



HAL
open science

Recherche de facteurs circulants impliqués dans la cardioprotection ischémique à distance par une approche protéomique

Pierre Hibert

► To cite this version:

Pierre Hibert. Recherche de facteurs circulants impliqués dans la cardioprotection ischémique à distance par une approche protéomique. Physiologie [q-bio.TO]. Université d'Angers, 2013. Français. NNT: . tel-01088630

HAL Id: tel-01088630

<https://theses.hal.science/tel-01088630>

Submitted on 28 Nov 2014

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

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

Thèse de Doctorat

Pierre HIBERT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : 502 - Biologie Santé Nantes Angers

Discipline : Physiologie

Spécialité : Physiologie et physiopathologie humaine

Unité de recherche : Laboratoire Cardioprotection, Remodelage et Thrombose
UPRES EA 3860
Faculté de Médecine d'Angers

Soutenue le 20 Décembre 2013

Thèse N° : 1380

Recherche de facteurs circulants impliqués dans la cardioprotection ischémique à distance par une approche protéomique

JURY

Rapporteurs : **Bijan GHALEH-MARZBAN**, Professeur, INSERM U955 - Equipe 3
Christophe PIOT, Professeur, Faculté de Médecine de Montpellier

Examineurs : **Florence PINET**, Docteur, INSERM U744, Institut Pasteur de Lille
Denis ANGOULVANT, Professeur, Université François Rabelais de Tours
Franck LETOURNEL, Docteur, Laboratoire de Neurobiologie et Transgénése - UPRES EA 3143

Directeur de Thèse : **Fabrice PRUNIER**, Professeur, Laboratoire Cardioprotection, Remodelage et Thrombose - UPRES EA 3860

Thèse de Doctorat

Pierre HIBERT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : 502 - Biologie Santé Nantes Angers

Discipline : Physiologie

Spécialité : Physiologie et physiopathologie humaine

Unité de recherche : Laboratoire Cardioprotection, Remodelage et Thrombose
UPRES EA 3860
Faculté de Médecine d'Angers

Soutenue le 20 Décembre 2013

Thèse N° : 1380

Recherche de facteurs circulants impliqués dans la cardioprotection ischémique à distance par une approche protéomique

JURY

Rapporteurs : **Bijan GHALEH-MARZBAN**, Professeur, INSERM U955 - Equipe 3
Christophe PIOT, Professeur, Faculté de Médecine de Montpellier

Examineurs : **Florence PINET**, Docteur, INSERM U744, Institut Pasteur de Lille
Denis ANGOULVANT, Professeur, Université François Rabelais de Tours
Franck LETOURNEL, Docteur, Laboratoire de Neurobiologie et Transgénése - UPRES EA 3143

Directeur de Thèse : **Fabrice PRUNIER**, Professeur, Laboratoire Cardioprotection, Remodelage et Thrombose - UPRES EA 3860



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e),
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

REMERCIEMENTS

En premier lieu je souhaite remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Fabrice Prunier, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'UPRES EA 3860. Merci pour vos enseignements théoriques et pour m'avoir permis de mieux comprendre la cardiologie. Grâce à vous j'ai beaucoup appris sur le travail en équipe et sur l'organisation, et je sais que ces compétences me seront utiles dans l'avenir. Je vous suis également sincèrement reconnaissant pour votre encadrement, votre disponibilité au cours de ces trois années de thèse, ainsi que pour la relecture de ce manuscrit. Encore merci.

J'adresse également tous mes remerciements à Madame le Docteur Florence Pinet pour son aide précieuse tout au long de cette thèse et pour avoir accepté d'examiner ce travail. Merci de m'avoir si chaleureusement accueilli durant les mois passés à Lille et pour m'avoir fait changer d'avis sur la protéomique. Je vous remercie pour vos nombreux conseils et explications, ainsi que pour toute l'aide à l'écriture et à la relecture des articles. Merci également d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse. Merci pour votre disponibilité.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude à Monsieur le Professeur Bijan Ghaleh-Marzban et à Monsieur le Professeur Christophe Piot pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et de juger mon travail. Merci également à Monsieur le Professeur Denis Angoulvant d'être examinateur de ce travail. Merci à vous.

Je remercie profondément Monsieur le Docteur Franck Letournel d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineur, et pour avoir pris part à mon comité de suivi de thèse. Merci également pour sa collaboration aux marquages histologiques.

Merci également à tous les membres du laboratoire pour leurs conseils et leur expertise, en particulier Madame le Docteur Delphine Prunier-Mirebeau, pour son aide à la réalisation des dosages d'apolipoprotéine A-I, et Monsieur le Professeur Laurent Macchi.

Ma reconnaissance personnelle va à Monsieur le Docteur Franck Letournel. Double D., merci à toi de m'avoir initié à la recherche il y a maintenant presque sept ans. J'ai beaucoup appris durant toutes ces années de stages à tes cotés, aussi bien sur le plan scientifique et technique, que sur le plan humain. Merci pour tous les moments de rigolade au laboratoire et en dehors, et soigne bien ton genou. Petit padawan est devenu grand maintenant et c'est en grande partie grâce à toi. Merci pour tout Chef.

Un grand merci à Madame le Docteur Sophie Tamareille. Tu m'as si bien accueilli au laboratoire et tu m'as transmis toutes tes connaissances théoriques et pratiques. Merci pour ta disponibilité au quotidien durant ces trois années, ainsi que pour ton aide à l'écriture et à la relecture de ce manuscrit.

Un merci particulier à mon ami et collègue, Monsieur le Docteur Hussein Kalakech « l'idiot ». Ravi d'avoir fait ta connaissance depuis ton arrivée en thèse dans le laboratoire. Merci pour les innombrables moments de rigolade dans le bureau, en réunion, à la machine à café ou ailleurs. Merci aussi pour les parties de basket, et je te rappelle que le record est à 26 de suite ! Je te suis également très reconnaissant pour ton aide aux nombreuses rédactions d'articles, d'emails ou de posters en anglais ! Rassure-toi, je continuerai à venir t'aider pour anesthésier et intuber les rats, ainsi que pour collectionner les jetons. Bon courage pour la fin de ta thèse et fais attention tu es fragile.

Evidemment un grand merci à mes collègues et amis de Montéclair et d'IRIS (Balbal, Claire Lapinoux, Maud Double D., Goigoi, Pascale, Wiking, Raph, Sidow et bien d'autres). J'essayerai de continuer à venir à nos repas du jeudi midi et de continuer les traditions des cadeaux vivants. Merci pour tous les moments de rigolade au cours de ces années, et promis je prendrai soin d'Aquaporine-4.

Merci également aux futures Docteurs Sophie Guillou et Laura Cellier pour les moments de rigolade à la machine à café, à parler de science ou d'autres choses. Laura, merci pour ton inestimable investissement à l'écriture et à la correction de ce manuscrit. On aurait sûrement pu trouver mieux comme bizutage pour ton arrivée dans le laboratoire mais encore un grand merci. Sophie, je te souhaite une bonne continuation pour la fin de ton internat.

Je remercie Messieurs les Docteurs Julien Jeanneteau et Victor Mateus pour m'avoir accueilli et formé au début de ma thèse. Merci également à Monsieur le Docteur Sylvain Grall pour sa bonne humeur durant son année de Master 2, ainsi que pour sa disponibilité au laboratoire et en dehors. Bonne chance également à Monsieur le Docteur Loïc Bière pour la fin de sa thèse.

Je souhaite remercier tous les membres de l'Institut Pasteur de Lille que j'ai eu la chance de croiser durant mes séjours dans le Nord (Florie, Anaïs, Sophie, Amandine, Emilie, Aude, Rafaele, Ludovic, Florent et tous les autres). C'était un plaisir de faire votre connaissance et merci pour votre bonne humeur au labo et en dehors. Un remerciement tout particulier à Maggy et Olivia pour leur travail et leur aide très précieuse lors de l'analyse protéomique.

Un remerciement à Delphine Lamon et à tous les stagiaires et techniciens que j'ai pu croiser durant cette thèse. Merci notamment aux techniciennes de l'UF de Neurobiologie-neuropathologie du CHU d'Angers.

Je tiens également à remercier l'équipe de Monsieur le Docteur Daniel Henrion pour l'accès à leur matériel et pour leur aide technique concernant les western blot.

Je remercie également Madame le Professeur Annick Barthelaix et Monsieur le Docteur Joël Eyer pour leur accueil durant les années d'IUT et de Master passées au sein de l'UPRES EA 3143.

Un grand merci à tous mes amis et à ma famille, présents sans faille depuis des années. Merci notamment à ma marraine Elisabeth, à mon parrain Gilles, ainsi qu'à mes frères et sœur, Mathilde, Thomas et Etienne.

Je ne saurai enfin terminer sans avoir remercié mes parents, Brigitte et François, pour leur soutien depuis toutes ces années. Merci pour tout.

