wu KC, Gerstenblith G, Schulman SP, Steinberg A and Weiss RG. "Reduced myocardial creatine kinase flux in human myocardial infarction: an in vivo phosphorus magnetic resonance spectroscopy study." *Circulation* **119**(14): 1918-1924, 2009.
- Brown H, Difrancesco D and Noble S. "Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters." *J Exp Biol* **81**: 175-204, 1979.
- Bui-Xuan B, Aupetit JF, Freysz M, Faucon G and Timour Q. "Prevention by calcium antagonists of profibrillatory effects of class I antiarrhythmic drugs in acute myocardial ischemia: study in pig heart in situ." *Pharmacotherapy* **17**(4): 737-745, 1997.
- Camm AJ and Lau CP. "Electrophysiological effects of a single intravenous administration of ivabradine (S 16257) in adult patients with normal baseline electrophysiology." *Drugs R D* **4**(2): 83-89, 2003.

- Cargnoni A, Ceconi C, Curello S, Benigno M, de Jong JW and Ferrari R. "Relation between energy metabolism, glycolysis, noradrenaline release and duration of ischemia." *Mol Cell Biochem* **160-161**: 187-194, 1996.
- Carvajal K and Moreno-Sanchez R. "Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases." *Arch Med Res* **34**(2): 89-99, 2003.
- Ceconi C, Cargnoni A, Francolini G, Parinello G and Ferrari R. "Heart rate reduction with ivabradine improves energy metabolism and mechanical function of isolated ischaemic rabbit heart." *Cardiovasc Res* **84**(1): 72-82, 2009.
- Chalmers GR, Roy RR and Edgerton VR. "Variation and limitations in fiber enzymatic and size responses in hypertrophied muscle." *J Appl Physiol* **73**(2): 631-641, 1992.
- Chatham JC and Blackband SJ. "Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging in animal research." *ILAR J* **42**(3): 189-208, 2001.
- Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL and Stone PH. "Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior." *J Am Coll Cardiol* **49**(25): 2379-2393, 2007.
- Clapham DE. "At last, the structure of an ion-selective channel." *Nat Struct Biol* **5**(5): 342-344, 1998.
- Clarke K and Willis RJ. "Energy metabolism and contractile function in rat heart during graded, isovolumic perfusion using ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy." *J Mol Cell Cardiol* **19**(12): 1153-1160, 1987.
- Colin P, Ghaleh B, Hittinger L, Monnet X, Slama M, Giudicelli JF and Berdeaux A. "Differential effects of heart rate reduction and beta-blockade on left ventricular relaxation during exercise." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(2): H672-679, 2002.
- Colin P, Ghaleh B, Monnet X, Su J, Hittinger L, Giudicelli JF and Berdeaux A. "Contributions of heart rate and contractility to myocardial oxygen balance during exercise." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(2): H676-682, 2003.

- Comte B, Vincent G, Bouchard B and Des Rosiers C. "Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ¹³C labeling of citrate released by perfused rat hearts." *J Biol Chem* **272**(42): 26117-26124, 1997a.
- Comte B, Vincent G, Bouchard B, Jette M, Cordeau S and Rosiers CD. "A ¹³C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts." *J Biol Chem* **272**(42): 26125-26131, 1997b.
- Cook S, Togni M, Schaub MC, Wenaweser P and Hess OM. "High heart rate: a cardiovascular risk factor?" *Eur Heart J* **27**(20): 2387-2393, 2006.
- Couvreur N, Tissier R, Pons S, Chetboul V, Gouni V, Bruneval P, Mandet C, Pouchelon JL, Berdeaux A and Ghaleh B. "Chronic heart rate reduction with ivabradine improves systolic function of the reperfused heart through a dual mechanism involving a direct mechanical effect and a long-term increase in FKBP12/12.6 expression." *Eur Heart J* **31**(12): 1529-1537, 2010.
- Cupo P, Figueiredo AB, Filho AP, Pintya AO, Tavares Junior GA, Caligaris F, Marin-Neto JA, Hering SE and Simoes MV. "Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance." *Int J Cardiol* **116**(1): 98-106, 2007.
- Custodis F, Baumhakel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Bohm M and Laufs U. "Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Circulation* **117**(18): 2377-2387, 2008.
- Czerski L and Nunez G. "Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart?" *J Mol Cell Cardiol* **37**(3): 643-652, 2004.
- Danchin N and Aly S. "Heart rate reduction: a potential target for the treatment of myocardial ischaemia." *Therapie* **59**(5): 511-515, 2004.
- Das MK, Scott LR and Miller JM. "Focal mechanism of ventricular tachycardia in coronary artery disease." *Heart Rhythm* **7**(3): 305-311, 2010.

- de Jong JS, Marsman RF, Henriques JP, Koch KT, de Winter RJ, Tanck MW, Wilde AA and Dekker LR. "Prognosis among survivors of primary ventricular fibrillation in the percutaneous coronary intervention era." *Am Heart J* **158**(3): 467-472, 2009.
- Dennis SC, Gevers W and Opie LH. "Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to?" *J Mol Cell Cardiol* **23**(9): 1077-1086, 1991.
- Des Rosiers C, Montgomery JA, Desrochers S, Garneau M, David F, Mamer OA and Brunenraber H. "Interference of 3-hydroxyisobutyrate with measurements of ketone body concentration and isotopic enrichment by gas chromatography-mass spectrometry." *Anal Biochem* **173**(1): 96-105, 1988.
- Di Verniero C, Hocht C, Opezzo JA and Taira CA. "Changes in the in vitro pharmacodynamic properties of metoprolol in atria isolated from spontaneously hypertensive rats." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**(3): 161-165, 2007.
- Di Verniero CA, Silberman EA, Mayer MA, Opezzo JA, Taira CA and Hocht C. "In vitro and in vivo pharmacodynamic properties of metoprolol in fructose-fed hypertensive rats." *J Cardiovasc Pharmacol* **51**(6): 532-541, 2008.
- Diaz A and Tardif JC. "Heart rate slowing versus other pharmacological antianginal strategies." *Adv Cardiol* **43**: 65-78, 2006.
- DiFrancesco D. "Cardiac pacemaker I(f) current and its inhibition by heart rate-reducing agents." *Curr Med Res Opin* **21**(7): 1115-1122, 2005.
- DiFrancesco D and Camm JA. "Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease." *Drugs* **64**(16): 1757-1765, 2004.
- DiFrancesco D, Ducouret P and Robinson RB. "Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations." *Science* **243**(4891): 669-671, 1989.
- DiFrancesco D and Tromba C. "Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes." *J Physiol* **405**: 477-491, 1988.

- Ditchey RV, Goto Y and Lindenfeld J. "Myocardial oxygen requirements during experimental cardiopulmonary resuscitation." *Cardiovasc Res* **26**(8): 791-797, 1992.
- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM and Venkatachalam MA. "Calcium in cell injury and death." *Annu Rev Pathol* **1**: 405-434, 2006.
- Dyer AR, Persky V, Stamler J, Paul O, Shekelle RB, Berkson DM, Lepper M, Schoenberger JA and Lindberg HA. "Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies." *Am J Epidemiol* **112**(6): 736-749, 1980.
- Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, Peters RW, Obias-Manno D, Barker AH, Arensberg D, Baker A, Friedman L, Greene HL and et al. "Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial." *N Engl J Med* **324**(12): 781-788, 1991.
- Faucon G, Aupetit JF, Gerentes-Chassagne I, Loufoua-Moundanga J, Larbre JP and Timour Q. "[Arrhythmogenic risk of antiarrhythmic drugs: study with class Ic drugs during myocardial ischemia]." *Bull Acad Natl Med* **175**(2): 217-224; discussion 224-215, 1991.
- Ferdinandy P, Schulz R and Baxter GF. "Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning." *Pharmacol Rev* **59**(4): 418-458, 2007.
- Fernandez CA, Des Rosiers C, Previs SF, David F and Brunengraber H. "Correction of ¹³C mass isotopomer distributions for natural stable isotope abundance." *J Mass Spectrom* **31**(3): 255-262, 1996.
- Ferrari R. "Ischaemic heart disease: clinical improvement with metabolic approach." *Rev Port Cardiol* **19 Suppl 5**: V7-20, 2000.
- Ferrari R, Cargnoni A and Ceconi C. "Anti-ischaemic effect of ivabradine." *Pharmacol Res* **53**(5): 435-439, 2006.

- Ferrari R, Pedersini P, Bongrazio M, Gaia G, Bernocchi P, Di Lisa F and Visioli O. "Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischaemia and reperfusion." *Basic Res Cardiol* **88**(5): 495-512, 1993.
- Ferrari R, Pepi P, Ferrari F, Nesta F, Benigno M and Visioli O. "Metabolic derangement in ischemic heart disease and its therapeutic control." *Am J Cardiol* **82**(5A): 2K-13K, 1998.
- Fischell TA, Fischell DR, Fischell RE, Baskerville S, Hendrick S, Moshier C, Harwood JP and Krucoff MW. "Potential of an intracardiac electrogram for the rapid detection of coronary artery occlusion." *Cardiovasc Revasc Med* **6**(1): 14-20, 2005.
- Foretz M, Taleux N, Guigas B, Horman S, Beauloye C, Andreelli F, Bertrand L and Viollet B. "[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]." *Med Sci (Paris)* **22**(4): 381-388, 2006.
- Fox K. "Selective and specific I(f) inhibition: new perspectives for the treatment of stable angina." *Expert Opin Pharmacother* **7**(9): 1211-1220, 2006.
- Fox K, Borer JS, Camm AJ, Danchin N, Ferrari R, Lopez Sendon JL, Steg PG, Tardif JC, Tavazzi L and Tendera M. "Resting heart rate in cardiovascular disease." *J Am Coll Cardiol* **50**(9): 823-830, 2007.
- Fragasso G, Salerno A, Spoladore R, Bassanelli G, Arioli F and Margonato A. "Metabolic therapy of heart failure." *Curr Pharm Des* **14**(25): 2582-2591, 2008.
- Friedman HS. "Determinants of the total cosine of the spatial angle between the QRS complex and the T wave (TCRT): implications for distinguishing primary from secondary T-wave abnormalities." *J Electrocardiol* **40**(1): 12-17, 2007.
- Frouin F, Bazin JP, Di Paola M, Jolivet O and Di Paola R. "FAMIS: a software package for functional feature extraction from biomedical multidimensional images." *Comput Med Imaging Graph* **16**(2): 81-91, 1992.
- Gaskell WH. "Preliminary Observations on the Innervation of the Heart of the Tortoise." *J Physiol* **3**(5-6): 369-379, 1882.

- Gaskell WH. "On the Innervation of the Heart, with especial reference to the Heart of the Tortoise." *J Physiol* **4**(2-3): 43-230 214, 1883.
- Gazmuri RJ, Ayoub IM, Kolarova JD and Karmazyn M. "Myocardial protection during ventricular fibrillation by inhibition of the sodium-hydrogen exchanger isoform-1." *Crit Care Med* **30**(4 Suppl): S166-171, 2002.
- Gazmuri RJ, Berkowitz M and Cajigas H. "Myocardial effects of ventricular fibrillation in the isolated rat heart." *Crit Care Med* **27**(8): 1542-1550, 1999.
- Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Zamboulis C, Parcharidis GE, Mikhailidis DP and Louridas GE. "Elevated heart rate and atherosclerosis: an overview of the pathogenetic mechanisms." *Int J Cardiol* **126**(3): 302-312, 2008.
- Gomez AM, Schwaller B, Porzig H, Vassort G, Niggli E and Egger M. "Increased exchange current but normal Ca²⁺ transport via Na⁺-Ca²⁺ exchange during cardiac hypertrophy after myocardial infarction." *Circ Res* **91**(4): 323-330, 2002.
- Gordon SG, Arsenault WG, Longnecker M, Boothe DM, Miller MW and Chalkley J. "Pharmacodynamics of carvedilol in conscious, healthy dogs." *J Vet Intern Med* **20**(2): 297-304, 2006.
- Gupta A, Chacko VP and Weiss RG. "Abnormal energetics and ATP depletion in pressure-overload mouse hearts: in vivo high-energy phosphate concentration measures by noninvasive magnetic resonance." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(1): H59-64, 2009.
- Guth BD, Heusch G, Seitelberger R and Ross J, Jr. "Mechanism of beneficial effect of beta-adrenergic blockade on exercise-induced myocardial ischemia in conscious dogs." *Circ Res* **60**(5): 738-746, 1987.
- Hagiwara N, Irisawa H and Kameyama M. "Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells." *J Physiol* **395**: 233-253, 1988.
- Hall AS and Palmer S. "The heart rate hypothesis: ready to be tested." *Heart* **94**(5): 561-565, 2008.

- Han W, Bao W, Wang Z and Nattel S. "Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle." *Circ Res* **91**(9): 790-797, 2002.
- Hazey JW, Yang D, Powers L, Previs SF, David F, Beaulieu AD, Puchowicz MA, Potter JL, Palmquist DL and Brunengraber H. "Tracing gluconeogenesis with deuterated water: measurement of low deuterium enrichments on carbons 6 and 2 of glucose." *Anal Biochem* **248**(1): 158-167, 1997.
- Heidland UE and Strauer BE. "Left ventricular muscle mass and elevated heart rate are associated with coronary plaque disruption." *Circulation* **104**(13): 1477-1482, 2001.
- Henning RJ and Sawmiller DR. "Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects." *Cardiovasc Res* **49**(1): 27-37, 2001.
- Henze E, Schelbert HR, Barrio JR, Egbert JE, Hansen HW, MacDonald NS and Phelps ME. "Evaluation of myocardial metabolism, with N-13- and C-11-labeled amino acids and positron computed tomography." *J Nucl Med* **23**(8): 671-681, 1982.
- Heusch G. "Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and myocardial ischaemia: benefit from selective bradycardic agents." *Br J Pharmacol* **153**(8): 1589-1601, 2008.
- Heusch G, Baumgart D, Camici P, Chilian W, Gregorini L, Hess O, Indolfi C and Rimoldi O. "alpha-adrenergic coronary vasoconstriction and myocardial ischemia in humans." *Circulation* **101**(6): 689-694, 2000.
- Heusch G, Skyschally A, Gres P, van Caster P, Schilawa D and Schulz R. "Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction." *Eur Heart J* **29**(18): 2265-2275, 2008.
- Hine LK, Laird N, Hewitt P and Chalmers TC. "Meta-analytic evidence against prophylactic use of lidocaine in acute myocardial infarction." *Arch Intern Med* **149**(12): 2694-2698, 1989.
- Iida H, Kanno I and Miura S. "Rapid measurement of cerebral blood flow with positron emission tomography." *Ciba Found Symp* **163**: 23-37; discussion 37-42, 1991.

- Indolfi C, Guth BD, Miyazaki S, Miura T, Schulz R and Ross J, Jr. "Heart rate reduction improves myocardial ischemia in swine: role of interventricular blood flow redistribution." *Am J Physiol* **261**(3 Pt 2): H910-917, 1991.
- Indolfi C and Ross J, Jr. "The role of heart rate in myocardial ischemia and infarction: implications of myocardial perfusion-contraction matching." *Prog Cardiovasc Dis* **36**(1): 61-74, 1993.
- Investigators C. "Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators." *N Engl J Med* **321**(6): 406-412, 1989.
- Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A and Ohmori H. "Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node." *J Biol Chem* **274**(18): 12835-12839, 1999.
- Janse MJ and Wit AL. "Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction." *Physiol Rev* **69**(4): 1049-1169, 1989.
- Jennings RB, Reimer KA, Jones RN and Peyton RB. "High energy phosphates, anaerobic glycolysis and irreversibility in ischemia." *Adv Exp Med Biol* **161**: 403-419, 1983.
- Joannides R, Moore N, Iacob M, Compagnon P, Lerebours G, Menard JF and Thuillez C. "Comparative effects of ivabradine, a selective heart rate-lowering agent, and propranolol on systemic and cardiac haemodynamics at rest and during exercise." *Br J Clin Pharmacol* **61**(2): 127-137, 2006.
- Jouven X, Empana JP, Schwartz PJ, Desnos M, Courbon D and Ducimetiere P. "Heart-rate profile during exercise as a predictor of sudden death." *N Engl J Med* **352**(19): 1951-1958, 2005.
- Kalaycioglu S, Sinci V, Imren Y and Oz E. "Metoprolol prevents ischemia-reperfusion injury by reducing lipid peroxidation." *Jpn Circ J* **63**(9): 718-721, 1999.

- Kaplan JR, Manuck SB and Clarkson TB. "The influence of heart rate on coronary artery atherosclerosis." *J Cardiovasc Pharmacol* **10 Suppl 2**: S100-102; discussion S103, 1987.
- Kaupp UB and Seifert R. "Molecular diversity of pacemaker ion channels." *Annu Rev Physiol* **63**: 235-257, 2001.
- Keith A and Flack M. "The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart." *J Anat Physiol* **41**(Pt 3): 172-189, 1907.
- Kette F, Weil MH, Gazmuri RJ, Bisera J and Rackow EC. "Intramyocardial hypercarbic acidosis during cardiac arrest and resuscitation." *Crit Care Med* **21**(6): 901-906, 1993.
- Khairallah M, Labarthe F, Bouchard B, Danialou G, Petrof BJ and Des Rosiers C. "Profiling substrate fluxes in the isolated working mouse heart using ¹³C-labeled substrates: focusing on the origin and fate of pyruvate and citrate carbons." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**(4): H1461-1470, 2004.
- Khan N and McAlister FA. "Re-examining the efficacy of beta-blockers for the treatment of hypertension: a meta-analysis." *CMAJ* **174**(12): 1737-1742, 2006.
- Kien CL, Murray RD, Ailabouni A, Powers P, Kepner J, Powers L and Brunengraber H. "Stable isotope model for assessing production of short chain fatty acids from colon-derived sugar: application in pigs." *J Nutr* **126**(12): 3069-3076, 1996.
- King LM and Opie LH. "Glucose and glycogen utilisation in myocardial ischemia--changes in metabolism and consequences for the myocyte." *Mol Cell Biochem* **180**(1-2): 3-26, 1998.
- Kloner RA and Jennings RB. "Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1." *Circulation* **104**(24): 2981-2989, 2001a.
- Kloner RA and Jennings RB. "Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2." *Circulation* **104**(25): 3158-3167, 2001b.
- Kobara M, Tatsumi T, Matoba S, Yamahara Y, Nakagawa C, Ohta B, Matsumoto T, Inoue D, Asayama J and Nakagawa M. "Effect of ischemic preconditioning on mitochondrial

- oxidative phosphorylation and high energy phosphates in rat hearts." *J Mol Cell Cardiol* **28**(2): 417-428, 1996.
- Kochs M, Eggeling T and Hombach V. "Pharmacological therapy in coronary heart disease: prevention of life-threatening ventricular tachyarrhythmias and sudden cardiac death." *Eur Heart J* **14 Suppl E**: 107-119, 1993.
- Koplan BA and Stevenson WG. "Ventricular tachycardia and sudden cardiac death." *Mayo Clin Proc* **84**(3): 289-297, 2009.
- Krismer AC, Wenzel V, Stadlbauer KH, Mayr VD, Lienhart HG, Arntz HR and Lindner KH. "Vasopressin during cardiopulmonary resuscitation: a progress report." *Crit Care Med* **32**(9 Suppl): S432-435, 2004.
- Labarthe F, Gelinas R and Des Rosiers C. "Medium-chain fatty acids as metabolic therapy in cardiac disease." *Cardiovasc Drugs Ther* **22**(2): 97-106, 2008.
- Labarthe F, Khairallah M, Bouchard B, Stanley WC and Des Rosiers C. "Fatty acid oxidation and its impact on response of spontaneously hypertensive rat hearts to an adrenergic stress: benefits of a medium-chain fatty acid." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(3): H1425-1436, 2005.
- Lama PJ. "Systemic adverse effects of beta-adrenergic blockers: an evidence-based assessment." *Am J Ophthalmol* **134**(5): 749-760, 2002.
- Large V, Brunengraber H, Odeon M and Beylot M. "Use of labeling pattern of liver glutamate to calculate rates of citric acid cycle and gluconeogenesis." *Am J Physiol* **272**(1 Pt 1): E51-58, 1997.
- Le Heuzey JY. "[Sinus node and ionic currents: physiology and regulation]." *Therapie* **59**(5): 491-494, 2004.
- Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J and Hoppel CL. "Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **33**(6): 1065-1089, 2001.
- Levine HJ. "Rest heart rate and life expectancy." *J Am Coll Cardiol* **30**(4): 1104-1106, 1997.

- Li J, Lang MJ, Mao XB, Tian L and Feng YB. "Antiapoptosis and mitochondrial effect of pioglitazone preconditioning in the ischemic/reperfused heart of rat." *Cardiovasc Drugs Ther* **22**(4): 283-291, 2008.
- Liem DA, Honda HM, Zhang J, Woo D and Ping P. "Past and present course of cardioprotection against ischemia-reperfusion injury." *J Appl Physiol* **103**(6): 2129-2136, 2007.
- Lindbom M, Ramunddal T, Camejo G, Waagstein F and Omerovic E. "In vivo effects of myocardial creatine depletion on left ventricular function morphology and lipid metabolism: study in a mouse model." *J Card Fail* **14**(2): 161-166, 2008.
- Linderholm H, Essen-Gustavsson B and Thornell LE. "Low succinate dehydrogenase (SDH) activity in a patient with a hereditary myopathy with paroxysmal myoglobinuria." *J Intern Med* **228**(1): 43-52, 1990.
- Lindholm LH, Carlberg B and Samuelsson O. "Should beta blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis." *Lancet* **366**(9496): 1545-1553, 2005.
- Lindner KH, Ahnefeld FW, Schuermann W and Bowdler IM. "Epinephrine and norepinephrine in cardiopulmonary resuscitation. Effects on myocardial oxygen delivery and consumption." *Chest* **97**(6): 1458-1462, 1990.
- Linke A, Erbs S and Hambrecht R. "Exercise and the coronary circulation-alterations and adaptations in coronary artery disease." *Prog Cardiovasc Dis* **48**(4): 270-284, 2006.
- Liu J, Wang C, Murakami Y, Gong G, Ishibashi Y, Prody C, Ochiai K, Bache RJ, Godinot C and Zhang J. "Mitochondrial ATPase and high-energy phosphates in failing hearts." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(3): H1319-1326, 2001.
- Lopez-Bescos L, Filipova S and Martos R. "Long-term safety and efficacy of ivabradine in patients with chronic stable angina." *Cardiology* **108**(4): 387-396, 2007.
- Ludwig A, Zong X, Hofmann F and Biel M. "Structure and function of cardiac pacemaker channels." *Cell Physiol Biochem* **9**(4-5): 179-186, 1999a.

- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F and Biel M. "Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics." *EMBO J* **18**(9): 2323-2329, 1999b.
- Lyons CJ, Burgess MJ and Abildskov JA. "Effects of acute hyperkalemia on cardiac excitability." *Am Heart J* **94**(6): 755-763, 1977.
- Maddika S, Elimban V, Chapman D and Dhalla NS. "Role of oxidative stress in ischemia-reperfusion-induced alterations in myofibrillar ATPase activities and gene expression in the heart." *Can J Physiol Pharmacol* **87**(2): 120-129, 2009.
- Malloy CR, Sherry AD and Jeffrey FM. "Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by ¹³C NMR spectroscopy." *J Biol Chem* **263**(15): 6964-6971, 1988.
- Mamer OA. "Measurement of urinary lactic, 3-hydroxybutyric, pyruvic and acetoacetic acids in a single analysis using selected ion monitoring and stable isotope labelling techniques." *Biomed Environ Mass Spectrom* **15**(1): 57-62, 1988.
- Mangoni ME and Nargeot J. "Genesis and regulation of the heart automaticity." *Physiol Rev* **88**(3): 919-982, 2008.
- Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D and Demolombe S. "Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart." *J Physiol* **562**(Pt 1): 223-234, 2005.
- Monnet X, Colin P, Ghaleh B, Hittinger L, Giudicelli JF and Berdeaux A. "Heart rate reduction during exercise-induced myocardial ischaemia and stunning." *Eur Heart J* **25**(7): 579-586, 2004.
- Monnet X, Ghaleh B, Colin P, de Curzon OP, Giudicelli JF and Berdeaux A. "Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise-induced myocardial ischemia and stunning." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(3): 1133-1139, 2001.
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F and Ludwig A. "Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues." *Eur J Biochem* **268**(6): 1646-1652, 2001.

- Mootha VK, Arai AE and Balaban RS. "Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart." *Am J Physiol* **272**(2 Pt 2): H769-775, 1997.
- Moshal KS, Metreveli N, Frank I and Tyagi SC. "Mitochondrial MMP activation, dysfunction and arrhythmogenesis in hyperhomocysteinemia." *Curr Vasc Pharmacol* **6**(2): 84-92, 2008.
- Mulder P and Thuillez C. "Heart rate slowing for myocardial dysfunction/heart failure." *Adv Cardiol* **43**: 97-105, 2006.
- Nachlas MM, Davidson MB, Goldberg JD and Seligman AM. "Colorimetric method for the measurement of isocitric dehydrogenase activity." *J Lab Clin Med* **62**: 148-158, 1963.
- Neely JR and Morgan HE. "Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle." *Annu Rev Physiol* **36**: 413-459, 1974.
- Neubauer S. "Influence of left ventricular pressures and heart rate on myocardial high-energy phosphate metabolism." *Basic Res Cardiol* **93 Suppl 1**: 102-107, 1998.
- Neubauer S. "The failing heart--an engine out of fuel." *N Engl J Med* **356**(11): 1140-1151, 2007.
- Neumar RW, Brown CG, Van Ligten P, Hoekstra J, Altschuld RA and Baker P. "Estimation of myocardial ischemic injury during ventricular fibrillation with total circulatory arrest using high-energy phosphates and lactate as metabolic markers." *Ann Emerg Med* **20**(3): 222-229, 1991.
- Niemann JT, Cairns CB, Sharma J and Lewis RJ. "Treatment of prolonged ventricular fibrillation. Immediate countershock versus high-dose epinephrine and CPR preceding countershock." *Circulation* **85**(1): 281-287, 1992.
- Nishino T, Okamoto K, Eger BT and Pai EF. "Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase." *FEBS J* **275**(13): 3278-3289, 2008.
- Nul DR, Doval HC, Grancelli HO, Varini SD, Soifer S, Perrone SV, Prieto N and Scapin O. "Heart rate is a marker of amiodarone mortality reduction in severe heart failure. The GESICA-GEMA Investigators. Grupo de Estudio de la Sobrevida en la Insuficiencia

- Cardiaca en Argentina-Grupo de Estudios Multicentricos en Argentina." *J Am Coll Cardiol* **29**(6): 1199-1205, 1997.
- Ojha N, Roy S, Radtke J, Simonetti O, Gnyawali S, Zweier JL, Kuppusamy P and Sen CK. "Characterization of the structural and functional changes in the myocardium following focal ischemia-reperfusion injury." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(6): H2435-2443, 2008.
- Ono K, Shibata S and Iijima T. "Pacemaker mechanism of porcine sino-atrial node cells." *J Smooth Muscle Res* **39**(5): 195-204, 2003.
- Ootaki Y, Kamohara K, Schenk S, Kopcak MW, Jr., Dessoffy R, Schoenhagen P and Fukamachi K. "Transmural distribution of myocardial blood perfusion and phasic coronary blood flow pattern in a canine model of acute ischemia." *Int J Cardiol* **107**(3): 382-388, 2006.
- Overholser BR, Zheng X and Tisdale JE. "Catecholaminergic effects on ventricular repolarization during inhibition of the rapid component of the delayed rectifier potassium current in a perfused heart model." *Pharmacotherapy* **28**(11): 1315-1324, 2008.
- Padykula HA and Herman E. "Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques." *J Histochem Cytochem* **3**(3): 161-169, 1955.
- Palatini P. "Need for a revision of the normal limits of resting heart rate." *Hypertension* **33**(2): 622-625, 1999.
- Palatini P. "Elevated heart rate: a "new" cardiovascular risk factor?" *Prog Cardiovasc Dis* **52**(1): 1-5, 2009.
- Palatini P and Julius S. "Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations." *J Hum Hypertens* **11 Suppl 1**: S19-27, 1997a.
- Palatini P and Julius S. "Heart rate and the cardiovascular risk." *J Hypertens* **15**(1): 3-17, 1997b.

- Palatini P, Longo D, Zaetta V, Perkovic D, Garbelotto R and Pessina AC. "Evolution of blood pressure and cholesterol in stage 1 hypertension: role of autonomic nervous system activity." *J Hypertens* **24**(7): 1375-1381, 2006.
- Pierce GN and Dhalla NS. "Mechanisms of the defect in cardiac myofibrillar function during diabetes." *Am J Physiol* **248**(2 Pt 1): E170-175, 1985.
- Piper HM, Noll T and Siegmund B. "Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell." *Cardiovasc Res* **28**(1): 1-15, 1994.
- Quinn FR, Currie S, Duncan AM, Miller S, Sayeed R, Cobbe SM and Smith GL. "Myocardial infarction causes increased expression but decreased activity of the myocardial Na⁺-Ca²⁺ exchanger in the rabbit." *J Physiol* **553**(Pt 1): 229-242, 2003.
- Rassaf T and Luedike P. "Between nitros(yl)ation and nitration: Regulation of thioredoxin-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury." *J Mol Cell Cardiol*, 2010.
- Reil JC and Bohm M. "The role of heart rate in the development of cardiovascular disease." *Clin Res Cardiol* **96**(9): 585-592, 2007.
- Reil JC, Reil GH and Bohm M. "Heart rate reduction by I(f)-channel inhibition and its potential role in heart failure with reduced and preserved ejection fraction." *Trends Cardiovasc Med* **19**(5): 152-157, 2009.
- Rittenberger JC, Bost JE and Menegazzi JJ. "Time to give the first medication during resuscitation in out-of-hospital cardiac arrest." *Resuscitation* **70**(2): 201-206, 2006.
- Rocchiccioli F, Lepetit N and Bougneres PF. "Capillary gas-liquid chromatographic/mass spectrometric measurement of plasma acetate content and (2-13C) acetate enrichment." *Biomed Environ Mass Spectrom* **18**(9): 816-819, 1989.
- Roelandt J, Klootwijk P, Lubsen J and Janse MJ. "Sudden death during longterm ambulatory monitoring." *Eur Heart J* **5**(1): 7-20, 1984.
- Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP, Jr., Barsh GS, Bernstein D and Kobilka BK. "Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7375-7380, 1996.

- Rosano GM, Vitale C and Volterrani M. "Heart rate in ischemic heart disease. The innovation of ivabradine: more than pure heart rate reduction." *Adv Ther* **27**(4): 202-210, 2010.
- Rosenbaum T and Gordon SE. "Quickening the pace: looking into the heart of HCN channels." *Neuron* **42**(2): 193-196, 2004.
- Rubart M and Zipes DP. "Mechanisms of sudden cardiac death." *J Clin Invest* **115**(9): 2305-2315, 2005.
- Ruzyllo W, Tendera M, Ford I and Fox KM. "Antianginal efficacy and safety of ivabradine compared with amlodipine in patients with stable effort angina pectoris: a 3-month randomised, double-blind, multicentre, noninferiority trial." *Drugs* **67**(3): 393-405, 2007.
- Saha M and Marber MS. "If at first you don't succeed try ... a new target in the treatment of angina." *Eur Heart J* **26**(23): 2482-2483, 2005.
- Salem JE, Stanley WC and Cabrera ME. "Computational studies of the effects of myocardial blood flow reductions on cardiac metabolism." *Biomed Eng Online* **3**(1): 15, 2004.
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA and Tibbs GR. "Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain." *Cell* **93**(5): 717-729, 1998.
- Saxon LA. "Sudden cardiac death: epidemiology and temporal trends." *Rev Cardiovasc Med* **6 Suppl 2**: S12-20, 2005.
- Schaefer S, Schwartz GG, Gober JR, Wong AK, Camacho SA, Massie B and Weiner MW. "Relationship between myocardial metabolites and contractile abnormalities during graded regional ischemia. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of porcine myocardium in vivo." *J Clin Invest* **85**(3): 706-713, 1990.
- Schamroth CL and Schamroth L. "Ventricular aneurysm: the effect of a complicating left anterior hemiblock." *Chest* **85**(2): 276-277, 1984.
- Schmidt-Ott SC, Bletz C, Vahl C, Saggau W, Hagl S and Ruegg JC. "Inorganic phosphate inhibits contractility and ATPase activity in skinned fibers from human myocardium." *Basic Res Cardiol* **85**(4): 358-366, 1990.

- Schwartz LM, Reimer KA, Crago MS and Jennings RB. "Pharmacological preconditioning with diazoxide slows energy metabolism during sustained ischemia." *Exp Clin Cardiol* **12**(3): 139-147, 2007.
- Scolletta S and Biagioli B. "Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure." *Biomed Pharmacother* **64**(3): 203-207, 2010.
- Sharma V, Dhillon P, Wambolt R, Parsons H, Brownsey R, Allard MF and McNeill JH. "Metoprolol improves cardiac function and modulates cardiac metabolism in the streptozotocin-diabetic rat." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(4): H1609-1620, 2008.
- Shaw RM and Rudy Y. "Electrophysiologic effects of acute myocardial ischemia. A mechanistic investigation of action potential conduction and conduction failure." *Circ Res* **80**(1): 124-138, 1997.
- Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D and Cohen IS. "Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues." *Circ Res* **85**(1): e1-6, 1999.
- Silverman ME, Grove D and Upshaw CB, Jr. "Why does the heart beat? The discovery of the electrical system of the heart." *Circulation* **113**(23): 2775-2781, 2006.
- Simon L, Ghaleh B, Puybasset L, Giudicelli JF and Berdeaux A. "Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs." *J Pharmacol Exp Ther* **275**(2): 659-666, 1995.
- Singh BN. "Beta-Adrenergic blockers as antiarrhythmic and antifibrillatory compounds: an overview." *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **10 Suppl 1**: S3-S14, 2005.
- Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, Szabo C and Sellke FW. "The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury." *Eur J Cardiothorac Surg* **33**(5): 906-913, 2008.
- Stanley WC, Recchia FA and Lopaschuk GD. "Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart." *Physiol Rev* **85**(3): 1093-1129, 2005.

- Stiell IG, Wells GA, Field B, Spaite DW, Nesbitt LP, De Maio VJ, Nichol G, Cousineau D, Blackburn J, Munkley D, Luinstra-Toohey L, Campeau T, Dagnone E and Lyver M. "Advanced cardiac life support in out-of-hospital cardiac arrest." *N Engl J Med* **351**(7): 647-656, 2004.
- Stoll M, Quentin M, Molojavyi A, Thamer V and Decking UK. "Spatial heterogeneity of myocardial perfusion predicts local potassium channel expression and action potential duration." *Cardiovasc Res* **77**(3): 489-496, 2008.
- Stone PH, Gibson RS, Glasser SP, DeWood MA, Parker JD, Kawanishi DT, Crawford MH, Messineo FC, Shook TL, Raby K and et al. "Comparison of propranolol, diltiazem, and nifedipine in the treatment of ambulatory ischemia in patients with stable angina. Differential effects on ambulatory ischemia, exercise performance, and anginal symptoms. The ASIS Study Group." *Circulation* **82**(6): 1962-1972, 1990.
- Sulfi S and Timmis AD. "Ivabradine -- the first selective sinus node I(f) channel inhibitor in the treatment of stable angina." *Int J Clin Pract* **60**(2): 222-228, 2006.
- Tardif JC. "Clinical results of I(f) current inhibition by ivabradine." *Drugs* **67 Suppl 2**: 35-41, 2007.
- Tardif JC, Ford I, Tendera M, Bourassa MG and Fox K. "Efficacy of ivabradine, a new selective I(f) inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina." *Eur Heart J* **26**(23): 2529-2536, 2005.
- Tawara S. "*Das Reizleitungssystem Des Säugetierherzens [The Conduction System of the Mammalian Heart]*." Jena: Gustave Fischer, 1906.
- Tellez JO, Dobrzynski H, Greener ID, Graham GM, Laing E, Honjo H, Hubbard SJ, Boyett MR and Billeter R. "Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and sinoatrial node in rabbit." *Circ Res* **99**(12): 1384-1393, 2006.
- Thollon C, Cambarrat C, Vian J, Prost JF, Peglion JL and Vilaine JP. "Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49." *Br J Pharmacol* **112**(1): 37-42, 1994.

- Timour Q, Aupetit JF, Loufoua-Moundanga J, Gerentes-Chassagne I, Kioueh I and Faucon G. "Class Ic antiarrhythmic drugs and myocardial ischaemia: study in the pig heart in situ." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **343**(6): 645-651, 1991.
- Timour Q, Aupetit JF, Loufoua-Moundanga JL, Barral-Cadiere L, Freysz M and Faucon G. "[Demonstration of the fibrillatory effect of class I anti-arrhythmia agents based on the time of fibrillation onset and electrical threshold in myocardial ischemia]." *Therapie* **49**(4): 349-353, 1994.
- Tsibiribi P, Bui-Xuan C, Bui-Xuan B, Tabib A, Descotes J, Chevalier P, Gagnieu MC, Belkhiria M and Timour Q. "The effects of ropivacaine at clinically relevant doses on myocardial ischemia in pigs." *J Anesth* **20**(4): 341-343, 2006.
- Vaillant F, Timour Q, Descotes J, Manati W, Belhani D, Bui-Xuan B, Tabib A, Bricca G and Chevalier P. "Ivabradine induces an increase in ventricular fibrillation threshold during acute myocardial ischemia: an experimental study." *J Cardiovasc Pharmacol* **52**(6): 548-554, 2008.
- Vaillant F, Tsibiribi P, Bricca G, Bui-Xuan B, Bescond-Jacquet A, Tabib A, Descotes J and Timour Q. "Trimetazidine protective effect against ischemia-induced susceptibility to ventricular fibrillation in pigs." *Cardiovasc Drugs Ther* **22**(1): 29-36, 2008.
- van Beek JH. "Adenine nucleotide-creatine-phosphate module in myocardial metabolic system explains fast phase of dynamic regulation of oxidative phosphorylation." *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(3): C815-829, 2007.
- van der Vusse GJ, van Bilsen M and Glatz JF. "Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease." *Cardiovasc Res* **45**(2): 279-293, 2000.
- Venditti P, Bari A, Di Stefano L, Agnisola C and Di Meo S. "Effect of T3 treatment on the response to ischemia-reperfusion of heart preparations from sedentary and trained rats." *Pflugers Arch* **455**(4): 667-676, 2008.
- Verkerk AO, van Ginneken AC and Wilders R. "Pacemaker activity of the human sinoatrial node: role of the hyperpolarization-activated current, I(f)." *Int J Cardiol* **132**(3): 318-336, 2009.

- Verrier RL and Josephson ME. "Impact of sleep on arrhythmogenesis." *Circ Arrhythm Electrophysiol* **2**(4): 450-459, 2009.
- Verrier RL and Nieminen T. "T-wave alternans as a therapeutic marker for antiarrhythmic agents." *J Cardiovasc Pharmacol* **55**(6): 544-554, 2010.
- Verrier RL and Tan A. "Heart rate, autonomic markers, and cardiac mortality." *Heart Rhythm* **6**(11 Suppl): S68-75, 2009.
- Vilaine JP. "[The discovery of the selective If current inhibitor ivabradine (Procoralan): a new therapeutic approach to ischemic heart disease]." *Med Sci (Paris)* **22**(1): 87-94, 2006.
- Vilaine JP, Bidouard JP, Lesage L, Reure H and Peglion JL. "Anti-ischemic effects of ivabradine, a selective heart rate-reducing agent, in exercise-induced myocardial ischemia in pigs." *J Cardiovasc Pharmacol* **42**(5): 688-696, 2003.
- Vincent G. *Phénotypage métabolique du coeur sain et malade basé sur l'analyse d'isotopomères de masse marqués au carbone 13: implications du citrate*. . 300 p. Thèse : Biochimie. Montréal, Université de Montréal, 2003.
- Vincent G, Khairallah M, Bouchard B and Des Rosiers C. "Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ¹³C-substrates and ex vivo perfusion in the working mode." *Mol Cell Biochem* **242**(1-2): 89-99, 2003.
- Vogt AM, Elsasser A, Pott-Beckert A, Ackermann C, Vetter SY, Yildiz M, Schoels W, Fell DA, Katus HA and Kubler W. "Myocardial energy metabolism in ischemic preconditioning and cardioplegia: a metabolic control analysis." *Mol Cell Biochem* **278**(1-2): 223-232, 2005.
- Wang J, Guo X and Dhalla NS. "Modification of myosin protein and gene expression in failing hearts due to myocardial infarction by enalapril or losartan." *Biochim Biophys Acta* **1690**(2): 177-184, 2004.
- Wang J, Liu X, Ren B, Rupp H, Takeda N and Dhalla NS. "Modification of myosin gene expression by imidapril in failing heart due to myocardial infarction." *J Mol Cell Cardiol* **34**(7): 847-857, 2002.