SOMMAIRE

LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	14
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	18
INTRODUCTION GÉNÉRALE	20
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	29
CHAPITRE 1. LE CONDITIONNEMENT A DISTANCE.....	30
<i>Historique</i>	<i>30</i>
1. Le préconditionnement.....	30
2. Le perconditionnement.....	31
3. Le postconditionnement	32
4. Les différentes phases du conditionnement à distance	33
<i>La cardioprotection à distance en clinique humaine</i>	<i>34</i>
<i>Les mécanismes de la cardioprotection à distance</i>	<i>36</i>
1. La voie neuronale	37
1.1. Adénosine.....	37
1.2. Bradykinine.....	39
1.3. Peptide relié au gène de la calcitonine	40
1.4. Le conditionnement traumatique	40
1.5. La transduction nerveuse du signal.....	41
2. La voie humorale	43
2.1. La preuve du concept	44
2.2. Taille et propriétés physicochimiques	46
2.3. Espèces chimiques.....	48
2.3.1. Opioïdes.....	49
2.3.2. Endocannabinoïdes	51
2.3.3. Oxyde nitrique	52
2.3.4. Autres médiateurs.....	53
3. La voie systémique	54

3.1.	L'expression génique.....	54
3.2.	L'inflammation	55
	<i>La transduction du signal.....</i>	<i>56</i>
1.	Les voies RISK et SAFE	56
2.	Les canaux potassiques mitochondriaux ATP dépendants	59
2.1.	Mise en évidence de l'effet protecteur.....	59
2.2.	Activation des canaux mK _{ATP}	60
2.2.1.	La protéine kinase A et la kinase Rho.....	60
2.2.2.	La protéine kinase C	61
2.2.2.1.	Utilisation d'inhibiteurs	61
2.2.2.2.	Liens avec les ROS.....	62
2.2.2.3.	Les connexines-43	62
2.3.	Effets bénéfiques des mK _{ATP}	63
2.3.1.	Action sur la physiologie de la mitochondrie.....	63
3.	Le pore de transition de perméabilité mitochondrial.....	64
3.1.	Physiopathologie du canal	64
3.2.	mPTP et cardioprotection	65
	CHAPITRE 2. L'APOLIPOPROTEINE A-I ET LA CARDIOPROTECTION	69
	<i>Métabolisme de l'ApoA-I et des High Density Lipoproteins</i>	<i>69</i>
1.	Les Apolipoprotéines.....	69
1.1.	Généralités	69
1.2.	L'apolipoprotéine A-I.....	69
1.2.1.	Structure.....	69
1.2.2.	Biologie clinique	70
2.	Le transport inverse du cholestérol	71
2.1.	Synthèse des HDL	71
2.2.	Devenir des HDL circulantes.....	72
2.3.	Dégradation des HDL.....	73
3.	Les récepteurs de l'ApoA-I et des HDL	75
3.1.	Le transporteur ATP Binding Casette A1.....	75
3.2.	Le récepteur SR-BI	76
3.3.	Les récepteurs à la sphingosine-1-phosphate.....	77
4.	Mutations dans le métabolisme de l'ApoA-I.....	78

<i>Les effets des ApoA-I/S1P/HDL sur le système cardiovasculaire</i>	81
1. Synergie entre ApoA-I et S1P dans l'effet des HDL.....	81
2. Effets des HDL sur les cellules endothéliales et les vaisseaux	82
2.1. Régulation du tonus vasculaire	82
2.2. Propriétés anti-thrombotiques	86
2.3. Apoptose et survie des cellules endothéliales.....	87
2.4. Migration/prolifération/angiogenèse	88
2.5. Régulation de l'activation de l'endothélium	90
3. Effets des HDL sur les cellules immunitaires.....	94
4. Effets des HDL au niveau cardiaque.....	101
4.1. Protection induite par l'ApoA-I	101
4.2. Protection induite par la S1P.....	103
4.3. La signalisation cellulaire mise en jeu	104
5. Récapitulatif	107
MATÉRIEL ET MÉTHODES	110
MODELES EXPERIMENTAUX	111
<i>Anesthésie</i>	111
<i>Conditionnement à distance</i>	111
<i>Ischémie-reperfusion myocardique</i>	112
<i>Prélèvements</i>	112
<i>Groupes expérimentaux</i>	113
1. Analyse protéomique	113
2. Etude du RPreC par séquences répétées de clampage artériel.....	113
3. Mesure de la taille d'infarctus.....	113
4. Analyse des protéines par Western Blot.....	114
5. Evaluation histochimique de l'inflammation	114
DETERMINATION DE LA ZONE A RISQUE ET DE LA TAILLE D'INFARCTUS.....	116
ETUDE PROTEOMIQUE	117
<i>Equalisation</i>	117
<i>Analyse protéomique</i>	117
<i>Purification des pics protéiques</i>	121
<i>Identification par spectrométrie de masse</i>	122

<i>Validation par immunodéplétion</i>	123
DOSAGES PLASMATIQUES DE L' APOA-I.....	125
ANALYSE DES PROTEINES PAR WESTERN BLOT	125
<i>Extraction protéique</i>	125
<i>La technique du Western Blot</i>	126
ANALYSES HISTOCHIMIQUES.....	129
<i>Coupes de cœur</i>	129
<i>Marquages</i>	129
1. Hématoxyline-Eosine.....	129
2. Marquage immunohistochimique CD45	129
3. Lecture des marquages	130
ANALYSE STATISTIQUE	131
TRAVAUX ET RÉSULTATS.....	132
IDENTIFICATION DE FACTEURS CIRCULANTS DU PRECONDITIONNEMENT ISCHEMIQUE A DISTANCE PAR UNE APPROCHE PROTEOMIQUE	133
<i>Introduction</i>	133
<i>Publication n°1</i>	135
<i>Résultats complémentaires à la publication n°1</i>	136
1. Effet de l' ApoA-I sur l' inflammation liée à l' infarctus	136
2. Rôle des voies RISK et SAFE dans la cardioprotection induite par l' ApoA-I.....	140
3. Etude d' un autre cycle de préconditionnement à distance.....	143
<i>Discussion n°1</i>	145
<i>Publication n°2</i>	149
<i>Discussion n°2</i>	150
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	153
ANNEXE.....	161
BIBLIOGRAPHIE.....	162

LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications :

Jeanneteau J, Hibert P, Martinez MC, Tual-Chalot S, Tamareille S, Furber A, Andriantsitohaina R, Prunier F.

Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012 Oct 1;303(7):H871-7.

doi: 10.1152/ajpheart.00102.2012.

Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Beseme O, Chwastyniak M, Tamareille S, Lamon D, Furber A, Pinet F, Prunier F.

Apolipoprotein A-I is a potential mediator of remote ischemic preconditioning.

PLoS ONE 8(10): e77211.

doi:10.1371/journal.pone.0077211.

Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Beseme O, Chwastyniak M, Tamareille S, Pinet F, Prunier F.

Modifications in rat plasma proteome after remote ischemic preconditioning (RIPC): Identification by a SELDI-TOF-MS approach.

Soumis à PLoS One.

Communications :

- 6-7 Novembre 2011, Talmont Saint-Hilaire : Journées de l'Ecole Doctorale Biologie Santé. Communication orale.

Recherche de facteurs circulants impliqués dans la cardioprotection ischémique à distance par une approche protéomique.

Hibert P, Pinet P, Prunier P.

- 12-13 Avril 2012, Bordeaux : Printemps de la Cardiologie - Recherche fondamentale et clinique. Communication poster.

Identification of circulating factors involved in remote ischemic cardioprotection by a proteomic approach.

Hibert P, Tamareille S, Beseme O, Chwastyniak M, Pinet F, Prunier F.

- 12-13 Avril 2012, Bordeaux : Printemps de la Cardiologie - Recherche fondamentale et clinique. Communication poster.

Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism.

Jeanneteau J, Hibert P, Martinez CM, Tual-Chalot S, Tamareille S, Furber A, Andriantsitohaina R, Prunier F.

- 12-13 Avril 2012, Bordeaux : Printemps de la Cardiologie - Recherche fondamentale et clinique. Communication poster.

ER Stress pathway in local and remote myocardial ischemic conditioning.

Grall S, Tamareille S, Mateus V, **Hibert P**, Jeanneteau J, Lamon D, Prunier D, Henrion D, Furber A, Prunier F.

- 12-13 Avril 2012, Bordeaux : Printemps de la Cardiologie - Recherche fondamentale et clinique. Communication poster.

Autophagy enhancement in local myocardial ischemic conditioning.

Grall S, Prunier D, Mateus V, Tamareille S, **Hibert P**, Jeanneteau J, Lamon D, Henrion D, Furber A, Prunier F.

- 13 Septembre 2012, Angers : Journée de la SFR (FED) ICAT 4208 – « Interactions Cellulaires et Applications Thérapeutiques ». Communication orale.

Identification of circulating factors involved in remote ischemic cardioprotection by a proteomic approach.

Hibert P, Tamareille S, Beseme O, Chwastyniak M, Pinet F, Prunier F.

- 6-7 Décembre 2012, La Pommeraie : Journées de l'Ecole Doctorale Biologie Santé.
Communication poster.

Identification of circulating factors involved in remote ischemic cardioprotection by a proteomic approach.

Hibert P, Tamareille S, Beseme O, Chwastyniak M, Pinet F, Prunier F.

- 17-18 Avril 2013, Marseille : Printemps de la Cardiologie - Recherche fondamentale et clinique. Communication poster.

Apolipoprotein A-I is a potential mediator of remote ischemic preconditioning.

Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Beseme O, Chwastyniak M, Tamareille S, Lamon D, Furber A, Pinet F, Prunier F.

Lauréat du Prix Poster

- 31 Août-04 Septembre 2013, Amsterdam : ESC Congress 2013. Communication poster.

Apolipoprotein A-I is a potential mediator of remote ischemic preconditioning.

Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Beseme O, Chwastyniak M, Tamareille S, Lamon D, Furber A, Pinet F, Prunier F.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCA1 : ATP Binding Casette A1
ANOVA : ANalysis Of VAriance
ANT : Adenine Nucleotide Translocase
APC : Protéine C Activée
Apo : Apolipoprotéines
ApoA-I : Apolipoprotéine A-I
ATP : Adénosine TriPhosphate
BAD : Bcl-2-Associated Death promoter
Bax : Bcl-2-Associated X protein
Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra Large
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BNTX : 7-Benzylidene naltrexone maleate
BSA : Bovine Serum Albumin
C : Cholestérol
CE : Cellules Endothéliales
CETP : Cholesterol Ester Transfer Protein
cGMP : Guanosine MonoPhosphate cyclique
CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX-2 : CycloOXygenase-2
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
CPP : Coronary Perfusion Pressure
CREB : Cyclic-AMP Response Element Binding protein
CRP : Protéine C-Réactive
Cx-43 : Connexine-43
CXCR4 : CXC Chemokine Receptor type 4
CyP-D : Cyclophiline D
DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DIGE-2D : 2-Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis
DPCPX : 8-CycloPentyl-1,3-DiPropylXanthine
DPDPE : [D-Pen2,5] EnkePhaline
EC : Esters de Cholestérol

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
EPO : ErythroPOïétine
ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2
GC : Guanylate Cyclase
Glib : Glibenclamide
GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase-3 β
5-HD : 5-HydroxyDecanoate
HDL : High Density Lipoproteins
HE : Hématoxyline-Eosine
HIF- α : Facteur de réponse à l'hypoxie- α
HL : Hepatic Lipase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HRP : HorseRadish Peroxydase
HSP70 : Heat Shock Protein 70
IC : Ischemic Conditioning
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1
IDM : Infarctus Du Myocarde
IHC : ImmunoHistoChimie
I- κ B : Inhibitor of NF- κ B
IL : InterLeukine
iNOS : inductible Nitric Oxide Synthase
IPostC : Ischemic PostConditioning
IPreC : Ischemic PreConditioning
I/R : Ischémie-Reperfusion
IVA : InterVentriculaire Antérieure
JAK : JAnus Kinases
JNK1/2 : c-Jun N-terminal Kinases 1/2
KO : Knock-Out
LCAT : Lecithine Cholesterol Acyl Transferase
LC-MS/MS : Liquid Chromatography - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry
LDH : Lactate DésHydrogénase
LDL : Low Density Lipoproteins
L-NAME : L-Nitro Arginine Methyl Ester
L-NNA : N ω -Nitro-L-Arginine

LPS : LipoPolySaccharide
LVDP : Left Ventricular Developed Pressure
LVEDP : Left Ventricular End Diastolic Pressure
MALDI-TOF-MS : Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation - Time Of Flight - Mass Spectrometry
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
MGP : N-2-MercaptoPropionyl Glycine
MI : Myocardial Infarction
miRNA : microARN
mK_{ATP} : Canal mitochondrial potassique ATP dépendant
MEK1/2 : Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2
mPTP : Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial
MyD88 : Myeloid Differentiation factor 88
m/z : Masse/charge
NF-κB : Nuclear Factor-κB
NO : Oxide Nitrique
NOS : Nitric Oxide Synthase
oxLDL : LDL oxydées
O₂^{-•} : Anion superoxide
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCI : Percutaneous Coronary Intervention
PGI₂ : Prostacycline I₂
PI3K : Phosphatidyl Inositol-3-Kinase
PKA : Protéine Kinase A
PKC-ε : Protéine Kinase C-ε
PKG : Protéine Kinase G
PL : PhosphoLipides
PLTP : PhosphoLipid Transfer Protein
RCT : Remote Conditioning of Trauma
rHDL : HDL reconstituées
Rho K : Rho Kinase
RIC : Remote Ischemic Conditioning
RIPerC : Remote Ischemic PerConditioning
RIPostC : Remote Ischemic PostConditioning

RIPreC : Remote Ischemic PreConditioning

RISK : Reperfusion Injury Salvage Kinase

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

SAFE : Survivor Activating Factor Enhancement

SDF-1 α : Stromal cell-Derived Factor-1 α

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SELDI-TOF-MS : Surface-Enhanced Laser Desorption and Ionization - Time Of Flight - Mass Spectrometry

siRNA : small interfering RNA

S1P : Sphingosine-1-Phosphate

8-SPT : 8-sulphophenyltheophylline

SR-BI : Scavenger Receptor class B type I

STAT-3 : Signal Transducer Activator of Transcription-3

TBS : Tris-Buffered Saline

TCR : T Cell Receptor

TG : TriGlycérides

TLR4 : Toll Like Receptors 4

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

TNFR6 : TNF Receptor superfamily, member 6

TRAF : TNF Receptor Associated Factor

TRAM/TRIF : TRIF-Related Adaptor Molecule / TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β

TTC : TriphenylTetrazolium Chloride

TTR : TransThyRétine

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel

VLDL : Very Low Density Lipoproteins

WB : Western Blot

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Mort cellulaire au cours du temps et conséquences de la reperfusion.	21
Figure 2. Signalisations intracellulaires impliquées dans la cardioprotection.....	25
Figure 3. Les différents algorithmes du conditionnement ischémique.	33
Figure 4. Les mécanismes potentiels du conditionnement ischémique à distance. .	36
Figure 5. La voie neuronale.	43
Figure 6. Schéma hypothétique de la structure du mPTP.....	64
Figure 7. Voies effectrices finales au niveau de la mitochondrie.	66
Figure 8. Représentation schématique d'une lipoprotéine.	68
Figure 9. Organisation de l'ApoA-I au niveau des HDL.	70
Figure 10. Le métabolisme des HDL et du cholestérol.	72
Figure 11. Le récepteur ABCA1.....	74
Figure 12. Le récepteur SR-BI.	75
Figure 13. Les récepteurs à la S1P.	76
Figure 14. Les mutations naturelles de l'ApoA-I.	78
Figure 15. Effets indépendants et synergiques de l'ApoA-I et de la S1P.....	81
Figure 16. Rôle du NO dans l'effet vasodilatateur des HDL.....	82
Figure 17. Synthèse de PGI2 par les HDL.....	83
Figure 18. Effets anti-thrombotiques des HDL.	86
Figure 19. Préservation de l'intégrité de la barrière endothéliale.	88
Figure 20. Propriétés vasculaires des HDL.....	91
Figure 21. Interaction CMH/TCR au niveau des radeaux lipidiques.	93
Figure 22. Voies de signalisation dépendantes du TLR4.....	94
Figure 23. Interactions entre les voies CD40/CD40 ligand et TLR4/MyD88.	97
Figure 24. Effets biologiques des HDL.....	99
Figure 25. Signalisation des HDL au niveau cardiaque.	104

Figure 26. Groupes expérimentaux.	113
Figure 27. Principe de l'égalisation.	116
Figure 28. Utilisation de la technologie SELDI-TOF-MS pour l'analyse du protéome plasmatique.	117
Figure 29. Exemple de caractérisation d'un pic protéique.	118
Figure 30. Représentation schématique des étapes de purification.	120
Figure 31. Processus d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF....	122
Tableau 1. Tableau récapitulatif des effets des HDL/ApoA-I/S1P.....	107
Tableau 2. Anticorps utilisés en immunodéplétion.	121
Tableau 3. Composition du tampon de lyse.	124
Tableau 4. Composition du tampon de migration.....	124
Tableau 5. Composition du TBS-Tween.	125
Tableau 6. Récapitulatif des anticorps et des dilutions utilisés en WB.....	126
Tableau 7. Composition du tampon de déshybridation.	126
Figure supplémentaire 1. Effet anti-inflammatoire de l'ApoA-I <i>in vivo</i>	137
Figure supplémentaire 2. Analyse Western Blot de l'expression de STAT-3 et des kinases Akt, ERK1/2 et GSK-3 β	140
Figure supplémentaire 3. Comparaison de deux algorithmes de RIPreC sur la libération d'ApoA-I.	142

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'infarctus du myocarde (IDM) est une nécrose ischémique du myocarde due dans la majorité des cas à une thrombose occlusive brutale d'une artère coronaire. Cette occlusion coronaire aiguë survient en général après la rupture, l'érosion ou la fissuration d'une plaque d'athérome préexistante, entraînant la formation d'un thrombus. D'autres causes d'IDM sont possibles mais plus rares : le spasme artériel, la dissection aortique et l'embolie coronaire.

La thrombose coronaire brutale va entraîner une insuffisance dans l'apport en oxygène et en nutriments au niveau du myocarde et donc une souffrance ischémique aboutissant à une nécrose progressive du tissu. Cette nécrose survient en général au bout de 30 à 45 min d'ischémie. Elle est d'autant plus importante que le siège de l'occlusion est proximal et que l'artère concernée est l'interventriculaire antérieure (IVA). En l'absence de reperfusion coronaire ou de circulation collatérale, la nécrose va progresser du sous-endocarde vers l'épicarde jusqu'à être transmurale au-delà de la 6^{ème} heure : c'est le phénomène de « *wavefront of ischemic cell death* » [1], à l'origine du dogme des « *6 golden hours* » du traitement de l'IDM [2].

L'IDM est donc une maladie constituant une urgence cardiologique majeure. Elle est en effet une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. En France on recense chaque année environ 120 000 nouveaux cas d'IDM, à l'origine de 10 à 12% de la mortalité totale annuelle chez l'adulte. Il s'agit donc d'une pathologie avec un risque fatal important. Il est cependant intéressant de noter que la morbi-mortalité liée à l'IDM a considérablement diminué depuis 10 ans (-30% en Europe de l'Ouest).

La stratégie actuelle de prise en charge de l'IDM a pour objectif de reperfusion le plus précocement, le plus efficacement et le plus durablement possible l'artère responsable. Cela permet de réduire l'altération de la fonction ventriculaire gauche en préservant le maximum de myocarde infarci. Cette recanalisation précoce contribue donc à améliorer le pronostic des patients en réduisant la mortalité et les complications comme l'insuffisance cardiaque [3,4]. Le bénéfice de cette reperfusion est directement lié au délai de sa mise en place : plus la revascularisation est précoce, plus la réduction de la mortalité est importante.

En pratique, la technique de référence utilisée pour reperfusion le myocarde est l'angioplastie coronaire primaire (*percutaneous coronary intervention, PCI*). Bien que

ce soit la meilleure technique de reperfusion, elle n'est pas systématique car elle ne peut pas toujours être réalisée dans les 120 premières minutes suivant le diagnostic. Dans ce cas on aura recours à la thrombolyse intraveineuse.

La prise en charge de l'IDM a donc fait de nombreux progrès, notamment dans l'amélioration de la prise en charge du patient, dans le choix de la technique de revascularisation et dans la compréhension que la reperfusion précoce est le seul moyen de limiter la taille de l'infarctus. Bien que la reperfusion soit la plus précoce et la plus efficace possible, elle va elle-même être à l'origine d'altérations nommées lésions de reperfusion. Initialement décrites par Jennings *et al.* en 1960, ces « lésions létales de reperfusion » altèrent les bénéfices de la reperfusion (**Figure 1**) [5]. Leurs origines sont multiples et encore en partie méconnues, néanmoins on peut en citer certaines, aujourd'hui bien établies : le « paradoxe de l'oxygène » [6,7], le « paradoxe du calcium » [8], le « paradoxe du pH » [9-11] ou encore l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) à la reperfusion [12,13]. Ces phénomènes, engendrés dans les cardiomyocytes par la restauration rapide du flux coronaire après une ischémie prolongée, vont être à l'origine de perturbations physico-chimiques et biologiques importantes. On peut citer notamment la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [14], des dysfonctions au niveau des pompes ioniques Na^+/K^+ ATPase et Ca^{2+} ATPase [15], des modifications brutales du pH intracellulaire par l'activité des échangeurs Na^+/H^+ ou $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ [16] ou encore une déplétion majeure en adénosine triphosphate (ATP) par un effondrement du potentiel de membrane mitochondrial et un arrêt de la phosphorylation oxydative [17]. Ces troubles cellulaires vont être responsables de la mort de cardiomyocytes et d'une nécrose supplémentaire à celle induite par l'ischémie (**Figure 1**). Il est impossible de différencier ces deux types de nécrose mais les descriptions tissulaires font état d'œdèmes dans les cardiomyocytes, de contractures des myofibrilles, d'accumulation de particules de calcium dans les mitochondries ainsi qu'une perturbation des sarcolemmes [18,19].

Bien que la reperfusion la plus rapide possible soit la seule façon efficace de protéger le myocarde contre l'accumulation de lésions ischémiques, il est donc aujourd'hui clairement démontré que cette reperfusion a également des effets néfastes sur la survie des cardiomyocytes. Prévenir ces lésions de reperfusion s'est donc avéré être une cible thérapeutique essentielle de la prise en charge de l'IDM, et

c'est dans ce cadre que des travaux pré-cliniques ont été menés dans les années 80.

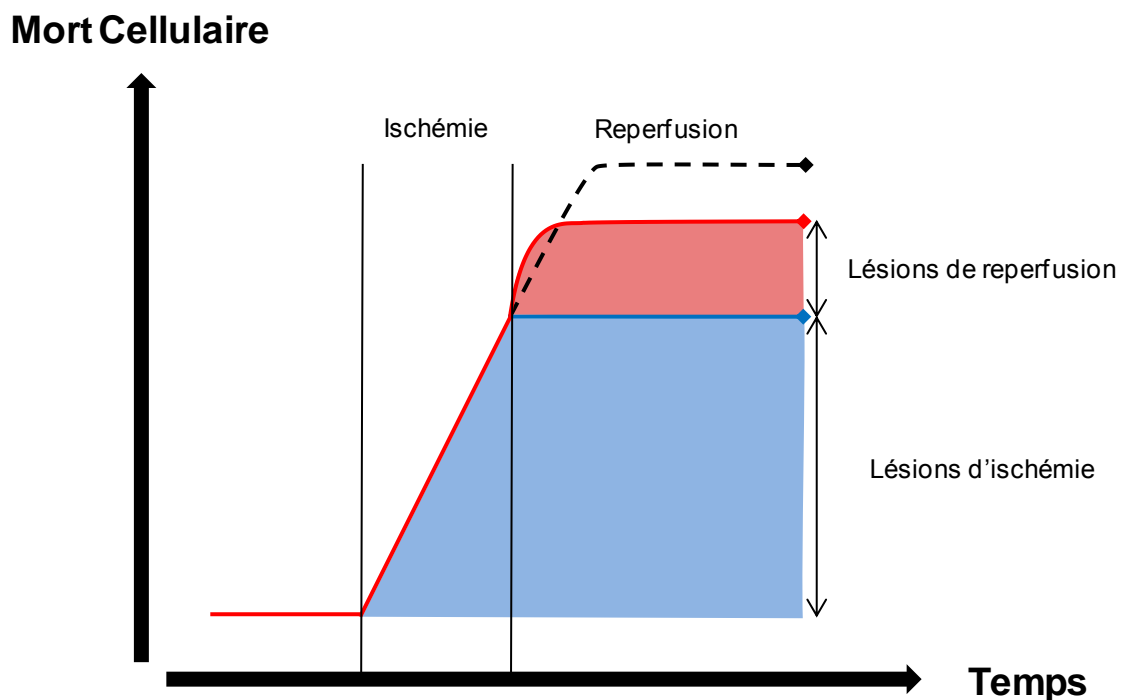


Figure 1. Mort cellulaire au cours du temps et conséquences de la reperfusion. Une part importante de la taille de l'infarctus est la conséquence de lésions survenant à la reperfusion (rouge). Elles touchent le myocarde encore viable et viennent s'ajouter aux lésions myocardiques irréversibles liées à l'ischémie (bleu). *Adaptée de Thibault et al. 2007 [20].*

Murry *et al.* furent les premiers à décrire une technique dite de « cardioprotection » en réalisant des cycles d'occlusions intermittentes non létales d'une artère coronaire, en prévision d'un infarctus ultérieur de cette même coronaire [21]. Ce « préconditionnement local » (*Ischemic PreConditioning*, IPreC), par l'induction d'un stress initial, est un phénomène puissant qui activerait une protection endogène contre l'ischémie. Il a été capable de réduire de 75% la taille de l'infarctus chez des chiens « conditionnés » et les auteurs ont évoqué un possible mécanisme d'inhibition de la déplétion en ATP et de l'accumulation en catabolites, habituellement observées durant l'ischémie. Aujourd'hui, presque 30 ans après cette description initiale, l'IPreC a été reproduit chez un grand nombre d'espèces et s'est avéré efficace pour protéger un grand nombre d'organes [22-24].

Alors que pendant longtemps le préconditionnement local a été la seule technique de cardioprotection physique existante, le fait de devoir anticiper la survenue d'un épisode ischémique létal tel que c'est le cas dans l'IDM, rendait son application clinique très difficile. Il a néanmoins été appliqué avec succès dans le cadre de chirurgies coronaires programmées [25-27].

Il faut attendre 2003 pour que Zhao *et al.* mettent en évidence qu'il est possible de réduire les lésions d'ischémie-reperfusion (I/R) liées à l'IDM, par la réalisation de séquences d'ischémies transitoires similaires à celle de l'IPreC, mais réalisées au moment de la reperfusion myocardique [28]. C'est le « postconditionnement local » (*Ischemic PostConditioning*, IPostC). Ils ont décrit un mécanisme d'une puissance comparable à l'IPreC, capable de réduire la taille de l'infarctus chez les chiens soumis à 60 min d'ischémie myocardique, mais également de préserver la fonction endothéliale, de diminuer la production de ROS et encore de réduire l'infiltration leucocytaire dans le tissu infarci. Cette découverte a relancé l'intérêt de la phase de reperfusion comme cible potentielle de la cardioprotection. Cela a eu pour effet de générer plusieurs études cliniques concluantes sur l'application de l'IPostC lors de la reperfusion par PCI en phase aiguë d'infarctus [29-31]. L'application clinique de l'IPostC est donc beaucoup plus grande que celle de l'IPreC puisqu'elle ne nécessite pas d'anticiper un éventuel épisode ischémique.

Depuis la découverte de ces deux conditionnements, de nombreuses études ont été consacrées à la compréhension de leur mode d'action. On sait aujourd'hui que la protection induite par l'IPreC dépend de la durée entre la fin du préconditionnement et le début de l'ischémie myocardique complète. On distingue donc deux fenêtres d'actions nommées « préconditionnement précoce » (durée inférieure à 3 h), faisant intervenir des réactions courtes telles que l'activation de canaux ioniques ou la phosphorylation/déphosphorylation d'enzymes endogènes (**Figure 3**) [32,33], et le « préconditionnement tardif » (24 h à 96 h), agissant par la modulation de l'expression génique (**Figure 3**) [22,34]. L'IPostC a longtemps été décrit comme inefficace si appliqué au-delà de la première minute de reperfusion du myocarde [35], mais des travaux récents laissent supposer que d'une façon similaire à l'IPreC, l'IPostC possède une phase d'action plus tardive et peut donc être appliqué plus en aval de la reperfusion (jusqu'à 30 min après la reperfusion). C'est le « *delayed postconditioning* » (**Figure 3**) [36].

Les effets cardioprotecteurs de l'IPreC et de l'IPostC sont aujourd'hui bien démontrés dans un ensemble de modèles animaux et cliniques mais il n'en reste pas moins que les signaux cellulaires et moléculaires impliqués ne sont pas encore complètement identifiés. Trois étapes de signalisation cellulaires, pouvant être à l'origine de la cardioprotection locale, ont tour à tour été décrites pour expliquer la cascade d'évènements intracellulaires engendrée.

Il s'agit premièrement de l'action d'« initiateurs » endogènes, tels que l'adénosine, la bradykinine, les opioïdes ou encore le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) libérés par les cycles transitoires d'occlusion/reperfusion de la coronaire. Ces éléments vont être capables de conditionner le cœur en se fixant au niveau de récepteurs spécifiques, comme les récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G ou les récepteurs au TNF- α (**Figure 2**) [37-40].

Des « médiateurs » vont ensuite prendre le relai de cette information protectrice et c'est le rôle joué par les kinases de survie cellulaire. Un premier groupe de kinases activées par les protéines G a d'abord été décrit, à savoir les *reperfusion injury salvage kinase* (RISK). Il comprend la *phosphatidyl inositol-3-kinase* (PI3K), Akt [41,42], ainsi que les kinases appartenant à la voie des *mitogen activated protein kinases* (MAPK) comme les *mitogen-activated protein kinase kinase 1/2* (MEK1/2) et les *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2) [43,44]. Un deuxième groupe appelé *survivor activating factor enhancement* (SAFE) est capable de véhiculer le signal dans le cardiomyocyte. Il s'agit du tandem *janus kinases/signal transducer activator of transcription-3* (JAK/STAT-3), activé par les récepteurs au TNF- α [45,46]. Des travaux de notre équipe ont montré que ces deux voies pouvaient interagir entre elles [47]. Une troisième voie a été décrite dans la littérature comme étant activée par RISK et SAFE. Elle repose sur l'activation de l'*endothelial nitric oxide synthase* (eNOS). L'oxyde nitrique (NO) produit va générer la synthèse de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) *via* la guanylate cyclase (GC) [48,49]. Ce cGMP est alors capable d'activer la protéine kinase G (PKG). Il y a alors production de ROS, en particulier de peroxyde d'hydrogène, à l'origine de l'activation de la protéine kinase C- ϵ (PKC- ϵ) (**Figure 2**) [50-52].