- Wang P, Zaragoza C and Holman W. "Sodium-hydrogen exchange inhibition and beta-blockade additively decrease infarct size." *Ann Thorac Surg* **83**(3): 1121-1127, 2007.
- Wang S, Radhakrishnan J, Ayoub IM, Kolarova JD, Taglieri DM and Gazmuri RJ. "Limiting sarcolemmal Na⁺ entry during resuscitation from ventricular fibrillation prevents excess mitochondrial Ca²⁺ accumulation and attenuates myocardial injury." *J Appl Physiol* **103**(1): 55-65, 2007.
- Weiss RG, Bottomley PA, Hardy CJ and Gerstenblith G. "Regional myocardial metabolism of high-energy phosphates during isometric exercise in patients with coronary artery disease." *N Engl J Med* **323**(23): 1593-1600, 1990.
- Wu F, Zhang EY, Zhang J, Bache RJ and Beard DA. "Phosphate metabolite concentrations and ATP hydrolysis potential in normal and ischaemic hearts." *J Physiol* **586**(Pt 17): 4193-4208, 2008.
- Yoshiyama M, Takeuchi K, Hanatani A, Kim S, Omura T, Toda I, Teragaki M, Akioka K, Iwao H and Yoshikawa J. "Differences in expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and Na⁺-Ca²⁺ exchanger genes between adjacent and remote noninfarcted myocardium after myocardial infarction." *J Mol Cell Cardiol* **29**(1): 255-264, 1997.
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R and Gouaux E. "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels." *Nature* **425**(6954): 200-205, 2003.
- Zhang J, Liem DA, Mueller M, Wang Y, Zong C, Deng N, Vondriska TM, Korge P, Drews O, MacLellan WR, Honda H, Weiss JN, Apweiler R and Ping P. "Altered proteome biology of cardiac mitochondria under stress conditions." *J Proteome Res* **7**(6): 2204-2214, 2008.
- Zhao ZQ and Vinten-Johansen J. "Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning." *Cardiovasc Res* **55**(3): 438-455, 2002.
- Zheng W, Brown MD, Brock TA, Bjerkke RJ and Tomanek RJ. "Bradycardia-induced coronary angiogenesis is dependent on vascular endothelial growth factor." *Circ Res* **85**(2): 192-198, 1999.

- Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH and Mensah GA. "Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998." *Circulation* **104**(18): 2158-2163, 2001.
- Zhong JQ, Zhang W, Gao H, Li Y, Zhong M, Li D, Zhang C and Zhang Y. "Changes in connexin 43, metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase during tachycardia-induced cardiomyopathy in dogs." *Eur J Heart Fail* **9**(1): 23-29, 2007.
- Zhou L, Huang H, McElfresh TA, Prosdocimo DA and Stanley WC. "Impact of anaerobic glycolysis and oxidative substrate selection on contractile function and mechanical efficiency during moderate severity ischemia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(3): H939-H945, 2008.
- Zhou SX, Lei J, Fang C, Zhang YL and Wang JF. "Ventricular electrophysiology in congestive heart failure and its correlation with heart rate variability and baroreflex sensitivity: a canine model study." *Europace* **11**(2): 245-251, 2009.
- Zicha S, Fernandez-Velasco M, Lonardo G, L'Heureux N and Nattel S. "Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in a canine heart failure model." *Cardiovasc Res* **66**(3): 472-481, 2005.

Bibliographie de l'auteur

**Annexe I : articles en relation avec ce
manuscrit**

Article 1

**Ivabradine induces an increase in ventricular
fibrillation threshold during acute myocardial
ischemia: an experimental study.**

Ivabradine Induces an Increase in Ventricular Fibrillation Threshold During Acute Myocardial Ischemia: An Experimental Study

Fanny Vaillant, MSci,* Quadiri Timour, PhD,*† Jacques Descotes, MD, PharmD, PhD,‡
 Waheed Manati, MD,* Dalila Belhani, MSci,* Bernard Bui-Xuan, MD, PhD,* Alain Tabib, MD, PhD,‡
 Giampiero Bricca, MD, PhD,* and Philippe Chevalier, MD, PhD§

Background: Tachycardia often facilitates ischemic ventricular fibrillation (VF).

Objective: This study assessed the impact of ivabradine (IVA), a selective inhibitor of the cardiac pacemaker I_f current, on ventricular fibrillation threshold (VFT) during acute myocardial ischemia.

Methods: The experiments were conducted on a total of 54 domestic pigs. Myocardial ischemia was induced in anesthetized pigs by total 1-minute coronary occlusion at baseline and then on 2 occasions after intravenous administration of saline or 0.5 mg/kg of IVA. VF was triggered by electrical stimuli of increasing intensity at a fixed rate. Heart rate (HR), VFT, monophasic action potential duration, and peak of the time derivative of left ventricular pressure (LV dP/dt_{max}) were monitored on each occasion. The activity of mitochondrial succinodhydrogenase was measured on heart sections.

Results: Compared with controls, IVA induced a 31% reduction in HR, a 2.9-fold increase in VFT, and prevented ischemia-induced monophasic action potential duration shortening ($+1 \pm 12$ vs. -14 ± 11 milliseconds) without affecting peak LV dP/dt . This beneficial effect on VFT was mainly due to HR reduction and was accompanied by a significant reduction in the hypoxic area ($26\% \pm 1\%$ vs. $38\% \pm 1\%$, $P < 0.0001$).

Conclusion: HR reduction and the decrease in myocardial damage induced by IVA protected against primary ischemic VF without altering myocardial contractility.

Key Words: cardioprotection, ivabradine, heart rate reduction, ventricular fibrillation threshold

(*J Cardiovasc Pharmacol*TM 2008;52:548–554)

INTRODUCTION

Ventricular fibrillation (VF) is a well-known complication of acute myocardial ischemia.^{1,2} In a pig model of brief and complete coronary occlusions leading to VF, we have previously demonstrated that sinus tachycardia enhances the risk of VF.^{3–5} Indeed, ventricular fibrillation threshold (VFT) is decreased at a higher sinus rate,⁶ and β -blockers are effective in preventing ischemia-induced VF.⁷

Ivabradine (IVA) is a novel heart rate (HR) lowering agent prescribed in patients with stable angina pectoris.⁸ This selective and specific inhibitor of the cardiac pacemaker I_f current⁹ reduces HR both at rest and during exercise without altering myocardial contractility and relaxation, atrioventricular conduction, and ventricular repolarization in all animal species tested.^{10–13} This HR reduction is associated with reduced myocardial oxygen demand and increased diastolic myocardial perfusion time during exercise.^{13–16} The effects of IVA against VF during acute myocardial ischemia are not known. The aim of this study was to assess the effect of IVA on the threshold of ischemic VF in a pig model of brief coronary occlusions. To study the interactions between the VFT, myocardial ischemia, and HR, we analyzed the effect of IVA with different HR (ventricular pacing) in the basal state and after ischemia.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted on a total of 54 young domestic pigs of either sex weighing 20–25 kg. The design of the study was approved by the Claude Bernard University Animal Care Committee.

The animals were broken down into 4 groups. In the first group (G1), the aim was to determine the IVA dose that would be effective on HR and on VFT. In the second group (G2), the aim was to compare the evolution of VFT during ischemia with IVA and a paced cycle length of 450 milliseconds and without IVA at a shorter cycle length of 300 milliseconds.

Received for publication March 14, 2008; accepted October 6, 2008.

From the *Laboratory of Medical Pharmacology, INSERM ERI 22, Grange Blanche Medical School, Claude Bernard University, Lyon, France; †Poison Center and Pharmacovigilance Department, Lyon University Hospitals, Lyon, France; ‡Institute of Forensic Medicine, Claude Bernard University, Lyon, France; and §Department of Cardiology, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.

Supported by grant INSERM ERI 22 from the Claude Bernard University of Lyon and by SERVIER.

The authors report no conflicts of interest.

Reprints: Dr. Timour Quadiri, PhD, Laboratory of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine Grange-Blanche, Claude Bernard University, Lyon, France, 8 Ave Rockefeller, 69373 Lyon CEDEX 08, France (e-mail: timour.quadiri@rockefeller.univ-lyon1.fr).

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

In the third group (G3), the changes in VFT under basal conditions, then after IVA, before and after ischemia, at 2 different cycle lengths (450 and 300 milliseconds) were studied. In the last group (G4), the evolution of VFT under basal conditions, then after IVA, without ischemia at 2 ventricular rates (cycle lengths of 400 and 300 milliseconds) was studied.

Animal Preparation

The animals were premedicated with 0.1 mg/kg of midazolam (Hypnovel; Roche, Neuilly-sur-Seine Cedex, France) intramuscularly, 30 minutes before the experiment. They were anesthetized with 100 mg/kg of chloralose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) injected via the marginal ear vein. Ventilation was achieved through a tracheostomy tube (Tracheoflex No. 8) using a Drager SA2 respirator equipped with a gas analyzer and capnograph. Initial tidal volume was set at 15 mg/kg, and the respiratory frequency was maintained at a fixed rate of 15 cycles per minute. The tidal volume was then adjusted to maintain the end-tidal CO₂ concentration within a physiological range (35–40 mm Hg). A 1:1 air–oxygen mixture was initially delivered, and later adjusted depending on the blood SaO₂, and sampled at regular intervals to maintain it between 98% and 100%.

The pigs were each placed on their right side, and a wide left thoracotomy was performed with resection of the fourth and fifth ribs. The heart was exposed and the pericardium opened. An arterial pressure line was established through a catheter inserted in the left carotid artery and connected to a polygraph (M1166 A, model 66 S; Hewlett Packard, Boeblingen, Germany, Inc) to monitor mean arterial blood pressure (mBP). Left ventricular maximal rate of pressure

increase (LV dp/dt_{max}) was electronically derived using Acknowledge software (Biopac System, Inc, Santa Barbara, CA) from intraventricular pressure signals obtained through a catheter positioned in the left ventricle from the right carotid artery. An electrocardiograph was recorded in the standard limb leads on an ECG (Cardiolab Amplifier; Prucka Engineering, Inc, Sugarland, TX) and monitored on an E-2089 oscilloscope (Siemens, Erlangen, Germany). Arrhythmias were identified by continuous display on a screen.

Induction of Ischemia

In groups 1, 2, and 3, the left anterior descending coronary artery was dissected free near its origin and a snare looped around it in preparation for occlusion. Ischemia was induced by complete and brief (1-minute) occlusion of the proximal left anterior descending coronary artery by tightening the snare around the artery. Repeated abrupt coronary occlusions were performed at 15-minute intervals (Fig. 1). Ischemia was evaluated visually by the cyanotic appearance of the unperfused zone distal to the occlusion and by the shift of the ST-segment in the lead DII.

Electrophysiological Recordings

Determination of the VFT

VFT determinations were performed at 15-minute intervals after treatment to ensure the stability of the parameter. VF was triggered at the end of each coronary occlusion episode by applying a series of 8 diastolic stimuli synchronized with respect to the R waves of the ECG in lead II. Rectangular stimuli of 100-millisecond duration were delivered by an S1 stimulator (Hugo Sachs, Germany) and transmitted with a bipolar electrode, the tip of which had been positioned in the

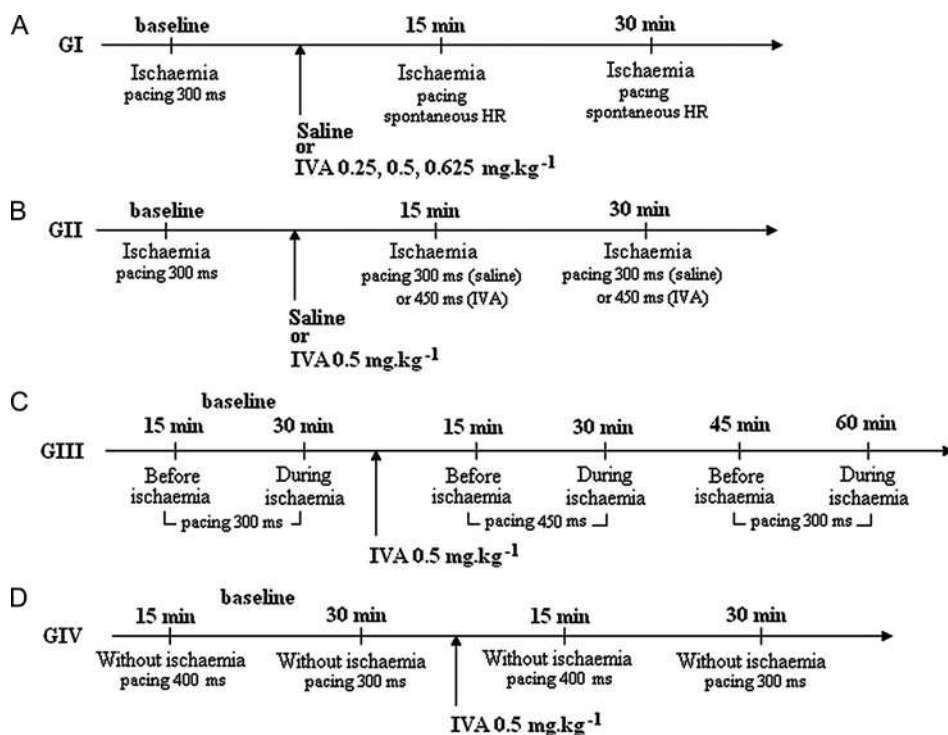


FIGURE 1. Experimental design. A, Experimental design with group 1 (dose-dependent effect): pacing at spontaneous period. B, Experimental design with group 2: pacing fixed at 300 milliseconds for the saline group and 450 milliseconds for the IVA group. C, Experimental design with group 3: determination of VFT before and during ischemia at 2 different cycles (450 and 300 milliseconds). D, Experimental design with group 4: determination of VFT before and during ischemia at 2 different cycles (400 and 300 milliseconds).

subepicardial layer of the ventricle wall at the center of the ischemic area. The intensity was increased by increments of 0.5 mA every 10 seconds until the occurrence of VF.

A 360-J current shock applied to the thoracic wall was used for defibrillation (D 802 defibrillator; Siemens).

Experimental Procedure

In G1, 3 doses of IVA (Institut de Recherches Internationales Servier, Courbevoie, France), 0.25, 0.5, and 0.625 mg/kg, were tested on HR and VFT in separate groups of 6 pigs each (Fig. 1A). The dose range was chosen by taking into account the previous results obtained by Thollon et al¹⁷ in anesthetized open-chest large pigs. IVA was administered as a bolus through a catheter inserted in the jugular vein. Controls received saline ($n = 6$) in similar conditions. VFT was then evaluated under pacing at spontaneous period. The dose of IVA, which induced a markedly significant effect on VFT without adverse effects, was retained for the present study.

In G2, VFT was determined before and after saline or IVA administration in 2 groups with 9 animals each (Fig. 1B). Stimuli were applied under pacing at a fixed rate of 300 milliseconds in the control animals and 450 milliseconds in the IVA-treated animals (Fig. 1B).

In G3, there were 8 animals. VFT was first determined in the basal state under pacing at 300 milliseconds (before and after ischemia) and then after administration of IVA and pacing with a cycle length of 450 milliseconds (before and after ischemia). The same study was performed with IVA and a cycle length of 300 milliseconds (Fig. 1C).

In G4, there were 4 animals. The evolution of VFT was compared under basal conditions and without ischemia after administration of IVA at 2 different paced cycle lengths, 400 and 300 milliseconds (Fig. 1D).

Monophasic Action Potential Duration

Myocardial electrical activity was analyzed locally through a Catronic ORX electrode 6F (Plastimed, Saint-Leu-La-Forêt, France) positioned in the subepicardial layer of the left ventricle wall close to the center of the ischemic zone. This electrode was connected to an ECG (Cardiolab Amplifier; Prucka Engineering, Inc). Monophasic action potential duration (dMAP) was recorded as often as necessary and monitored on an E-2089 oscilloscope (Siemens). It was measured at 90% repolarization.

Mitochondrial Succinodehydrogenase Activity

At the end of the experiment, the entire heart was excised, frozen, and thawed. The weight and volume were determined, and left ventricular (LV) sections were cut from the base to the apex into several approximately 1-cm-thick slices. Each slice was cut into several approximately 1-mm-thick slices that were incubated in nitroblue tetrazolium for 15 minutes at 37°C. This reagent stains the myocardium blue where mitochondrial succinodehydrogenase (SDH) is active, whereas the loss of the enzymatic activity leaves the myocardium unstained (nitroblue tetrazolium–negative zone). After 10% formaldehyde fixation over 24 hours, the slices were photographed with a digital camera. Using a computerized planimetric program (Image Analyzer, Scion Image;

Scion Corporation, Frederick, MD), we measured the hypoxic area of each section and compared it with the nonhypoxic area. The hypoxic/nonhypoxic ratio was multiplied by the number of sections (5–7), which provided the hypoxic mass of the total LV area.¹⁸

Statistical Analysis

In G1, dose dependence was evaluated by 1-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett test when a significant difference was noted. In baseline conditions, the electrophysiological and hemodynamic parameters in G2 (saline vs. IVA) were compared using Student *t* test. Two-way ANOVA was used for repeated measures. In G3 ($n = 8$), ANOVA was performed for each parameter to take into account: (1) the effect of IVA injection, (2) the role of ischemia, and (3) 400- or 300-millisecond rate of pacing.

In G4, only VFT and HR were analyzed. For both parameters, ANOVA was performed to take into account: (1) the presence or absence of ischemia and (2) the rate of pacing (450 or 300 milliseconds).

Comparison of the loss of mitochondrial SDH activity was performed with Student *t* test. All results are presented as means \pm SEM, and the differences were considered to be significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Determination of IVA Dose–Effect Relationship

The dose-dependent HR reduction by IVA reached -13% ($n = 6$, $P < 0.05$), -23% ($n = 6$, $P < 0.01$), and -30% ($n = 6$, $P < 0.01$) at 0.25, 0.5, and 0.625 mg/kg, respectively, at 30 minutes (G1, Fig. 2A). VFT was increased by 1.5, 2.7 ($P < 0.01$), and 3.5 at 0.25, 0.5, and 0.625 mg/kg, respectively, at 30 minutes (Fig. 2B).

Because some animals exhibited nonsustained runs of wide complex QRS at a dose of 0.625 mg/kg, we decided to use a dosage of 0.5 mg/kg for the rest of the study.

Comparison of Effect of IVA 0.5 mg/kg on VFT, dMAP, Hemodynamics, and SDH Activity Versus Saline

In G2, HR was not altered in animals treated with saline at 15 and 30 minutes, whereas IVA 0.5 mg/kg produced a significant 31% reduction in HR (Fig. 3A). VFT was significantly increased after IVA 0.5 mg/kg: 7.2 ± 0.8 and 7.6 ± 0.7 mA in the IVA group versus 2.2 ± 0.3 and 3.1 ± 0.4 mA in the saline group, at 15 and 30 minutes, respectively, $n = 9$ in each group, $P < 0.001$ (Fig. 3B).

In baseline conditions, ischemia induced a reduction of dMAP in G2 (-13 ± 9 milliseconds in the IVA-treated pigs and -9 ± 7 milliseconds in the saline group). A significant increase in dMAP ($P < 0.05$, $n = 9$) was observed after IVA treatment during ischemia. Consequently, IVA tended to prevent, but not significantly, the shortening of dMAP induced by ischemia compared with saline ($+1 \pm 12$ vs. -14 ± 11 milliseconds at 30 minutes). The dMAP corrected for HR showed no difference when calculated before or after IVA injection (data not shown). The changes of electrophysiological parameters, that is, HR, VFT, and dMAP indicated

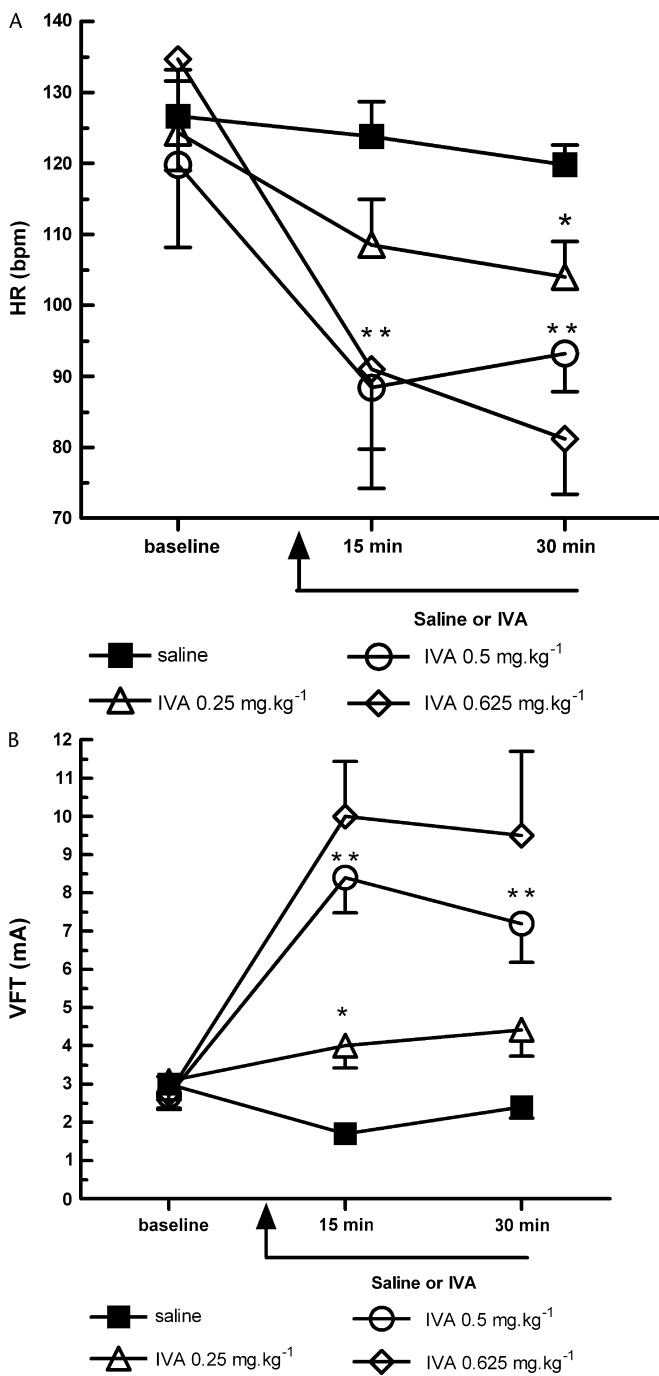


FIGURE 2. Dose-dependent effect of IVA on HR (A) and VFT (B) recorded after coronary occlusion before and after administration of saline or IVA 0.25, 0.5, and 0.625 mg/kg; n = 6 per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus saline.

a significant inverse correlation between HR and VFT ($r = -0.65$, $P < 0.0001$) and a positive correlation between VFT and dMAP ($r = 0.40$, $P < 0.01$).

Compared with saline, IVA 0.5 mg/kg (G2) did not modify mBP measured before ischemia (Table 1). During ischemia, mBP was reduced in G2, but this effect was more

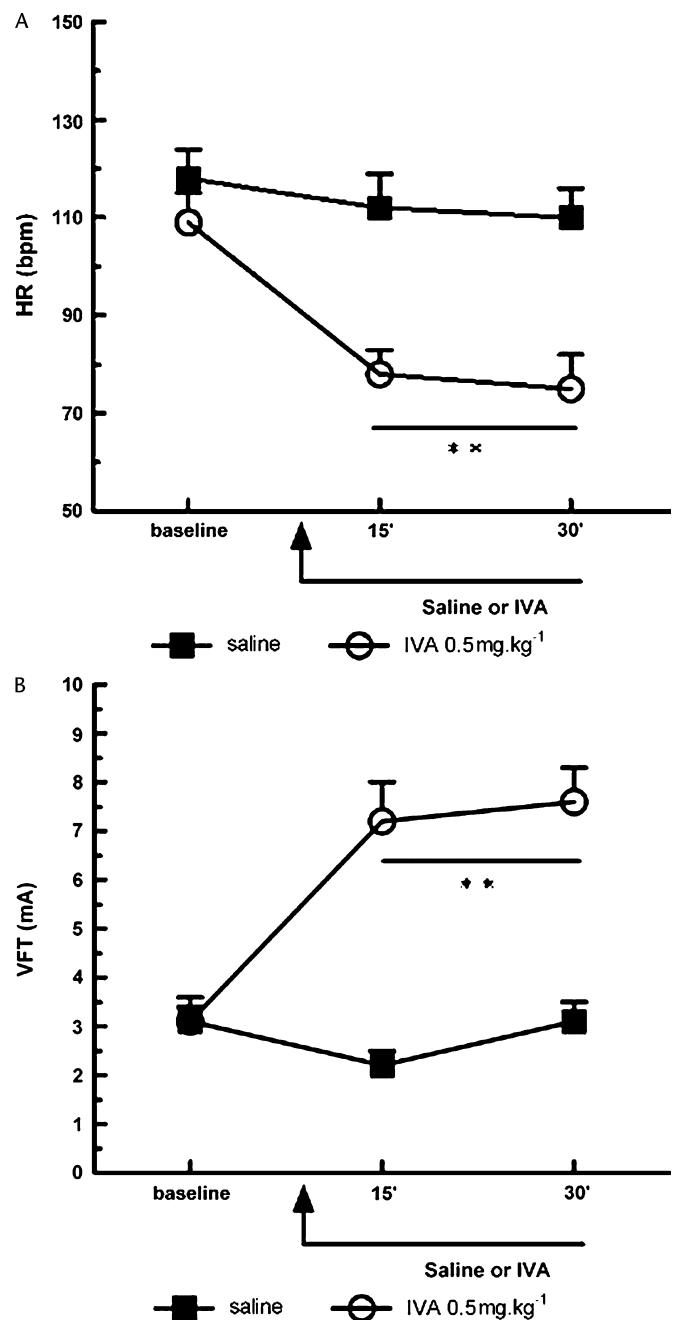


FIGURE 3. A, HR recordings during ischemia before and after administration of saline and IVA 0.5 mg/kg; n = 9 per group. ** $P < 0.001$ treatment effect, no time effect. B, VFT recordings after coronary occlusion before and after administration of saline and IVA 0.5 mg/kg; n = 9 per group. ** $P < 0.001$ treatment effect, no time effect.

marked in the IVA-treated pigs compared with the saline ones (Table 1). There was no difference on LV dp/dt_{max} between saline and IVA-treated groups, before or during ischemia.

The loss of mitochondrial SDH activity under ischemia, expressed as a percentage of the total LV mass, was significantly reduced in the IVA-treated pigs compared with

TABLE 1. Hemodynamics

	Baseline	Posttreatment		P	
		15 Minutes	30 Minutes	Interaction	Treatment
Before coronary occlusion					
mBP (mm Hg)					
Saline	66 ± 3	66 ± 3	64 ± 4	0.888	0.075
IVA	70 ± 5	60 ± 3	57 ± 4		
LV dP/dt _{max} (mm Hg/s)					
Saline	1358 ± 79	1426 ± 128	1344 ± 123	0.900	0.658
IVA	1306 ± 62	1351 ± 109	1302 ± 158		
After coronary occlusion					
mBP (mm Hg)					
Saline	66 ± 3	64 ± 3	61 ± 4	0.895	<0.01
IVA	63 ± 4	53 ± 4	49 ± 4		
LV dP/dt _{max} (mm Hg/s)					
Saline	1103 ± 70	1090 ± 108	1076 ± 88	0.480	0.865
IVA	1076 ± 49	1136 ± 80	1001 ± 53		

Values are mean ± SEM; n = 9 pigs in each group.

LV dP/dt_{max}, maximum change in left ventricular pressure over time.

saline group (G2) (26% ± 1% of LV mass vs. 38% ± 1%, respectively, $P < 0.0001$). A positive correlation was found between HR and the loss of mitochondrial SDH activity induced by ischemia ($r = 0.59$, $P = 0.01$).

Interactions Between VFT, Ischemia, and HR

To analyze the interactions between VFT, myocardial ischemia, and HR, we evaluated the effect of IVA under different pacing rates in the basal state and after ischemia. In G3 (Fig. 4), there was no significant change in VFT ($P = 0.45$) without ischemia under basal conditions and with IVA, whatever may be the cycle length. A significant drop in VFT

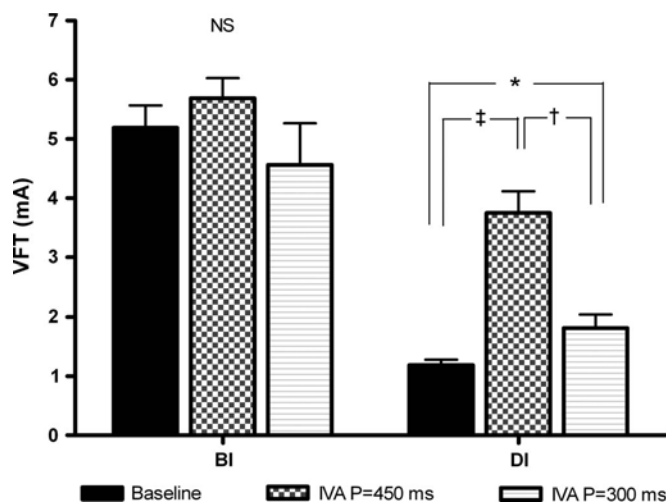


FIGURE 4. Determination of VFT at baseline, then with IVA at 2 different cycles (450 and 300 milliseconds) before and after ischemia; n = 8 per group. ‡ $P < 0.0001$ IVA 450 milliseconds versus baseline, † $P < 0.005$ IVA 300 milliseconds versus IVA 450 milliseconds, * $P < 0.05$ IVA 300 milliseconds versus baseline.

was observed after ischemia under basal conditions: 5.19 ± 0.38 mA before ischemia versus 1.19 ± 0.09 mA during ischemia, $P < 0.001$. During ischemia, IVA significantly increased VFT at a pacing cycle length of 450 milliseconds: 3.75 ± 0.37 versus 1.19 ± 0.09 mA under basal conditions ($P < 0.0001$, Fig. 4), allowing a substantial restoration of VFT when compared with the value observed before ischemia.

At a pacing cycle length of 300 milliseconds, IVA-induced increase in VFT was sharply reduced but still significant ($P < 0.028$): 1.81 ± 0.2 mA with IVA versus 1.19 ± 0.09 mA under basal conditions (Fig. 4).

In G4, under basal conditions without ischemia (Fig. 5), VFT under pacing at 400 milliseconds was 6.25 ± 1.03 mA before administration of IVA and 6.87 ± 0.96 mA after administration of IVA not significant (NS). With a cycle length of 300 milliseconds, VFT ranged from 3.75 ± 0.75 mA before administration of IVA to 3.63 ± 1.01 mA after administration of IVA (NS, Fig. 5). Thus, the reduction in cycle lengths (from 400 to 300 milliseconds) triggered a significant drop in VFT ($P < 0.005$, Fig. 5) independently of the presence of IVA.

DISCUSSION

In the present study, the reduction of HR induced by IVA 0.5 mg/kg (-31%) was associated with a significant ($P < 0.001$) decreased VF occurrence associated with a significant VFT increase of approximately 285%. We also demonstrated that IVA prevented the additional reduction in dMAP and decreased the size of the hypoxic area during myocardial ischemia. All these effects were obtained without any significant change in LV dP/dt_{max}.

In previous experiments, VFT was measured before coronary artery occlusion and we always observed a significant drop in this parameter soon after occlusion.^{19,20} Using the same experimental model, we have previously identified the profibrillatory or antifibrillatory effects of a variety of drugs

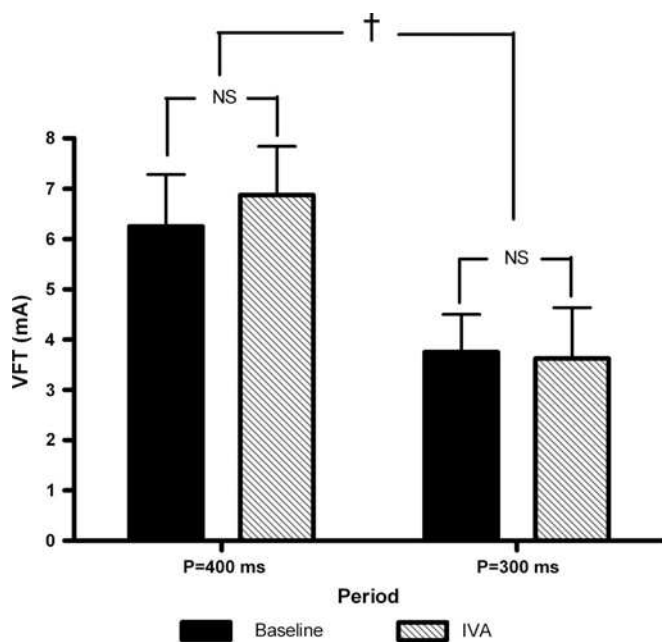


FIGURE 5. Determination of VFT at baseline, then with IVA at 2 different cycles (400 and 300 milliseconds), then with IVA at the same 2 cycles; $n = 4$ per group. † $P < 0.005$ baseline 300 milliseconds versus baseline 400 milliseconds † $P < 0.005$ IVA 300 versus IVA 400 milliseconds.

including class I antiarrhythmics,³⁻⁵ β -blockers,^{7,21} and calcium antagonists.²²⁻²⁴ Class I antiarrhythmics, in particular class Ia and mainly class Ic derivatives, were thought to be potential drugs for the treatment of ischemic arrhythmias but were subsequently found to increase the propensity toward VF during myocardial ischemia.³⁻⁵ β -blockers and calcium antagonists increase VFT by reducing the HR or reversing calcium overload, respectively, but β -blockers and calcium antagonists also induced adverse electrophysiological (prolongation of conduction times) and/or hemodynamic effects, (reduced myocardial contractility). In the present study, IVA, a selective and specific inhibitor of the pacemaker current I_f , was shown to protect from VF induced by ischemia with no alterations in electrophysiological or hemodynamic parameters.

The mechanisms by which IVA may decrease electrical instability are numerous (sympathovagal balance, wall shear stress, etc.). Within the very first seconds after coronary occlusion, K^+ ions accumulate in interstitial fluids due to defective transfer into cells.²⁵ In turn, intracellular concentrations in Na^+ and Ca^{2+} increase due to defective outward movement.²⁶ The decreased resting potential of myocardial fibers is associated with decreased dMAP subsequent to accelerated repolarization, leading to increased excitability.²⁷ Dispersion of ventricular repolarization during ischemia could also favor reentrant arrhythmias. It is very likely that IVA, by reducing HR, could attenuate these proarrhythmic changes. By slowing HR, IVA reduces O_2 consumption and improves myocardial perfusion. These properties may probably counteract the stretch induced by greater filling and thus may decrease the deleterious electrophysiological changes induced by stretch.

Our results suggest that the favorable evolution of VFT obtained with IVA during myocardial ischemia is mainly due to the HR reduction induced by this drug because only a slight increase of VFT could be observed when the HR was kept constant (ie, 300 milliseconds). This change only occurred during ischemic periods. Although the autonomic nervous system plays a major role in arrhythmogenesis during ischemia, the impact of IVA on sympathovagal balance is not known.

By reducing myocardial oxygen consumption and improving the coronary blood flow, IVA increases oxygen supply during exercise.^{15,16,29} An original feature of the IVA mechanism of action is the dose-dependent reduction in HR^{30,31} that is not associated with alterations in cardiac contractility,^{13,29,32} the resistance of coronary arteries, or the electrophysiological properties of the myocardium.⁹ The present study confirms the absence of an IVA effect on cardiac contractility or cardiac electrophysiological properties during acute ischemia. The risk of VF may be higher when the size of the myocardial hypoxic area is increased.³³ IVA produced a reduction in the size of the hypoxic zone ($26\% \pm 1\%$ of the LV mass compared with $38\% \pm 1\%$ in controls). Interestingly, this reduction was correlated with slowing of the HR. Such a reduction in the size of the hypoxic zone is likely to contribute to the beneficial effect of IVA. However, identification of the precise mechanistic link between decreased arrhythmogenicity and bradycardia cannot be inferred from the present study.

Limitations

Although the VFT method we have used has been criticized, it has proven to be very reliable in our laboratory, as attested by our previous publications.^{7,19,20,24,34} The other limitations of this study are that the triggering of VF was artificial and that this induction was performed very early after coronary occlusion. It is known that in pigs, the majority of arrhythmias occur between 15 and 40 minutes after coronary occlusion.³⁵ However, in humans, acute coronary artery balloon occlusion during angioplasty or coronary spasm can be rapidly followed by ventricular arrhythmias. Finally, the highly heterogeneous ischemia-induced effects (existence of subepicardial and subendocardial border zones, gradients in ionic concentrations) were not been taken into account. However, the aim of the present study was not to explain the mechanism by which HR reduction could decrease cardiac instability but to document the impact of HR reduction induced by a new selective HR-lowering agent on the propensity toward VF. Our results underscore the need for research on how HR reduction increases cardiac electrical stability.

CONCLUSIONS

The present study suggests that by reducing HR and the size of the hypoxic zone, IVA increases VFT and could prevent an ischemia-induced decrease in dMAP. These properties open a new perspective in the management of patients with ischemic coronary disease. These beneficial effects should be further explored to confirm that IVA can offer a new therapeutic approach in the prevention of sudden death due to primary ischemic VF.

REFERENCES

- Roelandt J, Klootwijk P, Lubsen J, et al. Sudden death during long-term ambulatory monitoring. *Eur Heart J*. 1984;5:7–20.
- Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev*. 1989;69:1049–1169.
- Timour Q, Aupetit JF, Loufoua-Moundanga J, et al. Class I antiarrhythmic drugs and myocardial ischaemia: study in the pig heart in situ. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 1991;343:645–651.
- Aupetit JF, Timour Q, Larbre J, et al. Arrhythmogenicity of antiarrhythmic drugs and intraventricular conduction disorders: possible aggravation by myocardial ischemia. Study in the porcine in situ heart. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1993;7:217–223.
- Aupetit JF, Timour Q, Loufoua-Moundanga J, et al. Proarrhythmic effects of lidocaine in the acutely ischemic porcine heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;25:810–816.
- Bui-Xuan B, Aupetit JF, Freysz M, et al. Cardiac beta-adrenoreceptor activation and ventricular fibrillation under normal and ischemic conditions. *Cardiovasc Res*. 1996;32:1056–1063.
- Aupetit JF, Frassati D, Bui-Xuan B, et al. Efficacy of a beta-adrenergic receptor antagonist, propranolol, in preventing ischaemic ventricular fibrillation: dependence on heart rate and ischaemia duration. *Cardiovasc Res*. 1998;37:646–655.
- European Public Assessment Report (EPAR). Procortalan (2005). Available at: www.emea.europa.eu.
- DiFrancesco D, Camm JA. Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drug*. 2004;64:1757–1765.
- Colin P, Ghaleh B, Hittinger L, et al. Differential effects of heart rate reduction and beta-blockade on left ventricular relaxation during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H672–H679.
- Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, et al. Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation*. 2004;109:1674–1679.
- Simon L, Ghaleh B, Puybasset L, et al. Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;275:659–666.
- Vilaine JP, Bidouard JP, Lesage L, et al. Anti-ischemic effects of ivabradine, a selective heart rate-reducing agent in exercise-induced myocardial ischemia in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;42:688–696.
- Colin P, Ghaleh B, Monnet X, et al. Contributions of heart rate and contractility to myocardial oxygen balance during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H676–H682.
- Monnet X, Ghaleh B, Colin P, et al. Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise-induced myocardial ischemia and stunning. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299:1133–1139.
- Monnet X, Colin P, Ghaleh B, et al. Heart rate reduction during exercise-induced myocardial ischaemia and stunning. *Eur Heart J*. 2004; 25:579–586.
- Thollon C, Bidouard JP, Cambarrat C, et al. Stereospecific in vitro and in vivo effects of the new sinus node inhibitor (+)-S16257. *Eur J Pharmacol*. 1997;339:43–51.
- Tabib A, Loire R. Quantitative morphometry of myocardial necrosis. Anatomical and enzymatic correlates, clinical index for estimating the amount of necrosed tissue. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1981;74:641–648.
- Aupetit JF, Bui-Xuan B, Kioueh I, et al. Opposite change with ischaemia in the antifibrillatory effects of class I and class IV antiarrhythmic drugs resulting from the alteration in ion transmembrane exchanges related to depolarization. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000;78:208–216.
- Vaillant F, Tsibiribi P, Bricca G, et al. Trimetazidine protective effect against ischemia-induced susceptibility to ventricular fibrillation in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2008;22:29–36.
- Aupetit JF, Timour Q, Freysz M, et al. Vulnerability to ventricular fibrillation related to ischemia: comparison of the acute effects of beta-blockers and calcium antagonists. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1994;327: 25–39.
- Timour Q, Aupetit JF, Freysz M, et al. Possible prevention by amlodipine of ventricular fibrillation related to brief ischemia episodes. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996;74:1308–1314.
- Timour Q, Bui-Xuan B, Faucon G, et al. Delay by a calcium antagonist, amlodipine, of the onset of primary ventricular fibrillation in myocardial ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1996;10:447–454.
- Bui-Xuan B, Aupetit JF, Freysz M, et al. Prevention by calcium antagonists of profibrillatory effects of class I antiarrhythmic drugs in acute myocardial ischemia: study in pig heart in situ. *Pharmacotherapy*. 1997;17:737–745.
- Kleber AG. Extracellular potassium accumulation in acute myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16:389–394.
- Renaud JF. Internal pH, Na⁺, and Ca²⁺ regulation by trimetazidine during cardiac cell acidosis. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1988;1:677–686.
- Lyons CJ, Burgess MJ, Abildskov JA. Effects of acute hyperkalemia on cardiac excitability. *Am Heart J*. 1977;94:755–763.
- Ferrari R, Cargnoni A, Ceconi C. Anti-ischaemic effect of ivabradine. *Pharmacol Res*. 2006;53:435–439.
- Hennersdorf MG. Possibilities of reducing heart rate by I(f)-channel inhibitor. *Med Klin (Munich)*. 2006;101(Suppl 1):150–152.
- Mahlberg-Gaudin FH, Bouly M, Chezaubernard C, et al. Pharmacological basis of f-current inhibition. *Heart Drug*. 2005;5:14–20.
- Vilaine JP. The discovery of the selective I(f) current inhibitor ivabradine. A new therapeutic approach to ischemic heart disease. *Pharmacol Res*. 2006;53:424–434.
- Hindman MC, Wagner GS. Arrhythmias during myocardial infarction: mechanisms, significance, and therapy. *Cardiovasc Clin*. 1980;11:81–102.
- Tsibiribi P, Bui-Xuan C, Bui-Xuan B, et al. The effects of ropivacaine at clinically relevant doses on myocardial ischemia in pigs. *J Anesth*. 2006; 20:341–343.
- Coronel R, Wilms-Schopman FJ, deGroot JR. Origin of ischemia-induced phase 1b ventricular arrhythmias in pig hearts. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39:166–176.