Les derniers éléments de signalisation pouvant aboutir à la cardioprotection, sont les « effecteurs ». Ils sont activés par les médiateurs cités précédemment et

interviennent à la fin de la cascade intracellulaire engendrée par le conditionnement local. Le plus important d'entre eux, car semblant être l'effecteur final de toutes les voies décrites ci-dessus, est le mPTP [53-55]. Il est essentiel dans l'intégrité de la chaîne respiratoire mitochondriale, et son ouverture à la reperfusion, sous l'effet d'un excès de calcium ou des ROS, va engendrer des dommages cellulaires sévères, par l'arrêt de la respiration mitochondriale [56-59]. C'est donc vers l'inhibition de l'ouverture de ce pore que les voies de survie cellulaire convergent. Un acteur important de cette inhibition est la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β). Il s'agit d'une protéine cytoplasmique dont la forme active, non phosphorylée, est capable d'ouvrir le mPTP [60,61]. Il a été démontré que le conditionnement local est capable de phosphoryler la GSK-3 β et donc d'inhiber l'ouverture du mPTP [62]. Il existe cependant des données discordantes sur l'implication de cette GSK-3 β dans ces mécanismes protecteurs [63]. Le deuxième effecteur de la survie cellulaire induite par le conditionnement local est le canal mitochondrial potassique ATP dépendant (mK_{ATP}) [64-67]. Il permet le maintien du mPTP clos à la reperfusion (**Figure 2**).

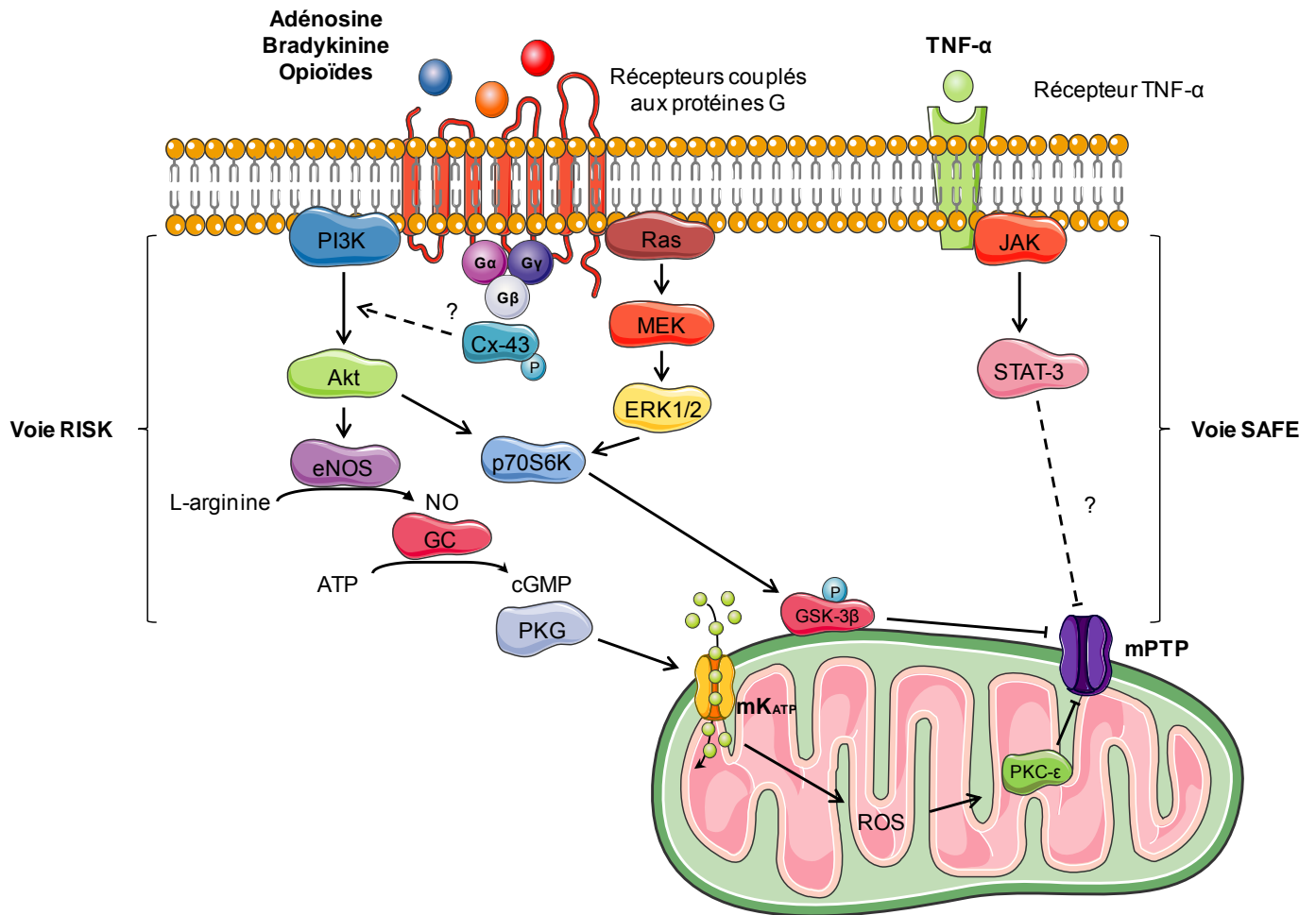


Figure 2. Signalisations intracellulaires impliquées dans la cardioprotection. De multiples facteurs peuvent activer les voies de survie intracellulaires, notamment l'adénosine, la bradykinine, les opioïdes ou le TNF- α . Ces initiateurs se fixent au niveau des récepteurs couplés aux protéines G et des récepteurs au TNF- α . Sont ensuite mises en jeu deux cascades de signalisation distinctes, la voie RISK et la voie SAFE. De nombreux médiateurs appartiennent à ces voies et notamment les kinases PI3K, Akt, ERK1/2, JAK ou le facteur de transcription STAT-3. La voie RISK aboutit à l'ouverture du mK_{ATP} , induisant la génération de ROS puis l'activation de la PKC- ϵ . Cette kinase va permettre d'inhiber l'ouverture du mPTP, responsable des lésions de reperfusion. L'inhibition de la GSK-3 β par la voie RISK permet elle aussi de bloquer l'ouverture du mPTP. La voie SAFE, *via* STAT-3, aboutit à l'inhibition du mPTP, par des mécanismes encore méconnus. *Adaptée d'Ovize et al. 2010 [68].*

Malgré certaines incertitudes quant aux voies de signalisation impliquées, l'action du conditionnement local est maintenant bien démontrée en recherche préclinique. En thérapeutique humaine des limites existent quant à l'utilisation de ce conditionnement [20]. Bien qu'il s'accompagne d'effets bénéfiques réels, tels que la réduction de la taille de l'infarctus ou de l'aire sous la courbe des créatines kinases libérées, il ne permet pas de réduire la morbi-mortalité. Son autre désavantage

majeur est qu'il s'agit d'une procédure appliquée directement au niveau du cœur, accessible uniquement aux patients traités par angioplastie, et non sans risque de par sa nature invasive. La démonstration de l'effet cardioprotecteur d'un conditionnement appliqué à un organe ou un tissu à distance du cœur a donc été une avancée importante dans la cardioprotection.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 1. Le conditionnement à distance

Historique

1. Le préconditionnement

Le conditionnement ischémique à distance (*Remote Ischemic Conditioning, RIC*) est une stratégie simple de cardioprotection, permettant de lutter contre les lésions d'ischémie-reperfusion. Il s'agit d'un phénomène dans lequel de brèves séquences d'ischémies non létales, d'un organe ou d'un tissu à distance du cœur, peuvent conférer à ce dernier une résistance contre une ischémie létale.

Initialement, c'est dans le cadre de la protection intracardiaque que le conditionnement à distance a été décrit [69]. Il s'agissait de chiens conditionnés, par 4 cycles de 5 min d'ischémie-5 min de reperfusion du territoire irrigué par la coronaire circonflexe, avant une ischémie létale d'une heure du territoire irrigué par l'artère coronaire gauche descendante. Ce préconditionnement ischémique à distance (*Remote Ischemic PreConditioning, RIPreC*) (**Figure 3**) s'est avéré capable de réduire de 65% la taille de l'infarctus chez ces chiens, par rapport aux chiens contrôles. Les auteurs ont présumé que l'activation, la production ou le transport, d'un ou des facteurs protecteurs jusqu'à la zone infarctée pourrait être la raison de cette cardioprotection. Ces travaux ont été confirmés par une étude chez le lapin montrant qu'un RIPreC par 10 min d'occlusion de l'artère rénale gauche était aussi efficace pour réduire la taille de l'infarctus qu'une ischémie de 5 min d'une artère coronaire [70]. Bien qu'efficaces, ces conditionnements sont trop invasifs pour être appliqués à l'homme. Il était donc nécessaire de développer une autre méthode pour induire le RIPreC. C'est en 1997 que Birnbaum *et al.* ont fait une première avancée dans cette direction. Ils ont décrit un modèle de RIPreC par sténose d'un muscle squelettique (55% à 65% de réduction du flux de l'artère fémorale) associé à une stimulation électrique du muscle gastrocnémien (une stimulation par seconde). Ils ont ainsi induit une cardioprotection chez des lapins, soumis à 30 min d'ischémie myocardique et 4 heures de reperfusion, en réduisant la taille de l'infarctus de 65% [71]. Cette méthode de RIPreC moins invasive a ensuite été perfectionnée par Oxman *et al.* en induisant l'ischémie transitoire d'une patte inférieure mais cette fois-

ci à l'aide d'un tourniquet élastique placé sur son extrémité supérieure [72]. Le RIPreC induit était donc totalement atraumatique et permettait de réduire les arythmies de reperfusion causées par 30 min d'ischémie myocardique par la méthode de cœur isolé perfusé selon la technique de Langendorff. Il s'agissait de la première description d'une technique de RIPreC non invasive et applicable à l'homme.