Article 2

**Heart rate reduction with ivabradine increases
ischemia-induced ventricular fibrillation threshold:
role of myocyte structure and myocardial perfusion.**

Article à *British Journal of Pharmacology*, le 20 juillet 2010.

Heart rate reduction with ivabradine increases ischemia-induced ventricular fibrillation threshold: role of myocyte structure and myocardial perfusion

Fanny Vaillant¹, Jacques Descotes², Philippe Chevalier³, Alejandro Mazzadi⁴, Alain Tabib⁵, Bernard Bui-Xuan¹, Cécile Riera¹, Dalila Belhani¹, Leila Dehina¹, Quadiri Timour^{1,2}

¹INSERM ERI22, Université Claude Bernard de Lyon, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France

²Centre antipoison, Centre de pharmacovigilance, 162 avenue Lacassagne, 69424 Lyon cedex 03, France

³Département de Cardiologie, Hôpital Louis Pradel, 28 avenue du Doyen Lépine 69677 cedex, Bron, France

⁴Centre d'Étude et de Recherche Multimodal Et Pluridisciplinaire en Imagerie du vivant (CERMEP), 69 boulevard Pinel, 69677, Bron cedex, France

⁵Institute de Médecine Légale, Université Claude Bernard de Lyon, 8 avenue Rockefeller, 69373 cedex 08, Lyon, France

*Corresponding author: Tel.: +33 (0)478777188 – Fax: +33 (0)478777185
Email: fanny.vaillant45@gmail.com

Short title: Ivabradine increases ventricular fibrillation threshold

Disclosures

The authors have no conflict of interest to declare.

Aims: We showed previously that ivabradine (IVA), a selective inhibitor of the cardiac pacemaker I_f current, achieved protection against ischemia-induced ventricular fibrillation (VF) in pigs by increasing the VF threshold (VFT). This was correlated to the heart rate reduction (HRR), the limitation of monophasic action potential shortening and the reduction of the hypoxic area. This study investigated myocyte ultrastructure and regional myocardial blood flow (RMBF), potentially involved in these cardioprotective effects of IVA.

Methods and results: Myocardial ischemia was induced in pigs by total 1-min occlusion of the left anterior descending coronary artery following *i.v.* administration of saline (n=6) or IVA (0.25 mg/kg, n=6). Electrophysiological and hemodynamic parameters, the hypoxic area and the presence of myocyte ultrastructural lesions were evaluated. The RMBF was assessed using positron emission tomography following ischemia/reperfusion in IVA (0.25 mg/kg, *i.v.*, n=6) or vagal stimulation (n=4) groups. Compared with saline, IVA induced a 32% HRR ($p<0.01$), a 2.9-fold increase in the VFT ($p<0.001$) and a reduction of the hypoxic area without any change in left ventricular dp/dt_{max} . IVA preserved cardiomyocyte morphology, particularly mitochondrial ultrastructure. Compared with baseline, RMBF during reperfusion was increased in the hypoxic area following IVA administration (+218% vs. +97%, $p<0.05$) or vagal stimulation (+195% vs. +127%, $p<0.05$). This increase was sharply reduced by atrial pacing in IVA-group.

Conclusion: IVA exerts a cardioprotection from ischemia-induced VF by increasing RMBF and preserving cardiomyocyte and mitochondrial ultrastructure, which opens new perspectives regarding potential targets that would be involved in the anti-ischemic effects of IVA.

Keywords

Ventricular fibrillation , ivabradine, heart rate reduction , cardiomyocyte morphology, myocardial perfusion.

INTRODUCTION

Ventricular fibrillation (VF) is a well-known complication of acute myocardial ischemia and is a major cause of sudden cardiac death in patients with ischemic coronary disease (Janse *et al.*, 1989; Roelandt *et al.*, 1984). Since the antiarrhythmic/antifibrillatory drugs usually used to prevent such episodes of VF did not show any benefit on mortality and were even associated with higher mortality in large, randomised, placebo-controlled trials (1989), there still exists a medical need for new cardioprotective agents. Indeed, the incidence of primary VF during acute myocardial ischemia is high (estimated between 2 and 19% depending on the definition of primary fibrillation (Wyman *et al.*, 2004)) and results in significant mortality. We previously demonstrated that sinus tachycardia enhances the risk of ischemia-induced VF (Aupetit *et al.*, 1993; Aupetit *et al.*, 1995; Bui-Xuan *et al.*, 1996; Timour *et al.*, 1991). Ivabradine (IVA), a selective inhibitor of the I_f pacemaker current resulting in heart rate reduction (HRR), has been approved for the treatment of stable angina (Borer *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2009; Sulfi *et al.*, 2006). Ivabradine could provide a new therapeutic approach in the prevention of sudden death due to VF induced by ischemia which is often associated with tachycardia. Previously, in a pig model of VF, we reported that HRR induced by acute administration of IVA provide dose-dependent protection against VF induced by a transient (1 min) total ligation of the left anterior descending (LAD) coronary artery (Vaillant *et al.*, 2008). However, the exact mechanisms underlying this cardioprotective effect remain to be elucidated. In models of prolonged myocardial ischemia, ultrastructural lesions were reported at the cellular level, and in particular on mitochondrial shape (Salinas *et al.*, 2000), and an inverse correlation was reported between HR and mitochondrial injury in a similar experimental setting (Venditti *et al.*, 2008). Heusch *et al.* (Heusch *et al.*, 2008) showed that IVA-induced HRR was associated with a reduction of the infarct size when administered before, during or at the end of a 90-min controlled coronary artery hypoperfusion and 120-

min reperfusion, suggesting that treatment with IVA could preserve the myocardium from ischemia-induced ultrastructural lesions.

The objective of our study was thus to further investigate the consequences of transient but total coronary occlusion at the morphological and functional levels and to evaluate the potential benefits of HRR induced by IVA on: 1) the electrical threshold of VF (VFT); 2) the prevention of structural lesions in cells and mitochondria and 3) on regional myocardial blood flow (RMBF) determined using positron-emission tomography (PET) as a non-invasive procedure.

MATERIALS AND METHODS

The present study design was approved by the animal care committee of Claude Bernard University (Lyon, France).

Protocol 1: this protocol studies the impact of IVA on myocardial morphological and functional changes.

Animal preparation

The experiments were conducted on a total of 12 domestic male pigs weighing 20-25 kg (3 months). The animals were premedicated with 20 mg/kg ketamine (Roche Neuilly-sur-Seine cedex, France) intramuscularly 30 min before the experiment. Anaesthesia was induced by an *i.v.* bolus of 3 mg/kg propofol (via the marginal ear vein) and maintained with an *i.v.* perfusion of 100 mg/kg chloralose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) injected via jugular vein. Parameters of ventilation have been previously reported (Vaillant *et al.*, 2008). Pigs were each placed on the back and a wide thoracotomy was performed. The heart was exposed and the pericardium opened. An ECG was recorded in the standard limb leads on a Mingograf 34 electrocardiograph.

Induction of ischemia

The LAD coronary artery was dissected free near its origin and a snare is looped around it in preparation for occlusion. Ischemia was induced by complete and brief (1-min) occlusion of the proximal LAD by tightening the snare around the artery. Repeated abrupt coronary occlusions were performed at 15-min intervals (Figure 1A). Ischemia was evaluated by the cyanotic appearance of the unperfused zone distal to the occlusion and by the ST-segment shift in the lead II on the ECG.

Treatments

6 pigs received the dose of 0.25 mg/kg IVA (Institut de Recherches Internationales Servier, Courbevoie, France) administered as an *i.v.* bolus through the jugular vein, and 6 pigs received the same volume of saline (control group) in similar conditions (Figure 1A). The dose of 0.25 mg/kg of IVA was chosen because it was previously demonstrated as being the lowest effective dose able to increase the VFT (Vaillant *et al.*, 2008).

Electrophysiological recordings

Heart rate (HR) was monitored on the ECG in lead II and recorded at the end of the 1-min coronary occlusion, just before VFT determination.

Ventricular fibrillation was triggered at 1-min coronary occlusion by the application of a ventricular pacing in the hypoxic area as described previously (Vaillant *et al.*, 2008), to evaluate the VFT. Two baseline and four post-injection VFT determinations were performed alternately under ventricular pacing at “spontaneous HR” (*i.e.* HR recorded just before induction of ischemia) and at a fixed rate of 300 ms (~200 bpm). Pacing at 300 ms was performed in order to study the impact of HRR *per se* by counteracting the HR-lowering effect of IVA (Figure 1A). A 360 J shock applied to the thoracic wall was used for defibrillation (D802 defibrillator, Siemens, Erlangen, Germany).

Myocardial electrical activity was analysed by the measurement of duration of monophasic action potential (dMAP) in the centre of hypoxic area as described previously (Vaillant *et al.*, 2008).

Hemodynamic parameters

An arterial pressure line was established through a catheter inserted into the left carotid artery and connected to a polygraph (M1166 A, model 66 S, Hewlett Packard Inc, USA) to monitor mean arterial blood pressure (m BP). The increase in LV-dP/dt_{max} was electronically derived using Acknowledge software (Biopac System Inc., Santa Barbara, CA, USA) from intraventricular pressure signals obtained through a catheter positioned in the LV from the right carotid artery. All hemodynamic parameters were measured 1 min before and 1 min after each coronary artery occlusion, before and after IVA administration.

Morphological and functional changes

Immediately after euthanasia, all of the animals' hearts were excised for the determination of succinodeshydrogenase (SDH) activity to determine the extent of the hypoxic area as described in our previous study (Vaillant *et al.*, 2008).

Samples of the LV were taken in the centre of the hypoxic area analysis of cardiomyocyte ultrastructure using transmission electron microscopy. They were fixed in 4% glutaraldehyde - 0.3 M Na cacodylate-HCl (pH 7.4; 2 hours), post-fixed with 2% osmium tetroxide - 0.15 M Na cacodylate-HCl (pH 7.4; 1 hour), dehydrated with ethanol and embedded in Epon (60°C; 72 h). Then, 60-90 nm-thick sections were cut using an ultramicrotome (RMC/MTX; Elexience), contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Sections were observed using a JEOL 1200CX transmission electron microscope to evaluate the number of nuclei with disrupted membranes and irregular chromatin agglomeration (among the 20 nuclei examined), the number of disrupted or swollen sarcolemma (among the 20 sarcolemma examined), the number of cell junction disruptions (among the 20 cell junctions examined), the number of necrotic cardiomyocytes (among the 20 cardiomyocytes examined), the number of displaced,

swollen, or degranulated mitochondria and disrupted mitochondrial crests (among the 200 mitochondria examined) and the number of capillaries with thickening of the basal membrane and abnormal chromatin distribution in the nuclei (among the 20 capillaries examined).

Caspase3, p53 and bcl2 mRNA levels

The expression of 3 genes involved in the apoptosis cascade, namely caspase 3, p53 and bcl2 was studied on myocardial samples taken in LV in the centre of hypoxic area. A reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by real-time PCR was performed. RNA extraction from myocardial tissue was performed using the RNeasy minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The quantitation of each gene of interest relative to the control gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was performed using Real Quant software.

Protocol 2: this protocol aimed at testing the impact of IVA on RMBF in our pig model of experimental myocardial ischemia/reperfusion.

RMBF was first determined in 10 pigs 15 min before, just after and 15 min after induction of myocardial ischemia induced by a 1-min complete ligation of the LAD coronary artery, as described in Protocol 1, at spontaneous HR (condition 1, Figure 1B). These pigs were divided into two groups. In one group (n=3), RMBF was then determined after injection of IVA (0.25 mg/kg; condition 2) and finally under atrial pacing (aimed to suppress IVA effect; condition 3). Atrial pacing was achieved via an electrode positioned in the left atrial appendage and connected to the stimulator delivering a 1-mA current with a 5-ms duration and a variable period defined on the spontaneous HR of the animals prior to IVA injection. In the other group (n=4), RMBF was then determined under vagal stimulation (condition 2) and finally after cessation of vagal stimulation (condition 3), in order to evaluate the effect of

HRR obtained by a non-pharmacological method (Figure 1B). Vagal stimulation was obtained through an electrode placed near the vagus nerve following its dissection and connected to a stimulator (Hugo Sachs, Freiburg, Germany) delivering 20-V electric currents with a 100-ms period and a 1.5-ms duration, so that the reduction in HR was close to that expected to be obtained following IVA injection.

An ECG was recorded in the standard limb leads on a Mingograf 34 electrocardiograph. HR was recorded during the experimental session as described in Protocol 1.

Evaluation of RMBF using PET

RMBF was quantitated using PET (Siemens/ECAT EXACT HR+ 63-slice whole-body tomography). [^{15}O]H₂O (250-300 MBq) was injected as an *i.v.* bolus. Data acquisition lasted for 1 min, which enabled dynamic series uptake of 22 frames (10 frames x 4s; 2 x 10s; 6 x 20s; and 4 x 30s). RMBF was estimated as described by Iida *et al.* (Iida *et al.*, 1991). Briefly, 6 regions of interest (ROI) were drawn along the heart's small axis (Figure 1C). Of these, one is located on the LAD coronary artery path (ROI 6) and 2 others located outside the ischemic area (ROI 2 and 3), served as controls. RMBF was quantitated 15 min prior to myocardial ischemia (determinations 1, 4 and 7, Figure 1B), then immediately after a 1-min coronary occlusion (determinations 2, 5 and 8) and finally 15 min after removal of the occlusion (determinations 3, 6 and 9). The RMBF (mL/min/g) was measured in the hypoxic area (ROI 6) and in a remote area (ROI 2 and 3). RMBF in the hypoxic area was normalised per beat and expressed as a percentage of RMBF in the remote area.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed by GraphPad PRISM[®].

Protocol 1: A two-way ANOVA was used to analyse treatment and time effects on HR, VFT, dMAP and dP/dt_{max} followed by a Bonferroni test for multiple comparisons. The hypoxic area and mRNA levels of caspase 3, p53 and bcl2 were analysed using an unpaired Student t test. The results of electron microscopy examination were compared using a Mann-Whitney test. The correlation between electrophysiological and morphological parameters was studied by calculating the Pearson coefficient.

Protocol 2: The effects of treatment and time on HR were analysed as in Protocol 1. Results of RMBF evaluation were analysed using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni test for multiple comparisons.

RESULTS

Protocol 1

Effects of IVA on HR, VFT, dMAP and hemodynamic parameters

At baseline, there was no difference in HR and VFT between control and IVA-groups. HR was significantly decreased following IVA administration as compared with saline-treated animals (103 ± 4 bpm vs. 133 ± 4 bpm, respectively; $p < 0.01$) Figure 2A.

Following treatment, VFT at spontaneous HR (VFT3 and VFT5) was significantly increased in IVA-treated animals as compared with saline-treated animals (4.17 ± 0.34 mA vs. 1.42 ± 0.17 mA, respectively; $p < 0.001$), whereas no differences in VFT across groups were observed when paced at 300 ms (VFT4 and VFT6), Figure 2B. In IVA-treated animals, VFT at spontaneous HR was increased 2.4-fold as compared to baseline VFT in the same animals (4.17 ± 0.34 mA vs. 1.75 ± 0.34 mA, respectively; $p < 0.01$) while no differences were observed in saline-treated animals.

During ischemia, dMAP was significantly increased in IVA-treated animals when compared with saline-treated animals ($+14\%$ vs. -2% , respectively; $p < 0.05$), data not shown.

A significant inverse correlation was found between HR and VFT ($r=-0.45$, $p<0.05$), HR and dMAP ($r=-0.64$, $p<0.05$), and a significant positive correlation was found between VFT and dMAP ($r=0.61$, $p<0.05$).

At baseline, there was no significant difference in mBP and LV-dP/dt_{max} between control and IVA-groups. As previously observed following an acute *i.v.* administration of IVA (Gardiner *et al.*, 1995; Vaillant *et al.*, 2008), mBP was significantly reduced in IVA-treated animals compared with saline-treated animals, whereas LV-dP/dt_{max} remained unchanged between the two groups (Table 1). mBP decrease was mainly supported by a decrease of diastolic arterial pressure due to the delay of diastolic time.

Effects of IVA on myocardial morphological and functional changes

The loss of mitochondrial SDH activity, used to determine the extent of the hypoxic area and expressed as a percentage of the total LV mass, was significantly reduced in IVA-treated animals as compared with saline-treated animals ($16.8\pm 1.5\%$ vs. $30.6\pm 0.6\%$; $p<0.001$).

Interestingly, this reduction in the hypoxic area was also significantly correlated to HRR induced by IVA ($r=0.57$, $p<0.05$) and to its related increase in VFT ($r=0.74$, $p<0.05$).

For all ultrastructural parameters analysed, abnormalities were consistently observed in approximately 75% of cardiomyocytes in the saline group namely mitochondria shifting towards the cell membrane, swelling, degranulation and formation of clefts, but also abnormal shape of the nucleus and capillaries, interstitial oedema, all indicative of a substantial myocardial injury (Table 2 and Figure 3). Overall, administration of IVA had a beneficial protective effect on all ischemia-induced ultrastructural changes; lesions were found in approximately 25% of cardiomyocytes. A significant positive correlation was found between HR and these ultrastructural lesions ($r=0.60$, $p<0.05$).

Protocol 2

Effects of IVA on HR and RMBF

No differences in HR or in the relative RMBF in the hypoxic area were noticed across groups at baseline before, during or after ischemia (Figure 4A and 4B, condition 1). A similar reduction in HR of approximately 30% ($p < 0.001$) was obtained following IVA injection or vagal stimulation (Figure 4A, condition 2). At baseline and before ischemia, RMBF was homogeneously distributed in the myocardium (Figure 4C, 1) while the ischemic area became hyperaemic immediately at reperfusion (Figure 4C, 2). When compared with the baseline condition (condition 1) before induction of ischemia, both treatments induced a significant increase in RMBF (Figure 4D, 2). As compared with condition 1, RMBF determined just after myocardial ischemia was markedly increased in the hypoxic area following IVA injection (+218% vs. +97%, respectively; $p < 0.05$) (Figure 4B). Similarly, RMBF just after myocardial ischemia was increased in pigs submitted to vagal stimulation, when compared with condition 1 (+195% vs. +127%, respectively), suggesting that HRR *per se* induced an increase in the RMBF. Although the increase in RMBF associated with vagal stimulation was maintained beyond cessation, the increase associated with IVA injection was sharply reduced by atrial pacing, performed at the initial spontaneous HR, confirming that IVA-associated RMBF increase was due to HRR (Figure 4B, condition 3).

DISCUSSION

This study showed that HRR induced by acute intravenous injection of 0.25 mg/kg IVA exerts a global cardioprotective effect during experimental transient myocardial ischemia in pigs, as evidenced by an increase in VFT which is in part explained by an increase in dMAP, a reduction of the hypoxic area, a preservation of myocyte ultrastructure and an improvement of the RMBF, without any change in $LV-dP/dt_{max}$.

Previous studies showed the beneficial anti-ischemic effects of IVA treatment in models of prolonged myocardial ischemia (Ceconi *et al.*, 2009; Heusch *et al.*, 2008; Monnet *et al.*, 2004; Monnet *et al.*, 2001) which were associated with severe myocardial injuries, including a large infarct area with scar tissue formation. However, no information exists regarding the potential effects of IVA treatment during brief coronary occlusions leading to ventricular fibrillation, as it could occur in patients with angina pectoris. Here, we developed a model reproducing a coronary stricture by inducing brief but total coronary occlusions of 1-min duration leading to VF followed by 15-min reperfusion between each sequence of occlusion/fibrillation. In Protocol 1, the cumulative duration of the experimental ischemia was about ten min, limiting potential ischemia-induced myocardial injuries, in particular structural lesions in cells and mitochondria. In fact, repeated ischemia - fibrillation and reperfusion will probably lead to a kind of preconditioning, but the impact of this phenomenon is similar in both groups. Indeed, the duration of ischemia did not induce apoptosis as supported by the gene expression of apoptotic factors, including caspase 3, p53 or bcl2 (data not shown); this might be due to length of ischemia (Borer *et al.*, 2008; Sodha *et al.*, 2008). In this context, acute administration of IVA had no additional effect. Nevertheless, in our experimental setting, substantial electrophysiological, morphological and functional cardiac alterations could be observed and administration of IVA showed beneficial effects on all these parameters.

It is well described that prolonged ischemia/reperfusion results in mitochondrial injury potentially leading to arrhythmias or cardiac cell death (Zhang *et al.*, 2008). Here, we provide evidence that alterations of mitochondrial shape also occur in the context of repeated brief coronary occlusions followed by ventricular fibrillation. This is a critical finding with regard to the prevention of primary VF in patients with coronary artery disease.

Moreover, Couvreur *et al.* recently reported a protective effect of HRR after administration of IVA against ventricular dysfunction induced by myocardial ischemia. This effect was

explained by an increase in FKBP12/12.6 which modulates cardiac excitation-contraction and prevents calcium leaks from the sarcoplasmic reticulum that occurs during the first few minutes of acute myocardial ischemia (Couvreur *et al.*). These results could explain the prevention of ventricular fibrillation in our model of acute myocardial ischemia. Therefore, any drugs able to protect mitochondrial structure, such as IVA via its HRR, could improve mitochondrial function and thus effectively prevent VF. Indeed, alterations of mitochondrial structure appears following tachycardia induced by intraperitoneal injection of triiodothyronine (Venditti *et al.*, 2008) or atrial pacing associated with intracellular calcium overload (Liem *et al.*, 2007), which is well known to induce electromechanic dysfunction (Moshal *et al.*, 2008) or cell death (Dong *et al.*, 2006). So, HRR induced by IVA can protect against these alterations due to tachycardia, and reduce cardiac energy consumption while it maintains energy pool, thus it enhances recovery at reperfusion and provides protection against VF susceptibility. This could be linked with the recent observation of Ceconi *et al.* who presented evidence that IVA preserves cardiac energy metabolism such as ATP concentration and the redox state following ischemia/reperfusion in isolated perfused rabbit hearts (Ceconi *et al.*, 2009).

Also, despite a limited number of animals (due to the complexity of the procedure: combination of PET technology and repeated coronary occlusions), the present study presented evidence that HRR induced by vagal stimulation or IVA results in an increase in RMBF in the hypoxic area at the onset of reperfusion. In previous studies, HRR induced by IVA led to similar results with prolonged myocardial ischemia, but RMBF was assessed invasively using the microspheres technique (Heusch *et al.*, 2008; Heusch *et al.*, 1983; Indolfi *et al.*, 1993; Monnet *et al.*, 2004; Monnet *et al.*, 2001).

In addition to the reduction in O₂ consumption induced by HRR, these beneficial effects may provide a better cellular microenvironment with increased O₂ supply, which could explain in part the observed protection from acute ischemia-induced ultrastructural lesions and VF. In IVA-treated animals when submitted to atrial pacing, HR and RMBF returned to baseline, strengthening the idea that HRR *per se* induced increase in RMBF. In contrast, the effect of vagal stimulation was not reversed upon cessation of the stimulation that could be explained by the persistent vasodilatory effect of the vaso-intestinal peptide released in the coronary artery bed from stimulated vagal nerve fibres (Henning *et al.*, 2001).

Monnet *et al.* (Monnet *et al.*, 2001) specified that HRR induced by IVA was associated with an improved subendocardial blood flow and was abolished by atrial pacing. Interestingly, Indolfi *et al.* (Indolfi *et al.*, 1991) evaluated pig RMBF under atrial pacing at various HR during myocardial ischemia and found that HRR led to increased subendocardial RMBF without changes in subepicardial RMBF. Importantly, they reported that when vascular resistances decreased in only one area, there was a transmural redistribution of blood flow, which can be explained by a decrease in myocardial O₂ consumption (due to bradycardia) associated with an increase in blood flow (due to epi-endocardial redistribution).

A similar result to that obtained with IVA has been described with beta-blockers which are associated with a reduction of the impact of ischemia/reperfusion (Buck *et al.*, 1981; Matsuzaki *et al.*, 1984), but IVA is not associated with deleterious effects such as negative inotropic effects and unmasked alpha-adrenergic coronary vasoconstriction (Heusch *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 1995).

Conclusion

The present study provides evidence that beside the myocardial lesions resulting from prolonged myocardial ischemia, substantial morphological and functional alterations can be

detected even after transient episodes of myocardial ischemia leading to primary ventricular fibrillation and which is in part explained by the improvement of RMBF.

The cardioprotection provided by acute administration of IVA could be of great interest in prevention of VF's onset during acute phase of angina pectoris, and also for the management of patient and their recuperation. Given that beta-blockers are used as a preventive treatment for VF, further investigations should compare their effects with those of IVA in similar experimental settings.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Institut de Recherches Internationales Servier, Courbevoie, France. The authors wish also to thank the "Centre Commun d'Imagerie à Laennec" (CeCIL).

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- (1989). Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators. *N Engl J Med* **321** (6): 406-412.
- Aupetit JF, Timour Q, Larbre JP, Loufoua-Moundanga J, Kioueh I, Lopez M, *et al.* (1993). Arrhythmogenicity of antiarrhythmic drugs and intraventricular conduction disorders: possible aggravation by myocardial ischemia--study in the porcine in situ heart. *Cardiovasc Drugs Ther* **7** (2): 217-223.
- Aupetit JF, Timour Q, Loufoua-Moundanga J, Barral-Cadiere L, Lopez M, Freysz M, *et al.* (1995). Profibrillatory effects of lidocaine in the acutely ischemic porcine heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **25** (5): 810-816.
- Borer JS, Heuzey JY (2008). Characterization of the heart rate-lowering action of ivabradine, a selective I (f) current inhibitor. *Am J Ther* **15** (5): 461-473.
- Buck JD, Hardman HF, Warltier DC, Gross GJ (1981). Changes in ischemic blood flow distribution and dynamic severity of a coronary stenosis induced by beta blockade in the canine heart. *Circulation* **64** (4): 708-715.
- Bui-Xuan B, Aupetit JF, Freysz M, Loufoua J, Faucon G, Timour Q (1996). Cardiac beta-adrenoreceptor activation and ventricular fibrillation under normal and ischemic conditions. *Cardiovasc Res* **32** (6): 1056-1063.
- Ceconi C, Cargnoni A, Francolini G, Parinello G, Ferrari R (2009). Heart rate reduction with ivabradine improves energy metabolism and mechanical function of isolated ischemic rabbit heart. *Cardiovasc Res* **84** (1): 72-82.
- Couvreur N, Tissier R, Pons S, Chebboul V, Gouni V, Bruneval P, *et al.* Chronic heart rate reduction with ivabradine improves systolic function of the reperfused heart through a dual mechanism involving a direct mechanical effect and a long-term increase in FKBP12/12.6 expression. *Eur Heart J* **31** (12): 1529-1537.
- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA (2006). Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* **1**: 405-434.
- Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T (1995). Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardic agent, S16257, in conscious rats. *Br J Pharmacol* **115** (4): 579-586.
- Henning RJ, Sawmiller DR (2001). Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc Res* **49** (1): 27-37.
- Heusch G, Baumgart D, Camici P, Chilian W, Gregorini L, Hess O, *et al.* (2000). alpha-adrenergic coronary vasoconstriction and myocardial ischemia in humans. *Circulation* **101** (6): 689-694.

Heusch G, Skyschally A, Gres P, van Caster P, Schilawa D, Schulz R (2008). Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur Heart J* **29** (18): 2265-2275.

Heusch G, Yoshimoto N (1983). Effects of heart rate and perfusion pressure on segmental coronary resistances and collateral perfusion. *Pflugers Arch* **397** (4): 284-289.

Iida H, Rhodes CG, de Silva R, Yamamoto Y, Araujo LI, Maseri A, *et al.* (1991). Myocardial tissue fraction--correction for partial volume effects and measurement of tissue viability. *J Nucl Med* **32** (11): 2169-2175.

Indolfi C, Guth BD, Miyazaki S, Miura T, Schulz R, Ross J, Jr. (1991). Heart rate reduction improves myocardial ischemia in swine: role of interventricular blood flow redistribution. *Am J Physiol* **261** (3 Pt 2): H910-917.

Indolfi C, Ross J, Jr. (1993). The role of heart rate in myocardial ischemia and infarction: implications of myocardial perfusion-contraction matching. *Prog Cardiovasc Dis* **36** (1): 61-74.

Janse MJ, Wit AL (1989). Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev* **69** (4): 1049-1169.

Liem DA, Honda HM, Zhang J, Woo D, Pignatelli B (2007). Past and present course of cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol* **103** (6): 2129-2136.

Matsuzaki M, Patrietti J, Tajimi T, Miller M, Kemper WS, Ross J, Jr. (1984). Effects of beta-blockade on regional myocardial flow and function during exercise. *Am J Physiol* **247** (1 Pt 2): H52-60.

Monnet X, Colin P, Ghaleh B, Hittinger L, Giudicelli JF, Berdeaux A (2004). Heart rate reduction during exercise-induced myocardial ischemia and stunning. *Eur Heart J* **25** (7): 579-586.

Monnet X, Ghaleh B, Colin P, de Curzon OP, Giudicelli JF, Berdeaux A (2001). Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise-induced myocardial ischemia and stunning. *J Pharmacol Exp Ther* **299** (3): 1133-1139.

Moshal KS, Metreveli N, Frank I, Tyagi SC (2008). Mitochondrial MMP activation, dysfunction and arrhythmogenesis in hyperhomocysteinemia. *Curr Vasc Pharmacol* **6** (2): 84-92.

Prasad UK, Gray D, Purcell H (2009). Review of the If selective channel inhibitor ivabradine in the treatment of chronic stable angina. *Adv Ther* **26** (2): 127-137.

Roelandt J, Klootwijk P, Lubsen J, Janse MJ (1984). Sudden death during long-term ambulatory monitoring. *Eur Heart J* **5** (1): 7-20.

Salinas P, Gil-Loyzaga P, Barrigon S (2000). Ultrastructural evidence of the protective effect of Na⁺/H⁺ exchange inhibition on the in vitro damage induced by ischemia reperfusion in the interventricular septum of the rabbit heart. *Pharmacol Toxicol* **86** (5): 222-227.

Simon L, Ghaleh B, Puybasset L, Giudice I, Ili JF, Berdeaux A (1995). Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* **275** (2): 659-666.

Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, *et al.* (2008). The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg* **33** (5): 906-913.

Sulfi S, Timmis AD (2006). Ivabradine -- the first selective sinus node I (f) channel inhibitor in the treatment of stable angina. *Int J Clin Pract* **60** (2): 222-228.

Timour Q, Aupetit JF, Loufoua-Moundanga J, Gerentes-Chassagne I, Kioueh I, Faucon G (1991). Class Ic antiarrhythmic drugs and myocardial ischaemia: study in the pig heart in situ. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **343** (6): 645-651.

Vaillant F, Timour Q, Descotes J, Manati W, Belhani D, Bui-Xuan B, *et al.* (2008). Ivabradine induces an increase in ventricular fibrillation threshold during acute myocardial ischemia: an experimental study. *J Cardiovasc Pharmacol* **52** (6): 548-554.

Venditti P, Bari A, Di Stefano L, Agnisola C, Di Meo S (2008). Effect of T3 treatment on the response to ischemia-reperfusion of heart preparations from sedentary and trained rats. *Pflugers Arch* **455** (4): 667-676.

Wyman MG, Wyman RM, Cannom DS, Criley JM (2004). Prevention of primary ventricular fibrillation in acute myocardial infarction with prophylactic lidocaine. *Am J Cardiol* **94** (5): 545-551.

Zhang J, Liem DA, Mueller M, Wang Y, Zong C, Deng N, *et al.* (2008). Altered proteome biology of cardiac mitochondria under stress conditions. *J Proteome Res* **7** (6): 2204-2214.

Figure Legends

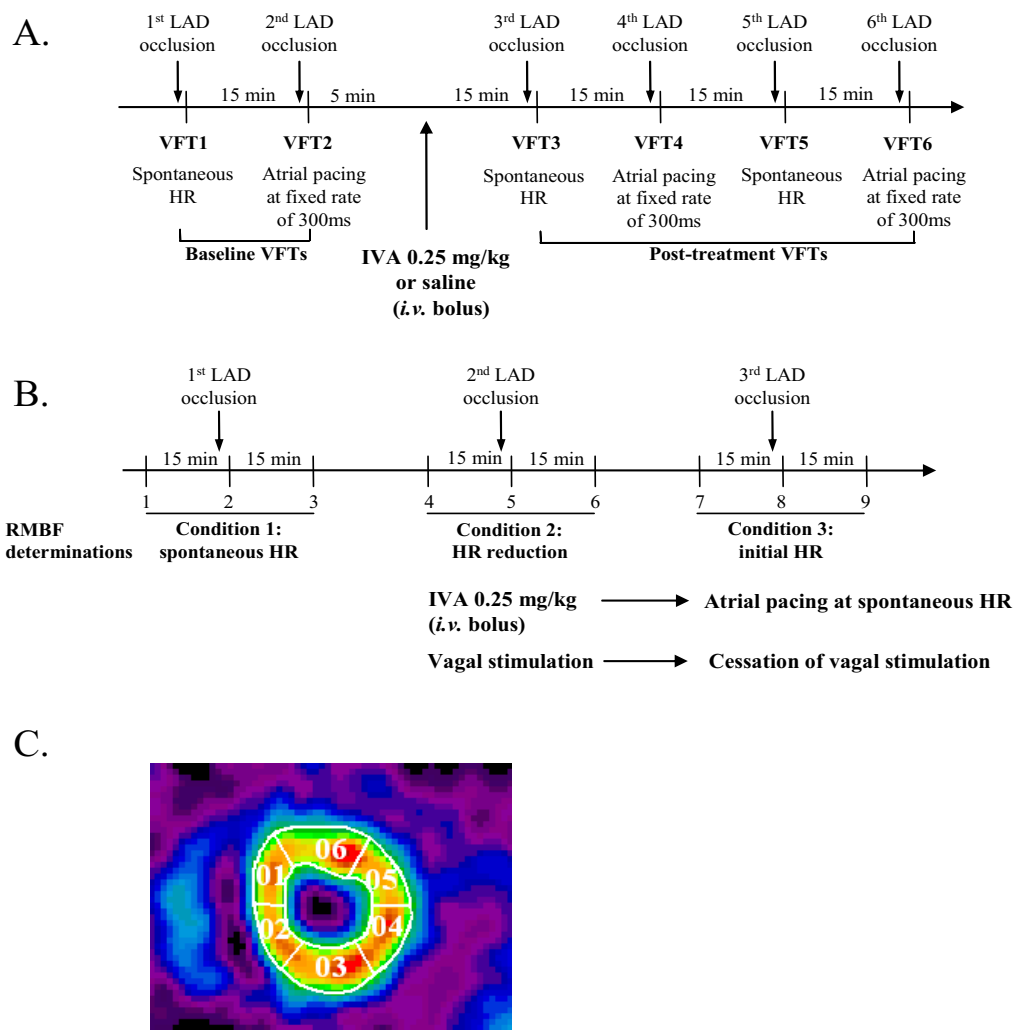


Figure 1: **A.** Representation of protocol 1: VFT determinations were performed at the end of each coronary occlusion, before and after administration of treatment, alternately at spontaneous HR and under 300 ms constant ventricular pacing in order to counteract the HRR. **B.** Representation of protocol 2: RMBF was determined 15 min before, just after and 15 min after myocardial ischemia at spontaneous HR (condition 1), following IVA injection or vagal stimulation set to obtain a HRR similar to that of IVA (condition 2) and finally under atrial pacing or after cessation of vagal stimulation (condition 3). **C.** Tomogram of the left ventricle obtained using PET. Six ROI were drawn along the heart's small axis, one in the LAD territory (ROI 6) and 2 outside the ischemic area (ROI 2 and 3) which was used as controls.

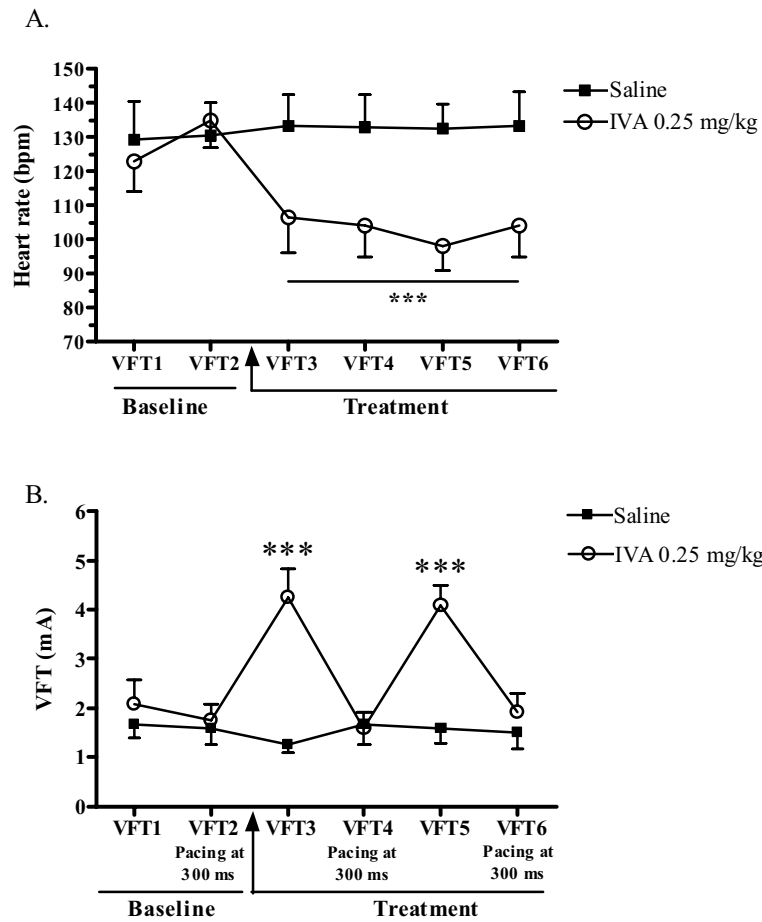


Figure 2: **A.** HR recorded during ischemia before each VFT determination, at baseline (VFT1-2) and under IVA or saline treatment (VFT3-6). *** $p < 0.001$ vs. saline during treatment, all times pooled. **B.** VFT recordings after coronary occlusion before and after administration of saline or IVA. VFT1, VFT3 and VFT5 were recorded under pacing at spontaneous HR. VFT2, VFT4 and VFT6 were recorded under atrial pacing at the fixed rate of 300 ms. *** $p < 0.001$ vs. saline during treatment, time effect $p < 0.01$, treatment*time interaction $p < 0.001$.