Ces preuves de concept du RIPreC ont ensuite fait l'objet de nombreuses études dans les années 2000. Elles ont permis de confirmer que divers organes peuvent être le siège du préconditionnement à distance afin d'induire une cardioprotection. C'est le cas du rein [73-76], de l'intestin [77-79], du cerveau [80,81] ou encore des membres [82-84].

En plus de faire varier le lieu d'application du RIPreC, les chercheurs se sont également intéressés à optimiser la cardioprotection offerte par cette technique, en faisant varier la durée des ischémies transitoires. L'hypothèse initiale était que plus l'organe à distance est « conditionné » plus la cardioprotection est efficace. Différents cycles d'ischémies intermittentes de l'organe à distance ont alors été testés sans qu'un cycle en particulier n'apparaisse comme plus efficace que les autres. Il semble que l'efficacité des algorithmes de conditionnement soit dépendante à la fois de l'organe et de l'espèce chez lesquels ils sont réalisés. Il a néanmoins été admis que plusieurs cycles d'occlusion/désocclusion sont plus efficaces qu'un cycle unique, et qu'il faut que ces cycles soient d'une durée suffisante pour induire une réponse de l'organe. L'algorithme classiquement utilisé et présentant de bons résultats au niveau de la réduction de la taille de l'infarctus dans plusieurs modèles est donc 3 ou 4 cycles de 5 min d'occlusion-5 min de reperfusion de l'organe à distance [85,86].

2. Le perconditionnement

Le perconditionnement ischémique à distance (*Remote Ischemic PerConditioning*, RIPerC) (**Figure 3**) diffère du RIPreC par le fait que le conditionnement à distance est réalisé non pas avant mais pendant l'ischémie myocardique. Cela permet de réduire la durée de la procédure opératoire et de la rendre applicable à la prise en charge d'ischémies en cours.

Décrit pour la première fois en 2007 par Schmidt *et al.*, le RPerC était réalisé par 4 cycles de 5 min d'ischémie-5 min de reperfusion de la patte à l'aide d'un tourniquet, durant les 40 min d'occlusion coronaire. Dans ce modèle d'infarctus chez le cochon, le RPerC a permis de réduire la taille de l'infarctus, d'améliorer les paramètres de la fonction cardiaque et de réduire la survenue d'arythmies à la reperfusion [87]. Par la suite, le RPerC s'est montré efficace dans d'autres espèces animales et avec d'autres algorithmes de conditionnement, afin de réduire l'apparition du phénomène de *no-reflow* ainsi que la réponse inflammatoire [88,89]. Des travaux de notre équipe ont également démontré que le RPerC peut être combiné à un conditionnement local comme l'IPostC. Chez le rat, cette association induit une diminution de la taille de l'infarctus supérieure à celle obtenue avec chaque conditionnement seul [47].

3. Le postconditionnement

La troisième façon de protéger le myocarde des lésions d'ischémie reperfusion consiste à appliquer le conditionnement à distance au moment de la reperfusion coronaire. C'est le postconditionnement ischémique à distance (*Remote Ischemic PostConditioning*, RPostC) (**Figure 3**).

Utilisé pour la première fois dans l'étude de Kerendi *et al.* en 2005, le terme RPostC désignait un conditionnement par 5 min d'ischémie rénale suivi d'une reperfusion. Ce RPostC n'était pas appliqué à la fin des 30 min d'ischémie myocardique mais entre la 24^{ème} et la 29^{ème} minute. Il s'agissait donc plutôt d'un RPerC réalisé en fin d'ischémie. Dans cette étude la taille de l'infarctus des rats ayant subi le RPostC a été réduite de 50% par rapport aux animaux contrôles. La libération de créatine phosphokinase à 2 h de reperfusion a également été diminuée de 34% dans le groupe conditionné [90]. De la même manière, Li *et al.* ont réalisé un RPostC chez le lapin, par 5 min d'occlusion de l'artère fémorale, 6 min avant la fin de l'ischémie myocardique. Ils ont ainsi réduit la taille de l'infarctus, la libération de créatine phosphokinase et de malondialdéhyde, mais également l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans la zone à risque [91]. Il faut finalement attendre 2007 et l'étude d'Andreka *et al.* pour voir la première réalisation d'un réel RPostC, par 4 cycles de 5 min d'ischémie-5 min de reperfusion de la patte à l'aide d'un brassard à tension, initié juste après la reperfusion myocardique. Ce conditionnement

a abouti à la diminution de 48% de la taille de l'infarctus ainsi qu'à une réduction de la libération de CPK de 26% [92].

Il a été établi que la cardioprotection induite par le RIPreC était dépendante de l'algorithme utilisé ainsi que de l'organe à distance qui était le siège du conditionnement. De la même manière, Gritsopoulos *et al.* ont comparé la cardioprotection obtenue par un même cycle de RIPostC mais appliqué à deux endroits différents. Celui-ci consistait en 4 cycles de 1 min d'ischémie-1 min de reperfusion soit d'une autre artère coronaire que celle servant à l'ischémie myocardique, soit de l'artère carotide gauche. Ils ont ainsi montré que les deux conditionnements étaient efficaces pour induire la cardioprotection mais sans différence d'efficacité entre eux. En effet, ils réduisaient de façon significative la taille de l'infarctus de respectivement 62% et 61%. Dans cette étude, ils ont également comparé l'effet de ces RIPostC à celui obtenu par le même algorithme mais en IPostC. Avec une réduction de 30% la taille de l'infarctus, l'IPostC s'est montré beaucoup moins efficace que le RIPostC [93]. Breivik *et al.* ont également montré qu'il était possible de mimer l'effet du RIPostC par l'injection d'effluents coronaires issus d'IPostC, dans un modèle d'infarctus du myocarde sur cœur isolé perfusé [94].

4. Les différentes phases du conditionnement à distance

A l'image du conditionnement local, le conditionnement à distance présente deux phases, nommées phase précoce et phase tardive. De par leur dénomination, ces deux « fenêtres d'action » diffèrent en terme de moment où elles sont mises en place après la réalisation du RIC, mais également par leurs mécanismes d'actions.

La phase précoce du RIC est la phase classiquement décrite dans les études utilisant un conditionnement appliqué quelques heures (<4 h) ou quelques minutes avant (RIPreC) ou après (RIPostC) la réalisation de l'ischémie myocardique (**Figure 3**). Reposant essentiellement sur des modifications post-traductionnelles des protéines existantes, cette période de protection a été mise en évidence dans de nombreux modèles de RIC induisant une cardioprotection [47,74,94,95], mais également dans d'autres modèles de protection tissulaires sur des organes différents du cœur [96-99].

La phase tardive du RIC met en jeu des processus cardioprotecteurs plus longs à mettre en place (24-72 h), tels que des régulations géniques ou des modulations de l'inflammation (**Figure 3**). Plusieurs modèles de RIC se sont montrés efficaces pour induire une cardioprotection tardive. En 2001, Xiao *et al.* ont utilisé un modèle de RIPreC au niveau intestinal et ont mis en évidence une diminution de la taille de l'infarctus, quand celui-ci était réalisé 24, 48 ou 72 h après le conditionnement à distance [100]. En 2004, Li *et al.* ont montré qu'un RIPreC à la patte réalisé 24 h avant une ischémie myocardique était capable de réduire de 31% la taille de l'infarctus [101]. Le RIC et sa phase tardive ont également été grandement étudiés en dehors de la cardioprotection. Moses *et al.* ont montré en 2005 que la réalisation d'un RIPreC à la patte plusieurs heures (0 à 96 h) avant une ischémie au niveau de muscles dorsaux était capable de réduire significativement la taille de l'infarctus à 4 h (phase précoce), 24, 28, 36, 48 et 72 h (phase tardive) [102]. A 6 h et 8 h après le RIPerC, la protection n'était pas présente, ce qui décrit bien une séparation entre les deux phases de conditionnement.

La cardioprotection à distance en clinique humaine

A l'heure actuelle, et bien qu'il soit clairement décrit comme efficace dans de nombreux modèles précliniques [86,103], le RIC n'a pas encore de réalité clinique quotidienne. Certains essais cliniques ont pourtant décrits de réels effets bénéfiques de cette procédure, mais sans qu'il y ait d'effets sur la morbi-mortalité [104-106] [107]. C'était le cas par exemple lors de la réalisation d'un pontage aorto-coronarien [108] ou lors d'une chirurgie réparatrice suite à une malformation cardiaque congénitale [109]. Les bénéfices décrits dans ces études ne concernaient que la réduction des lésions péri-opératoires et la réduction de la libération des biomarqueurs comme la troponine I [110-112]. Dans d'autres études, et pour les mêmes types d'interventions, le conditionnement à distance était en revanche incapable d'induire une protection [113-115].