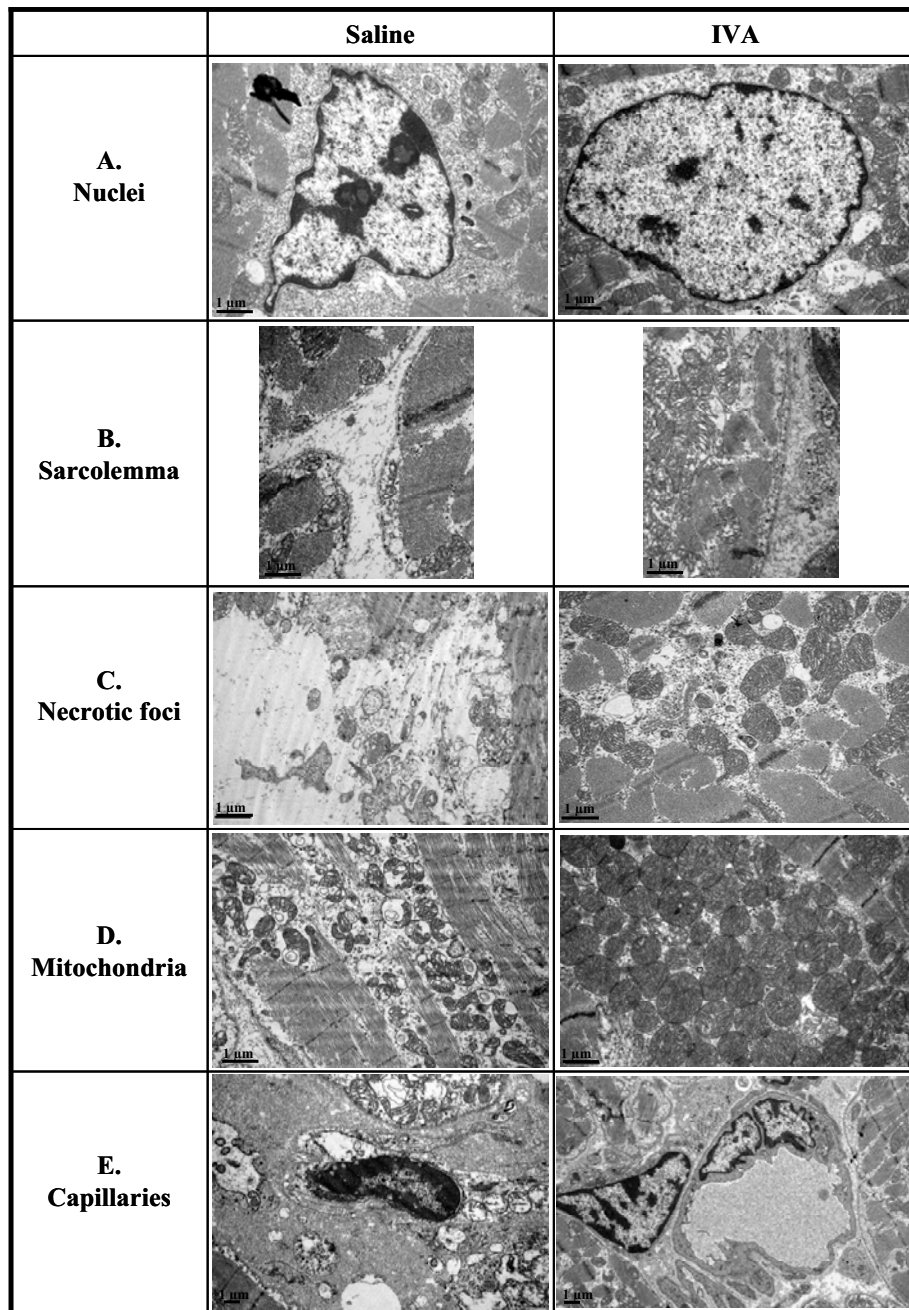


Figure 3: Representative ultra structural changes in the infarcted myocardium in IVA and saline-treated pigs.

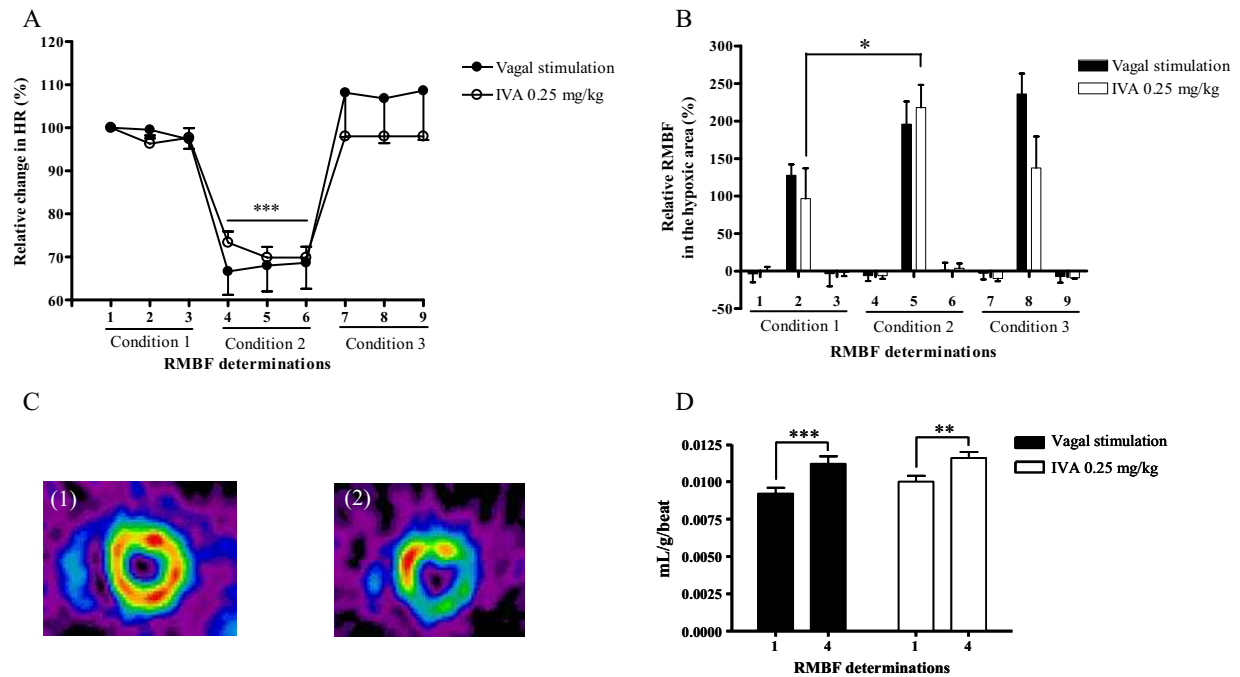


Figure 4: **A.** Percentage of HRR relative to the baseline value in IVA-treated pigs and pigs submitted to vagal stimulation (~30%, ***p<0.001 vs. baseline). **B.** Percentage of RMBF in the ischemic area relative to that of the remote area and normalised with HR in IVA-treated pigs and pigs submitted to vagal stimulation (*p<0.05). **C.** Tomograms representing relative RMBF at spontaneous HR before (1) and just after myocardial ischemia without treatment (2). Red colour indicates the maximal RMBF while blue colour indicates the minimal RMBF for each acquisition. **D.** RMBF expressed as blood flow per beat recorded 15 min after removal of the LAD occlusion (determination 1) at baseline and after IVA or vagal stimulation (determination 4) (*p<0.05 and ***p<0.001).

Article 3

Article soumis à *American Journal of Physiology*,

le 13 octobre 2010.

Ivabradine reduces heart rate while preserving metabolic fluxes and energy status of healthy normoxic working hearts

Benjamin Lauzier¹, Fanny Vaillant¹, Bertrand Bouchard¹, Roger Brownsey², Eric Thorin¹, Jean-Claude Tardif¹, Christine Des Rosiers^{1*}

¹Montreal Heart Institute, Departments of Nutrition, Surgery and Medicine, Université de Montréal, Montréal; Canada, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver, Canada.

Word count: 4999

***Corresponding author.**

Dr. Christine Des Rosiers, Laboratory of Intermediary Metabolism, Montreal Heart Institute, Research Center, 5000 Bélanger Street, Room 5350, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8.

Tel: (514) 376-3330 (#3594), Fax: (514) 376-1355

Email: christine.des.rosiers@umontreal.ca

Abstract: (250 words)

Aims: Heart rate reduction (HRR) is an important target in the management of patients with chronic stable angina. Most available drugs for HRR such as β -blockers have adverse effects, including on cardiac energy substrate metabolism, a well-recognized determinant of cardiac homeostasis. This study aimed at testing whether HRR by ivabradine (IVA), the first available selective inhibitor of the pacemaker current I_f , alters substrate metabolism in the healthy normoxic working heart.

Methods and Results: We assessed the functional and metabolic phenotype of working mouse hearts perfused *ex vivo* with physiological concentrations of ^{13}C -labelled carbohydrates and fatty acids in the absence (controls; n=10) or presence of IVA (n=10, 3 μM) with or without pacing. IVA significantly reduced HR (35 \pm 5%), increased stroke volume (39 \pm 9%), while maintaining similar cardiac output, contractility, power and efficiency. At the metabolic level, IVA did not impact on substrate selection to citrate formation, rates of glycolysis or tissue levels of high energy phosphates. Subsequently, we attempted to match the HRR effect of IVA using the β -blocker metoprolol. However, at concentrations up to 40 μM , metoprolol decreased markedly cardiac functional (flow: 25 \pm 6%; stroke volume: 30 \pm 10%; contractility: 31 \pm 9%), as well as glycolysis (2.9-fold), but marginally affected HR.

Conclusion: These results demonstrate that IVA, in contrast to metoprolol, selectively reduces HR while preserving energy substrate metabolism of working mouse hearts perfused *ex vivo*, a model that mimics to some extent the denervated transplanted heart. Our results provide the impetus for testing selective HRR by IVA on cardiac substrate metabolism in pathological models.

Keywords: Substrate metabolism isolated working heart, Ivabradine, β -blockers, Heart rate.

Introduction

Heart rate reduction (HRR) is an important target in the management of patients with ischemic heart disease, a major cause of morbidity and mortality in developed countries (for review see¹). Given their well-described beneficial effects on cardiovascular outcomes after myocardial infarction and in heart failure, β -blockers remain the first line treatment for many patients with ischemic heart disease.²⁻⁴ However, even new classes of β -blockers exhibit undesirable side effects on cardiac energy substrate metabolism,^{4,5} which is now a well-recognized determinant of energy production, redox status, contractile function, ion fluxes, oxygen consumption, as well as hypertrophy development and progression to heart failure.^{6,7}

Specifically, acute administration of β -blockers to the isolated perfused heart, which is devoid of neuronal influences, has been shown to affect substrate fluxes through major energy-yielding pathways. The effects include: (i) decreased cytosolic glycolytic flux, a process that has been linked to optimal ion pump function; and (ii) a shift in mitochondrial substrate selection – from long chain fatty acids (LCFAs) to carbohydrates (CHOs) - for oxidation in the Krebs cycle, most likely due to reduction of lipoprotein lipase and/or carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) activity.^{4,8,9} Such a shift from LCFA to CHO oxidation may be considered beneficial in the short term, particularly for the ischemic heart due to the greater yield of ATP per unit of O₂ consumed from CHO oxidation (i.e. 11-12%), however potential long-term consequences include lipotoxicity and energy deprivation.^{6,7} In addition, long-term β -blocker therapy may also have unwanted systemic metabolic effects, such as worsening of whole-body glycemic control.¹⁰ These deleterious metabolic effects are of particular concern given that HRR is used for the management of patients with both ischemic heart disease and diabetes.^{11,12} In this regard, ivabradine (IVA), which is the focus of the present study, may represent a good alternative for the management of these patients.

Indeed, IVA belongs to a new class of drugs that selectively inhibits the pacemaker current in the sinoatrial node¹³ thereby leading to specific HRR,¹⁴ without hemodynamic effects on blood pressure, vascular resistance and cardiac output. Acute IVA administration confers significant benefits in reducing infarct size after ischaemia/reperfusion, as well as preserving the metabolic energy and *redox* status in the *ex vivo* perfused heart subjected to ischemia-reperfusion. In addition, its long-term administration *in vivo* in pig or rat models of myocardial infarction prevented post-myocardial infarction adverse structural remodelling, while preserving contractile function and high energy phosphate status.¹⁵⁻¹⁷ In an *in vivo* dog model of exercise, Colin et al. demonstrated a linear relationship between myocardial oxygen consumption (MVO₂) and the extent of HRR by acute intravenous IVA.¹⁸ Under pacing, all effects were abolished¹⁹⁻²¹ thereby demonstrating that they are due to IVA's selective modulation of HR, although this concept has been recently challenged.^{22,23}

The effect of IVA-induced HRR on cardiac substrate selection for energy production has not yet been directly assessed. Hence, in this study, this was examined and compared to the effect of the β -blocker, metoprolol (METO) using our well-established model of *ex vivo* perfusion of working mouse hearts with physiological concentrations of ¹³C-labelled CHOs (glucose, lactate, pyruvate) and a LCFA (oleate) and continuous monitoring of physiological parameters using an intraventricular cannula.²⁴ This study model enables to assess the effects of IVA and METO directly on the heart, in absence of neuronal influences and at fixed values of arterial compliance (*i.e.* peripheral resistance), preload and afterload pressures. It mimics to some extent the conditions prevailing in patients following heart transplant for which IVA was recently proposed to be of some benefits.²⁵

Material and methods

Chemicals

The sources of chemicals, biological products, and ^{13}C -labelled substrates as well as the procedure for the dialysis of albumin have been described previously.²⁶

Heart perfusions in semi-recirculating working mode

Animal experiments were approved by the local animal care committee in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Male C57BL/6 mice (3-month-old; Charles River) were provided with food and water *ad libitum*. The procedures for heart isolation and its *ex vivo* perfusion in the working mode as well as measurements of the various functional parameters have been described previously.²⁴

Perfusion protocols: Effect of IVA: The concentration of IVA have been selected on the basis of previous studies^{19,27} and orientation experiments in which we evaluated the concentration-dependent HRR effects of IVA in our working mouse heart model (n=10 perfused hearts per dose) . Working mouse hearts were perfused for 40 minutes with a semi-recirculating modified Krebs-Henseleit buffer containing physiological concentrations of substrates and hormones (11 mM glucose, 0.8 nM insulin, 50 μM carnitine, 5 nM epinephrine, 1.5 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.4 mM oleate bound to 3% albumin) in the absence or in the presence of 3 μM IVA, with or without atrial pacing to match the HR of controls (n=10 perfused hearts per group). IVA was added after 10 minutes of perfusion to enable measurements of functional parameters under basal conditions, prior to IVA addition, in each heart. For any given perfusion, one of the unlabelled substrates was replaced by its corresponding labelled substrate, either [U- $^{13}\text{C}_6$]glucose

(molar percent enrichment (MPE): 50%; n=5) or [U-¹³C₁₈]oleate (MPE: 35%; n=5) to probe both CHO and LCFA metabolism, respectively. As previously described,²⁴ atrial influent and coronary effluent perfusate samples were collected to assess: (i) lactate dehydrogenase (LDH) release as an index of membrane integrity, (ii) pO₂, pCO₂, pH, Ca²⁺, and (iii) lactate and pyruvate release rates. At the end of the perfusion, hearts were freeze-clamped with metal tongs cooled in liquid nitrogen, weighed, and stored at -80°C for subsequent analyses.

Effect of METO: In a separate group of *ex vivo* heart perfusion experiments, we attempted to match the HRR obtained with IVA using the β-blocker METO at concentrations ranging from 4 to 40 μM. However, this turned out to be impossible because METO markedly reduced cardiac flows and contractility prior to HR. Consequently, because cardiac function affects substrate metabolism, and the specific characterization of the effect of METO on metabolic fluxes - independent of function - was beyond the scope of this study, we conducted only selected metabolic flux measurements in working hearts perfused with 4 (n=10) or 40 μM METO (n=3) using [¹³C₆]glucose or [U-¹³C₁₈]oleate.

Metabolic flux measurements

Our previously published studies^{24,26} provide definitions of the ¹³C terminology and descriptions for the measurements by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS; Agilent 6890N GC coupled to a 5973N MS) and equations for the calculations of 1) flux ratios relevant to substrate selection for energy production through mitochondrial citrate synthesis from the ¹³C enrichment of the acetyl (carbons 4+5) and oxaloacetate (carbons 1+2+3+6) moiety of citrate, and 2) efflux rates of unlabelled lactate and pyruvate reflecting cytosolic glycolysis from exogenous glucose (for perfusions with [U-¹³C₆]glucose).

Myocardial metabolites

Adenine nucleotides and creatine phosphate were determined in perchloric acid extracts of frozen heart tissue by high-performance liquid chromatography.²⁸

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was reached at $P < 0.05$ using a t-test for myocardial high-energy phosphates and ANOVA (one-way or two-way for repeated measures) followed by the Bonferroni multiple comparison post test.

Results

Ivabradine reduces heart rate while increasing stroke volume of perfused healthy normoxic working mouse hearts

Values for physiologically-relevant parameters assessed after 40 min of perfusion of normoxic healthy working mouse hearts in the absence or presence of 3 μ M IVA with or without pacing are reported in Figure 1 and Table 1. When compared to controls, hearts perfused with IVA displayed a reduction in HRR of about $35 \pm 5\%$ ($P < 0.001$ at 40 min; Figure 1A) and an increase in stroke volume (39%; Figure 1B), while coronary flow, developed pressure and contractility (dP/dt_{max}) did not differ significantly (Table 1 and Figure 1C). When expressed per beat, coronary flow was significantly increased in the IVA-treated group ($P < 0.001$ vs. controls; Figure 1D), suggesting improved myocardial perfusion. It is noteworthy that in our study model, which is devoid of neuronal influences, and in which compliance, preload and afterload pressures are fixed, MVO_2 expressed per beat is significantly increased in the IVA group (Table 1), concurring

with the increased stroke volume (+13.2%) and increased coronary flow (+48%, expressed in ml.beat⁻¹) and with effective matching of energy demand and supply.

Pacing of working hearts in the absence of IVA at a physiological rate of 407 ± 13 bpm, which was slightly but not significantly different than controls (368 ± 19 bpm) had a marginal impact on the physiological parameters measured ($n=10$; data not shown). However, all the aforementioned physiological effects of IVA were reversed by the application of atrial pacing to hearts perfused with IVA in order to match HR of controls, indicating that any functional changes induced by IVA were a direct consequence of HRR (Figure 1 and Table 1).

Ivabradine preserves energy substrate metabolism and status in perfused healthy normoxic working mouse hearts

Figure 2 depicts metabolic fluxes relevant to energy production, which were assessed in perfused healthy normoxic working mouse hearts. We assessed the effects of IVA on the contributions of oleate and glucose to the generation of mitochondrial acetyl-CoA for citrate synthesis. Acute administration of IVA had no significant impact on the relative contribution of oleate ($19.7 \pm 1.2\%$ with IVA vs. $19.9 \pm 2.3\%$ in controls) or glucose ($28.3 \pm 3.9\%$ IVA vs. $30.2 \pm 1.9\%$ in controls) to acetyl-CoA formation for citrate synthesis. In addition, we found no significant differences between groups for the absolute flux through glycolysis (0.63 ± 0.04 IVA vs. 0.67 ± 0.16 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ in controls). Pacing of working hearts in the presence of IVA (Figure 2), or in its absence (data not shown), had no significant effects on the contribution of glucose or oleate to acetyl-CoA formation.

One can estimate the ATP production rate in (i) the mitochondria from the measured MVO_2 assuming a theoretical ATP/O of 2.83,²⁴ and (ii) the cytosol from the measured glycolytic rates (1 ATP per lactate produced), which typically represents 5-10% of total cellular ATP

production). As shown in Figure 3, mitochondrial (A and C: 19 ± 2 vs. 28 ± 2 nmol ATP.beat⁻¹, $p < 0.05$) and cytosolic (B and D: 1.25 ± 0.16 vs. 2.30 ± 0.30 , nmol ATP.beat⁻¹, $p < 0.05$) ATP production is not modified per minute (A and B) while it is increased per beat (C and D) in the IVA treated-group, an effect that was abolished by the application of pacing. Substantiating the notion that myocardial energy status is well preserved in working hearts perfused with IVA, we found no difference in the tissue levels of creatine phosphate, ATP, ADP and AMP when compared to the control group (Table 2).

Altogether, these results demonstrate that in healthy normoxic working hearts, the addition of IVA did not affect myocardial substrate selection for energy production or the overall energy status of the heart.

Metoprolol decreases contractility, but not heart rate, of perfused healthy normoxic working mouse hearts

We attempted to match HRR induced by IVA at 3 μ M with addition of METO. However, at concentration up to 40 μ M, METO had little impact on HR (~19%, N.S.), yet it dramatically reduced contractility, cardiac output and stroke volume (by 36, 49 and 35% respectively; Figure 4). At 40 μ M METO, hearts displayed unstable function with irregular rate and force of contraction. At the metabolic level, the absolute flux through glycolysis was significantly reduced (3.9-fold; Table 3), an effect that may be a consequence of METO's effects on cardiac function.²⁹ At 4 μ M, a concentration at which METO had only marginal effects on functional parameters compared to controls (data not shown), we observed a small, albeit non significant decrease in the contribution of exogenous oleate to acetyl-CoA formation or glycolytic rate, while the contribution of glucose to pyruvate and acetyl-CoA was unchanged (Table 3).

Discussion

This study was undertaken to evaluate the metabolic impact of IVA, the first clinically available drug which selectively inhibits the major pacemaker current I_f in the sinoatrial node and leads to specific HRR. Specifically, we examined substrate fluxes through major energy producing pathways as well as the energy status using our well-established model of healthy normoxic working mouse hearts perfused *ex vivo* with ^{13}C -labelled substrates with continuous monitoring of functional parameters.^{24,26} With this model, we assessed the effects of IVA on heart function and metabolism in the absence of confounding external neuronal or hormonal influences and with no change in peripheral resistance (which is fixed by the buffer volume of the arterial compliance chamber). Healthy mouse hearts were perfused under physiologically-relevant conditions with respect to substrate supply (mixtures of CHOs and a LCFA bound to albumin) and energy demand (fixed preload of 15 mmHg and afterload of 50 mmHg).