Plusieurs causes peuvent expliquer les différences de résultats observées entre ces essais cliniques. Elles sont détaillées dans la revue de Lim et Hausenloy [111] :

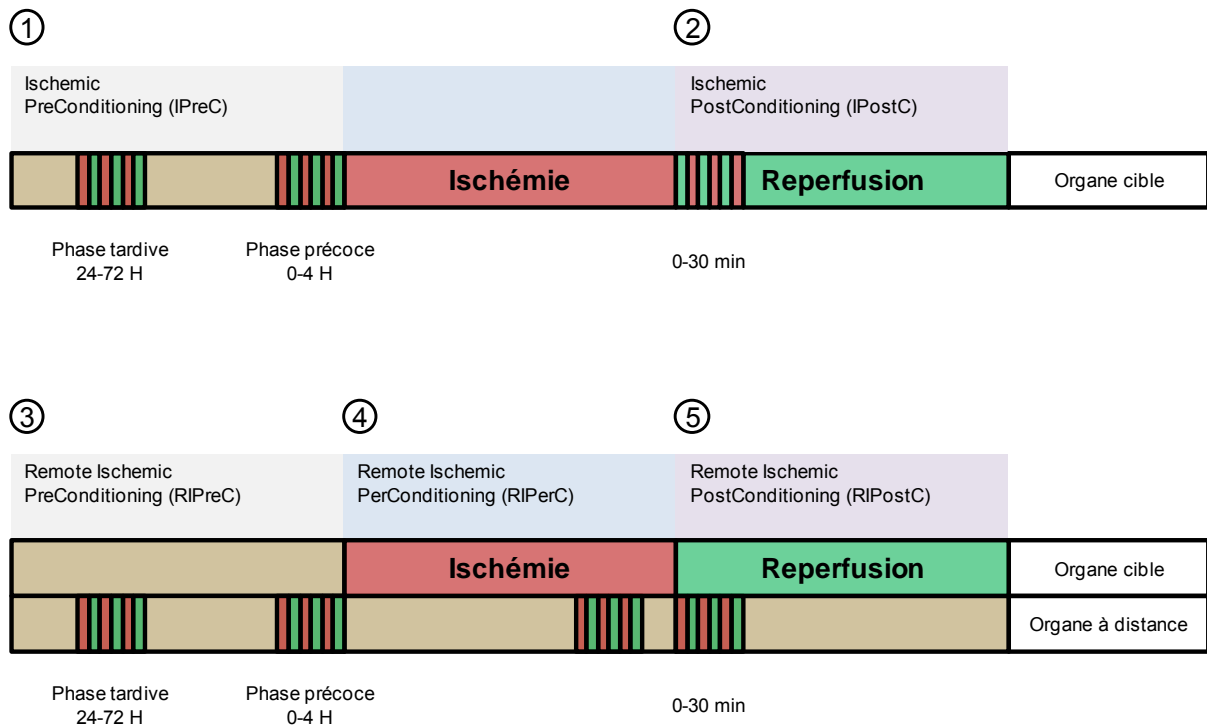


Figure 3. Les différents algorithmes du conditionnement ischémique. Le conditionnement local correspond à la réalisation de séquences d'I/R transitoires non létales directement au niveau de l'organe cible. Le conditionnement à distance quant à lui est appliqué au niveau d'un organe périphérique. Dans le préconditionnement local ① (IPreC), comme dans le préconditionnement à distance ③ (RIPreC), il existe deux fenêtres d'action, dépendants de la durée s'écoulant entre les épisodes d'I/R intermittentes et l'ischémie létale de l'organe cible. On parle de phase tardive (24-72 h) et de phase précoce (0-4 h). Dans le conditionnement à distance un perconditionnement peut être effectué ④ (RIPerC) durant l'ischémie létale. Il est également possible de conditionner l'organe cible après sa reperfusion. La fenêtre d'action (0-30 min) est cependant plus courte que pour la phase précoce du préconditionnement. On peut appliquer ce conditionnement localement ② (IPostC) ou bien à distance ⑤ (RIPostC). *Adaptée d'Hausenloy et Yellon. 2011 [116].*

- L'utilisation concomitante de médicaments, pouvant induire une protection, peut masquer l'effet du RIC. C'est le cas de l'utilisation des dérivés nitrés et de certains anesthésiques comme l'isoflurane ou le propofol [117].

- Le moment d'application et l'algorithme du RIC utilisé peuvent être différents entre les études.

- La population étudiée ainsi que le type d'intervention réalisée peuvent intervenir dans les différences de résultats.

Des espoirs existent pourtant quant à l'application prochaine du RIC chez l'homme. L'étude de Thielmann *et al.* a démontré pour la première fois qu'un impact du conditionnement à distance était possible sur la morbi-mortalité [118]. De futurs essais cliniques viendront peut-être confirmer ou infirmer cette étude, et ainsi décider du devenir de la cardioprotection à distance en clinique humaine.

Les mécanismes de la cardioprotection à distance

Bien que le conditionnement à distance soit aujourd'hui démontré dans de nombreux modèles, il n'en reste pas moins que ses mécanismes d'action, et en particulier ceux permettant le transfert de l'information protectrice de l'organe à distance vers le cœur, ne sont pas clairement identifiés. Certains travaux donnent des résultats divergents et il est de fait possible que les mécanismes mis en jeu dans un type de conditionnement ne soient pas strictement les mêmes dans un autre. Cela pourrait par exemple expliquer des différences de mécanistique entre le RIPreC, le RIPerC et le RIPostC. De même des variations peuvent survenir quand au moyen par lequel est véhiculée l'information cardioprotectrice jusqu'au cœur, en fonction de l'organe à distance qui a été le siège du conditionnement. Il est donc nécessaire d'appréhender ces hypothèses de cardioprotection comme différents phénomènes qui ne sont pas nécessairement antagonistes entre eux. Ils peuvent même interagir entre eux et être dépendants les uns des autres.

Trois hypothèses existent quand à l'origine de la cardioprotection à distance. La 1^{ère} met en jeu une voie neuronale, induisant la libération de facteurs comme l'adénosine, la bradykinine ou le peptide relié au gène de la calcitonine (*calcitonin gene-related peptide*, CGRP). Ces médiateurs stimuleraient ensuite une voie neuronale afférente puis une voie efférente jusqu'au cœur pour induire la cardioprotection. La 2^{ème} hypothèse suppose que les facteurs libérés au niveau périphérique sont véhiculés par la circulation systémique jusqu'au cœur et agissent ensuite *via* des récepteurs au niveau du myocarde. La 3^{ème} possibilité est celle suggérant que le RIC induirait une réponse systémique protectrice, aboutissant à la réduction des phénomènes de stress cellulaire, d'inflammation et d'apoptose (**Figure 4**).

1. La voie neuronale

Plusieurs facteurs semblent impliqués dans cette protection par voie neuronale, comme l'adénosine, la bradykinine ou le CGRP. Ils semblent être libérés par l'organe à distance, être relargués dans la circulation au moment de la reperfusion et agir de manière paracrine avec des nerfs afférents qui vont relayer l'information cardioprotectrice jusqu'au myocarde par d'autres nerfs, efférents cette fois-ci. Cette hypothèse est notamment soutenue par des travaux utilisant des bloqueurs pharmacologiques de certains ganglions et montrant une perte de la cardioprotection à distance. Cela confirme l'implication de la voie neuronale dans la transduction du signal [119].

1.1. Adénosine

L'adénosine et l'ATP jouent, entre autre, un rôle neuromodulateur. Il existe un équilibre entre les concentrations de ces deux éléments, avec dans les conditions physiologiques une balance en faveur de l'ATP. Durant une phase aiguë d'anoxie la balance est complètement inversée, avec une augmentation rapide de l'adénosine et une chute du taux d'ATP [120]. L'adénosine peut être comparée à « une molécule de l'urgence », notamment dans le cœur hypoxique. Elle induit une bradycardie avec des effets chronotropes et inotropes négatifs, ainsi qu'une diminution de la contractilité cardiaque, pouvant conduire à la cardioprotection. L'adénosine a également un rôle de compensation du besoin en oxygène en induisant une vasodilatation dans le muscle durant l'hypoxie. La présence de nombreux récepteurs à l'adénosine dans le myocarde et au niveau des artères coronaires suggère aussi un rôle majeur de cette molécule dans la cardioprotection.