The concentrations of IVA that has been used in many animal investigations *in vivo* (0.6 mg/kg) and *in vitro* (3 μM) aimed at achieving the clinical target of 20% HRR.^{19,23} In our *ex vivo* heart model, we have used 3 μM IVA and achieved a 35% HRR. As a whole, our data concur with previous studies in demonstrating that IVA increases stroke volume, most likely due to prolonged diastole; an effect that was associated with improved coronary perfusion, when expressed as coronary flow per beat. Other measured functional parameters were not significantly affected by IVA. The observed effects of IVA on stroke volume and myocardial perfusion were apparently the direct consequence of the effect on HRR, since they were reversed to normal by pacing. The effect of IVA on coronary perfusion may explain some of the benefits of IVA under ischemic conditions,^{19,30} since improving cardiomyocyte oxygenation may reduce the risk of

functional electrophysiological heterogeneity, a predictor of channel dysfunction and action potential duration.^{31,32}

Consistent with the increased stroke volume and myocardial perfusion when expressed per beat, IVA also increased MVO_2 per beat, while it had no impact on MVO_2 per min. This appears to contrast with the decreased MVO_2 per min previously reported *in vivo* in a dog model of heart failure.³³ However, it is important to consider that the isolated, denervated heart is perfused with a crystalline buffer - which has a lower oxygen carrying capacity than blood, at fixed pre- and after-load pressures. In this *ex vivo* model, coronary flow and MVO_2 vary linearly in response to changes in after-loads. These conditions differ from those that prevail *in vivo*, where the heart is also controlled by the sympathetic and parasympathetic systems, which play an important role *in vivo* and might be activated in patients with CAD and result in enhanced myocardial MVO_2 prior to IVA administration.

At the metabolic level, our relative flux data obtained using our *ex vivo* heart perfusion model demonstrate that, at a dose reducing the heart rate by 35% (3 μ M), IVA has no impact on substrate selection for energy production, the rate of glycolysis (expressed per min) or the myocardial levels of high energy phosphates. It is noteworthy that the ATP production rates in the cytosol (from the measured glycolytic rates) and in the mitochondria (from the measured MVO_2 assuming a theoretical ATP/O of 2.83²⁴) did not differ between groups when expressed per min. However, when expressed per beat, these rates were significantly higher for the IVA-treated group (Figure 3), concurring with our finding of an increased stroke volume and supporting an effective matching of energy supply and demand per beat. In our study, the application of pacing to working heart with IVA abolished all functional effects observed with IVA alone. This finding concurs with that of others obtained in various study models both *in vivo* and *ex vivo*.¹⁹⁻²¹

In this study, we have also attempted to match the effects of IVA to that of the widely used β -blocker metoprolol (METO). We tested concentrations of METO ranging from 4 to 40 μM , based on previous studies.^{34,35} However, we found only marginal, non-significant, HRR effects. In contrast, METO adversely affected cardiac function, including a dramatic reduction of contractility and cardiac output, as well as irregular beating. At the metabolic level, our finding of a significantly reduced glycolytic rate with 40 μM METO concurs with that of Sharma et al..²⁹ As was pointed out by these authors,²⁹ because cardiac metabolism is driven by cardiac function, one cannot exclude that METO's effects on cardiac substrate metabolism may be a consequence of its effects on cardiac function. In support of this notion, we found only marginal – non significant - effects of METO both on cardiac function, as well as on metabolic fluxes, including glycolysis as well as oleate and glucose contribution to acetyl-CoA production, when applied at 4 μM METO.

To explain the marked difference between IVA and METO on contractility and cardiac flow in our *ex vivo* heart model, several factors must be considered. *In vivo*, these drugs have been shown to be effective under conditions of increased HR as seen, for example, during sympathetic stimulation, exercise or pathological conditions.³⁶⁻³⁹ However, in our *ex vivo* working heart study model, which is devoid of neuronal influences, except for a small local release of norepinephrine from endogenous cardiac stores, the effects of IVA and METO have been tested under basal conditions. IVA remains effective in the *ex vivo* condition because it exerts its HRR effects by directly acting on the pacemaker current in the sinoatrial node. However, β -blockers exert their HRR effects predominantly through mechanisms extrinsic to the heart, which are inexistent in our *ex vivo* conditions. METO, which was selected because it is one of the most commonly used β -blocker in clinical practice, is a β_1 -adrenergic receptor specific inhibitor. Given the higher ratio of β_1 -to- β_2 -receptors in the myocardium (~ 4) than in the sinus

node,⁴⁰ one would anticipate that inhibition of β 1-receptors and consequent lowering of cAMP production, would have a greater impact on contractility than HR.

Collectively, our results demonstrate that, in contrast to METO, acute administration of IVA to healthy normoxic working hearts perfused *ex vivo* with a mixture of substrates mimicking the *in situ* milieu induces selective HRR, while preserving cardiac substrate selection for energy production, as well as optimal matching of energy supply and demand. Indeed, beyond HRR the only functional changes that were observed following IVA addition (increased stroke volume and coronary flow when expressed per beat) were reversed by pacing, thereby providing evidence that these effects were a direct consequence of HRR. These results provide the impetus for testing IVA on energy metabolism in pathological animal models of atherosclerosis or diabetic cardiomyopathy that display metabolic alterations, such as a shift in substrate selection, impaired glycolysis, and/or decreased tissue levels of high energy phosphates.^{6,7}

Funding

This study was supported by Servier.

Acknowledgements

The authors thank Drs. O. Bouchot and R. Debin for their insightful comments and Dr. Jerzy Kulpa for excellent technical assistance in HPLC analyses.

Conflict of interest: none declared.

Figure Legends

Figure 1 Impact of ivabradine (IVA) on HR (A), stroke volume (B), coronary flow expressed per min (C) and coronary flow expressed per beat (D) of isolated working C57BL/6 mouse hearts perfused in the absence (control) or in the presence of 3 μ M IVA with or without atrial pacing. Data are expressed as mean \pm SEM of 9-12 hearts. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. control group.

Figure 2 Relative contribution of glucose and oleate to mitochondrial acetyl-CoA formation for citrate synthesis and rates of glycolysis in working C57BL/6 mouse hearts perfused in the absence (control) or in the presence of IVA with or without atrial pacing.

Data are expressed as means \pm SEM of 4-5 hearts perfused for 40 min with [U- 13 C $_{18}$]oleate or [U- 13 C $_6$]glucose. The contribution to acetyl-CoA formation of i) glucose via pyruvate decarboxylation (PDC_{Glc}) and ii) oleate via β -oxidation (OLE) are expressed relative to citrate synthesis (CS). Details about the calculations of these flux ratios and glycolytic rates are in the Methods section.

Figure 3 Energy production in working C57BL/6 mouse hearts perfused in the absence (control) or in the presence of IVA with or without atrial pacing.

Data are expressed as means \pm SEM of 4-5 hearts. Rates of ATP production in cytosol and mitochondria are calculated, respectively, from the measured rates of (i) glycolysis and (ii) MVO₂ assuming an ATP/O ratio of 2.83, and are expressed per min (A-B) and per beat (C-D). *P<0.05, vs. control group, \$ P<0.05 IVA vs. IVA + pacing group.

Figure 4 Impact of 20 and 40 μ M metoprolol on heart rate (A), contractility (B), cardiac output and coronary flow (C) and stroke volume (D) of isolated working C57BL/6 mouse hearts. Data are expressed as means \pm SEM of 3 hearts.

\$ P<0.05, \$\$ P<0.01, \$\$\$ P<0.001 vs. T=10 min.

Table 1 Functional and physiological parameters of isolated working C57BL/6 mouse hearts perfused in the absence (control) or in the presence of ivabradine (IVA) with or without atrial pacing

Treatment effect (40 min; vs. control)	Control		IVA (3 μ M)		IVA (3 μ M) + Pacing	
HR (beat.min ⁻¹)	368	\pm 19	239	\pm 14***	368	\pm 19
LVSP (mmHg)	95	\pm 4	107	\pm 5	100	\pm 3
min-P (mmHg)	-1.09	\pm 0.02	-3.61	\pm 0.02	-4.52	\pm 0.02
LDVP (mmHg)	86	\pm 4	97	\pm 6	92	\pm 4
+dP/dt (mmHg.s ⁻¹)	5168	\pm 381	5446	\pm 625	5412	\pm 222
-dP/dt (mmHg.s ⁻¹)	-3672	\pm 324	-4056	\pm 418	-4112	\pm 218
Rate pressure product (mmHg.beats ⁻¹ .min ⁻¹)	31242	\pm 2260	22884	\pm 2303	32432	\pm 1407
Aortic flow (ml.min ⁻¹)	6.32	\pm 0.67	5.44	\pm 0.52	7.24	\pm 0.48
Aortic flow/beat (ml.beat ⁻¹)	0.018	\pm 0.002	0.023	\pm 0.001	0.021	\pm 0.001
Coronary flow (ml.min ⁻¹)	2.06	\pm 0.26	2.11	\pm 0.19	1.90	\pm 0.18
Coronary flow/beat (ml.beat ⁻¹)	0.006	\pm 0.001	0.009	\pm 0.001***	0.005	\pm 0.001
Cardiac output (ml.min ⁻¹)	8.38	\pm 0.77	7.55	\pm 0.69	9.39	\pm 0.42
Stroke volume (ml.beat ⁻¹)	0.023	\pm 0.002	0.032	\pm 0.002**	0.027	\pm 0.001
Cardiac power (mWatts.beat ⁻¹)	0.005	\pm 0.001	0.007	\pm 0.001	0.005	\pm 0.000
Cardiac efficiency (mWatts.mmolO ₂ ⁻¹ .min ⁻¹ .beat)	0.004	\pm 0.001	0.005	\pm 0.000	0.005	\pm 0.001
MVO ₂ (μ mol.min ⁻¹)	1.3	\pm 0.2	1.3	\pm 0.1	1.3	\pm 0.1
MVO ₂ /beat (μ mol.beat ⁻¹)	0.004	\pm 0.000	0.006	\pm 0.000***	0.004	\pm 0.000
LDH (mU.min ⁻¹)	24.1	\pm 3.5	35.3	\pm 7.3	20.0	\pm 3.4

Values are expressed as means \pm SEM of 9-12 hearts for the 35–40-min perfusion period.

P<0.001, *P<0.001 vs. controls.

HR, heart rate; LDH, lactate dehydrogenase; LVSP, left ventricular systolic pressure; LVDP, left ventricular developed pressure; MVO₂, oxygen consumption.

Table 2 Myocardial high-energy phosphates in working C57BL/6 mouse hearts perfused for 40 min in the absence (control) or presence of IVA

HEP ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	Control		IVA (3 μM)	
Creatine	216	± 26	237	± 14
Phosphocreatine	63.8	± 10.7	80.0	± 7.5
AMP	19.6	± 4.4	22.7	± 3.7
ADP	29.4	± 2.3	33.8	± 1.4
ATP	60.5	± 10.3	71.0	± 8.6

Data are expressed in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein and are means \pm SEM of 4-5 hearts.

Table 3 Metabolic flux parameters assessed in working C57BL/6 mouse hearts perfused in the presence of metoprolol

Metabolic flux parameters	METO (4 μ M)	METO (40 μ M)
Glycolysis (μ mol/min)	0.45 \pm 0.09	0.17 \pm 0.07***
Glucose to acetyl-CoA: PDC _{Glc} /CS (%)	29.2 \pm 4.1	23.9 \pm 8.0
Oleate to acetyl-CoA: OLE/CS (%)	15.8 \pm 2.9	n.d.

Data are expressed mean \pm SEM of 3-5 hearts.

***P<0.001 vs. controls reported in Figure 2.

METO, metoprolol; n.d., not determined.

References

1. Tardif JC. Heart rate as a treatable cardiovascular risk factor. *Br Med Bull* 2009;**90**:71-84.
2. Bangalore S, Kamalakkannan G, Messerli FH. Beta-blockers: no longer an option for uncomplicated hypertension. *Curr Cardiol Rep* 2007;**9**:441-446.
3. Cruickshank JM. Are we misunderstanding beta-blockers. *Int J Cardiol* 2007;**120**:10-27.
4. Lama PJ. Systemic adverse effects of beta-adrenergic blockers: an evidence-based assessment. *Am J Ophthalmol* 2002;**134**:749-760.
5. Bakris GL, Fonseca V, Katholi RE, McGill JB, Messerli FH, Phillips RA, Raskin P, Wright JT, Jr., Oakes R, Lukas MA, Anderson KM, Bell DS. Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;**292**:2227-2236.
6. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007;**356**:1140-1151.
7. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005;**85**:1093-1129.
8. Sharma V, Dhillon P, Parsons H, Allard MF, McNeill JH. Metoprolol represses PGC1 α -mediated carnitine palmitoyltransferase-1B expression in the diabetic heart. *Eur J Pharmacol* 2009;**607**:156-166.
9. An D, Kewalramani G, Qi D, Pulinilkunnil T, Ghosh S, Abrahani A, Wambolt R, Allard M, Innis SM, Rodrigues B. beta-Agonist stimulation produces changes in cardiac AMPK and coronary lumen LPL only during increased workload. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;**288**:E1120-1127.
10. Fardoun RZ. Carvedilol versus cardioselective beta-blockers for the treatment of hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 2006;**26**:1491-1500.

11. Shigetoh Y, Adachi H, Yamagishi S, Enomoto M, Fukami A, Otsuka M, Kumagae S, Furuki K, Nanjo Y, Imaizumi T. Higher heart rate may predispose to obesity and diabetes mellitus: 20-year prospective study in a general population. *Am J Hypertens* 2009;**22**:151-155.
12. Borer JS, Tardif JC. Efficacy of ivabradine, a selective I(f) inhibitor, in patients with chronic stable angina pectoris and diabetes mellitus. *Am J Cardiol*;**105**:29-35.
13. DiFrancesco D, Borer JS. The funny current: cellular basis for the control of heart rate. *Drugs* 2007;**67 Suppl 2**:15-24.
14. Thollon C, Cambarrat C, Vian J, Prost JF, Peglion JL, Vilaine JP. Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. *Br J Pharmacol* 1994;**112**:37-42.
15. Heusch G, Skyschally A, Gres P, van Caster P, Schilawa D, Schulz R. Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur Heart J* 2008;**29**:2265-2275.
16. Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, Thuillez C. Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation* 2004;**109**:1674-1679.
17. Milliez P, Messaoudi S, Nehme J, Rodriguez C, Samuel JL, Delcayre C. Beneficial effects of delayed ivabradine treatment on cardiac anatomical and electrical remodeling in rat severe chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;**296**:H435-441.
18. Colin P, Ghaleh B, Monnet X, Hittinger L, Berdeaux A. Effect of graded heart rate reduction with ivabradine on myocardial oxygen consumption and diastolic time in exercising dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**308**:236-240.

19. Ceconi C, Cargnoni A, Francolini G, Parinello G, Ferrari R. Heart rate reduction with ivabradine improves energy metabolism and mechanical function of isolated ischaemic rabbit heart. *Cardiovasc Res* 2009;**84**:72-82.
20. Colin P, Ghaleh B, Hittinger L, Monnet X, Slama M, Giudicelli JF, Berdeaux A. Differential effects of heart rate reduction and beta-blockade on left ventricular relaxation during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;**282**:H672-679.
21. Colin P, Ghaleh B, Monnet X, Su J, Hittinger L, Giudicelli JF, Berdeaux A. Contributions of heart rate and contractility to myocardial oxygen balance during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;**284**:H676-682.
22. Heusch G. Pleiotropic action(s) of the bradycardic agent ivabradine: cardiovascular protection beyond heart rate reduction. *Br J Pharmacol* 2008;**155**:970-971.
23. Heusch G. Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and myocardial ischaemia: benefit from selective bradycardic agents. *Br J Pharmacol* 2008;**153**:1589-1601.
24. Khairallah M, Labarthe F, Bouchard B, Danialou G, Petrof BJ, Des Rosiers C. Profiling substrate fluxes in the isolated working mouse heart using ¹³C-labeled substrates: focusing on the origin and fate of pyruvate and citrate carbons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**286**:H1461-1470.
25. Doesch AO, Ammon K, Konstandin M, Celik S, Kristen A, Frankenstein L, Buss S, Hardt S, Sack FU, Katus HA, Dengler TJ. Heart rate reduction for 12 months with ivabradine reduces left ventricular mass in cardiac allograft recipients. *Transplantation* 2009;**88**:835-841.
26. Vincent G, Khairallah M, Bouchard B, Des Rosiers C. Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ¹³C-substrates and ex vivo perfusion in the working mode. *Mol Cell Biochem* 2003;**242**:89-99.

27. Padua-Filho WC, Brasil DP, Neves HJ, Gomes OM, Bocchi EA. Effects of metoprolol and amiodarone combination on heart rate, myocardial contractility and coronary flow: Study in isolated perfused rat hearts. *Exp Clin Cardiol* 2004;**9**:133-137.
28. Allard MF, Parsons HL, Saeedi R, Wambolt RB, Brownsey R. AMPK and metabolic adaptation by the heart to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**292**:H140-148.
29. Sharma V, Dhillon P, Wambolt R, Parsons H, Brownsey R, Allard MF, McNeill JH. Metoprolol improves cardiac function and modulates cardiac metabolism in the streptozotocin-diabetic rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**294**:H1609-1620.
30. Vaillant F, Timour Q, Descotes J, Manati W, Belhani D, Bui-Xuan B, Tabib A, Bricca G, Chevalier P. Ivabradine induces an increase in ventricular fibrillation threshold during acute myocardial ischemia: an experimental study. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;**52**:548-554.
31. Indolfi C, Guth BD, Miyazaki S, Miura T, Schulz R, Ross J, Jr. Heart rate reduction improves myocardial ischemia in swine: role of interventricular blood flow redistribution. *Am J Physiol* 1991;**261**:H910-917.
32. Stoll M, Quentin M, Molojavyi A, Thamer V, Decking UK. Spatial heterogeneity of myocardial perfusion predicts local potassium channel expression and action potential duration. *Cardiovasc Res* 2008;**77**:489-496.
33. Mulder P, Thuillez C. Heart rate slowing for myocardial dysfunction/heart failure. *Adv Cardiol* 2006;**43**:97-105.
34. Di Verniero C, Hocht C, Opezzo JA, Taira CA. Changes in the in vitro pharmacodynamic properties of metoprolol in atria isolated from spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;**34**:161-165.

35. Wang P, Zaragoza C, Holman W. Sodium-hydrogen exchange inhibition and beta-blockade additively decrease infarct size. *Ann Thorac Surg* 2007;**83**:1121-1127.
36. Abbott JA, Broadstone RV, Ward DL, Pyle RL. Hemodynamic effects of orally administered carvedilol in healthy conscious dogs. *Am J Vet Res* 2005;**66**:637-641.
37. Di Verniero CA, Silberman EA, Mayer MA, Opezzo JA, Taira CA, Hocht C. In vitro and in vivo pharmacodynamic properties of metoprolol in fructose-fed hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;**51**:532-541.
38. Gordon SG, Arsenault WG, Longnecker M, Boothe DM, Miller MW, Chalkley J. Pharmacodynamics of carvedilol in conscious, healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2006;**20**:297-304.
39. Kalaycioglu S, Sinci V, Imren Y, Oz E. Metoprolol prevents ischemia-reperfusion injury by reducing lipid peroxidation. *Jpn Circ J* 1999;**63**:718-721.
40. Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP, Jr., Barsh GS, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**:7375-7380.

Annexe II : Titre et travaux

Manati W, **Vaillant F**, Bost M, Maffre V, Belhani D, Descotes J, Tabib A, Bui-Xuan B, Hamdan L, Timour Q. “Protective role of selenium supplementation against cardiac lesions induced by the combination of levomepromazine and risperidone in the rabbit.” *Hum Exp Toxicol* **28**(8): 461-7, 2009.

Belhani D, Fanton L, **Vaillant F**, Descotes J, Manati W, Tabib A, Bui-Xuan B, Timour Q. “Cardiac lesions induced by testosterone: protective effects of dexrazoxane and trimetazidine.” *Cardiovasc Toxicol* **9**(2): 64-9, 2009.

Fanton L, Belhani D, **Vaillant F**, Tabib A, Gomez L, Descotes J, Dehina L, Bui-Xuan B, Malicier D, Timour Q. “Heart lesions associated with anabolic steroid abuse: comparison of post-mortem findings in athletes and norethandrolone-induced lesions in rabbits.” *Exp Toxicol Pathol* **61**(4): 317-23, 2009.

Vaillant F, Tsibiribi P, Bricca G, Bui-Xuan B, Bescond-Jacquet A, Tabib A, Descotes J, Timour Q. “Trimetazidine protective effect against ischemia-induced susceptibility to ventricular fibrillation in pigs.” *Cardiovasc Drugs Ther* **22**(1): 29-36, 2008.

Vaillant F, Turrel F, Bost M, Bricca G, Descotes J, Bui-Xuan B, Tabib A, Manati W, Timour Q. “Role of selenium in heart lesions produced by neuroleptics in the rabbit.” *J Appl Toxicol* **28**(2): 212-6, 2008.