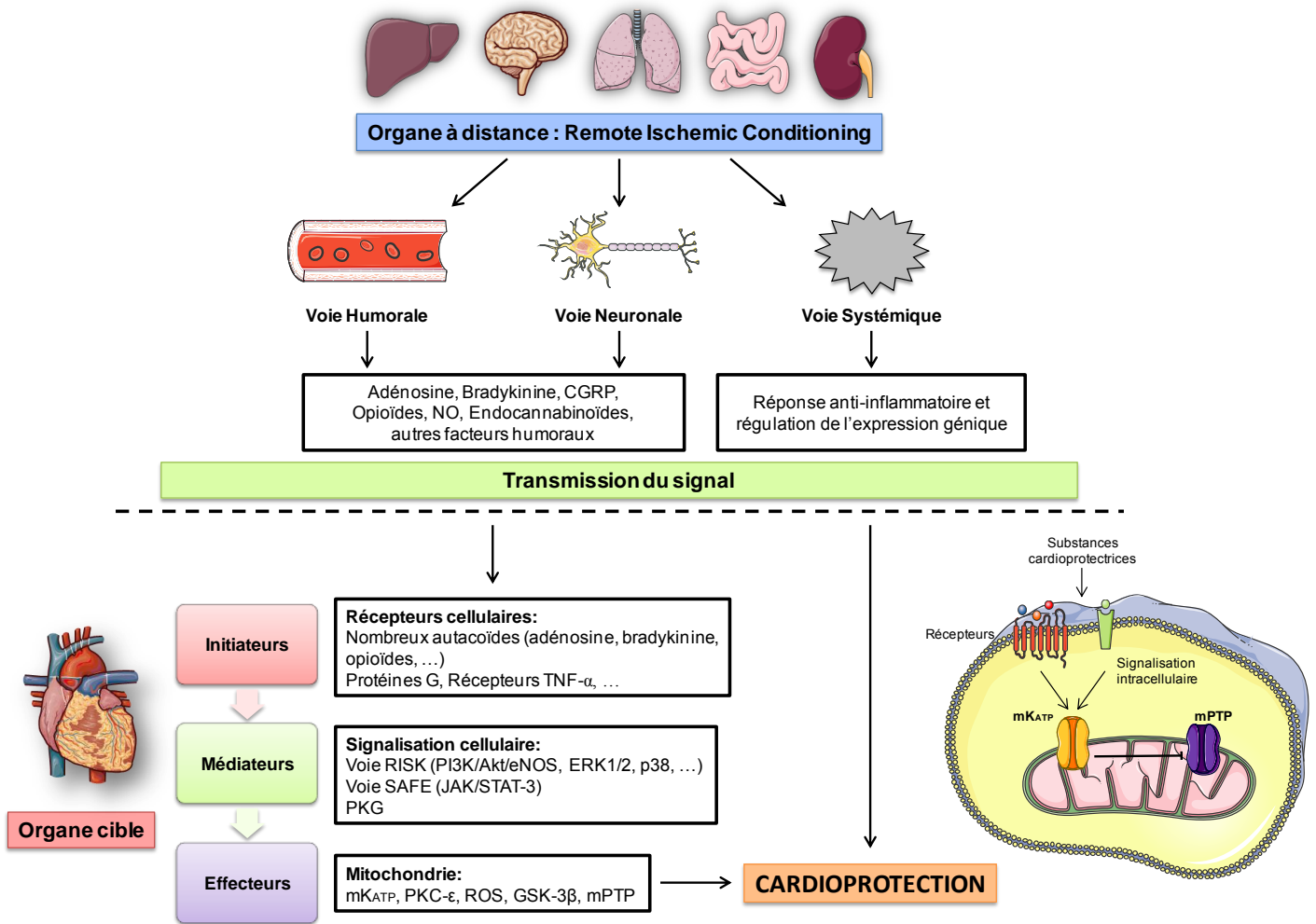


Figure 4. Les mécanismes potentiels du conditionnement ischémique à distance. Trois hypothèses existent quant à la transmission du signal protecteur de l'organe à distance jusqu'au cœur. La voie humorale implique la libération d'autacoïdes dans la circulation sanguine alors que la voie neuronale est induite par la libération de médiateurs activant une voie afférente puis une voie efférente. Il existe également une réponse systémique par la régulation de l'expression génétique, la suppression de l'inflammation et de l'apoptose. Au niveau du cœur, la transmission du signal protecteur aboutit à la fixation des médiateurs au niveau d'initiateurs de la signalisation cellulaire, notamment les récepteurs aux protéines G et les récepteurs au TNF- α . Les voies de survie cellulaire RISK et SAFE activent ensuite des effecteurs au niveau de la mitochondrie afin d'inhiber l'ouverture du mPTP et d'induire la cardioprotection. *Adaptée de Szijártó et al. 2012 [103].*

Un antagoniste non spécifique des récepteurs à l'adénosine, le 8-sulphophenyltheophylline (8-SPT), a montré qu'elle jouait un rôle majeur dans le RIC. En effet, administré avant le RIPreC [74,121], après le RIPreC [122] ou avant un RIPostC [123], le 8-SPT a été capable d'inhiber la diminution de la taille de l'infarctus. Ding *et al.* ont également montré que l'injection de 8-SPT était capable d'inhiber la décharge des neurones afférents, habituellement induite par le RIC [124].

L'hexaméthonium, un bloqueur des ganglions, s'est également montré capable d'inhiber la cardioprotection induite par l'injection d'adénosine au niveau du mésentère [121]. L'injection d'adénosine au niveau de l'artère fémorale par Dong *et al.* en 2004 a également réduit la taille de l'infarctus [125]. Ces observations suggèrent que, comme au niveau du cœur, l'adénosine est massivement relarguée au niveau périphérique lors du RIC pour ensuite stimuler des nerfs afférents. Toujours par l'intermédiaire de l'adénosine, des voies efférentes jusqu'au cœur seraient ensuite activées. C'est en tout cas ce que suggèrent Liem *et al.* en montrant que l'injection de 8-SPT après le RPreC, soit après la décharge des neurones afférents, était capable d'inhiber la cardioprotection [121]. L'adénosine pourrait également avoir des effets directs sur les cardiomyocytes en se fixant sur ses récepteurs. La réalisation d'un RPreC chez des souris *knock-out* (KO) pour le récepteur A1 de l'adénosine n'a en effet pas permis d'induire la cardioprotection [80].

1.2. Bradykinine

La bradykinine est un puissant vasodilatateur, notamment des coronaires, qui augmente la perméabilité des capillaires. Elle accélère et renforce les contractions myocardiques ainsi que la contraction des muscles lisses non vasculaires. Elle est également impliquée dans les mécanismes de la douleur.

Comme observé avec l'adénosine, l'utilisation d'un antagoniste spécifique des récepteurs B2 à la bradykinine, le Hoechst-140, avant un RPreC au niveau mésentérique, a aboli la réduction de la taille de l'infarctus [78]. Dans cette étude, la libération de bradykinine habituellement observée durant le RPreC était aussi inhibée par le Hoechst-140. De plus, l'hexaméthonium a été capable d'inhiber la cardioprotection induite par l'administration de bradykinine. Wolfrum *et al.* ont proposé que la réduction de la taille de l'infarctus par le RPreC soit médiée par la bradykinine au travers de l'activation de la PKC- ϵ . Le Hoechst-140 et l'hexaméthonium ont réussi à abolir cet effet protecteur du RPreC et la translocation de la PKC- ϵ [126].

1.3. Peptide relié au gène de la calcitonine

Un troisième facteur jouerait un rôle dans le conditionnement à distance : le peptide relié au gène de la calcitonine. Il s'agit d'un neurotransmetteur, libéré par le nerf vague et les nerfs sensitifs sensibles à la capsaïcine. L'implication de cette molécule dans le conditionnement ischémique a d'abord été mise en évidence dans le conditionnement local [127,128]. Étudiée ensuite dans le RIC, l'implication du CGRP a également été confirmée. En effet, Tang *et al.* ont décrit que le RIPreC au niveau intestinal était capable d'induire la libération de CGRP au niveau plasmatique, et que cette libération cardioprotectrice était abolie en cas de prétraitement avec de la capsaïcine. Ce serait donc la capsaïcine qui libérerait le CGRP par les nerfs et un prétraitement par cette molécule aurait pour effet de dépléter les neurones en CGRP et donc d'inhiber la cardioprotection [95]. Cette interaction entre la capsaïcine et le CGRP a fait l'objet d'une autre publication en 2001, par Xiao *et al.* Ils ont montré que le RIPreC était capable d'induire la libération plasmatique de CGRP et que cette augmentation était inhibée, ainsi que la cardioprotection, par l'utilisation de de L-nitro arginine methyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la synthèse de NO [100]. Le prétraitement des animaux par la capsaïcine a eu le même effet que dans l'étude de Tang *et al.*, à savoir la déplétion de neurones en CGRP et donc l'inhibition de sa libération plasmatique et de la cardioprotection.

De nombreuses autres études ont depuis confirmé l'implication de l'ensemble de ces molécules dans le RIC. L'hypothèse retenue est donc que le conditionnement ischémique induirait la libération de NO, qui activerait ensuite les fibres nerveuses sensibles à la capsaïcine. Celles-ci libéreraient alors du CGRP dans le sang pour induire la cardioprotection *via* la PKC- ϵ (**Figure 5**) [79].

1.4. Le conditionnement traumatique

Un phénomène plus rarement décrit, mais semblant également présenter de puissantes capacités cardioprotectrices, est le conditionnement traumatique (*Remote Conditioning of Trauma*, RCT) (**Figure 5**). Il s'agit d'induire de façon non-ischémique un conditionnement à distance, par l'intermédiaire de la stimulation de la réponse nociceptive. Dans cette étude, Ren *et al* ont induit chez des souris une

cardioprotection, caractérisée par une diminution de 81% de la taille de l'infarctus en phase précoce et de 40% en phase tardive. En pratique, le RCT était réalisé par une incision transverse de 2 cm au niveau de l'abdomen, allant de la peau jusqu'au péritoine [129].

Ce conditionnement traumatique et le RIC sont donc différents, de part leur mise en œuvre, mais ils semblent tout deux partager des mécanismes communs. En effet l'induction d'une cardioprotection par l'activation de la réponse nociceptive n'est pas sans rappeler le transfert de la cardioprotection du RIC par la voie neuronale et en particulier par le CGRP et la capsaïcine. Les fibres C, qui sont des fibres nerveuses sensibles, sont sensibles à la capsaïcine et présentent dans leur physiologie de nombreux neuropeptides comme le CGRP. La bradykinine et l'histamine sont également capables de provoquer la libération de CGRP par ces fibres sensibles de type C. C'est donc sans surprise que par la suite des travaux ont démontré *in vivo* chez la souris que la capsaïcine appliquée au niveau de l'abdomen était capable d'induire une cardioprotection semblable à celle obtenue avec le RCT [130]. L'utilisation de souris KO pour le récepteur B2 à la bradykinine ou bien l'utilisation de l'antagoniste Hoechst-140 a aboli la cardioprotection induite par le RCT. Cette inhibition était associée à la non translocation de la PKC- ϵ [130,131]. Dans une étude récente, Gross *et al.* ont confirmé que le RCT nécessite l'action des récepteurs à la bradykinine, et que la signalisation protectrice passerait par la voie du cytochrome P450 (**Figure 5**) [132].

1.5. La transduction nerveuse du signal

Bien qu'aujourd'hui le rôle du système nerveux dans la transduction du signal cardioprotecteur à distance soit bien référencé, il n'en reste pas moins de nombreuses zones d'ombres. Différentes molécules décrites précédemment semblent impliquées, comme l'adénosine, la bradykinine, le CGRP, la capsaïcine, le NO, la PKC- ϵ , mais sans que l'on ait clairement identifié la cascade d'évènements relayant ces acteurs à l'organe à distance et au cœur. Il est possible que l'implication de ces molécules soit dépendante de l'organe à distance qui est le siège du conditionnement ainsi que des voies nerveuses mises en jeu.

Depuis une dizaine d'année plusieurs travaux ont cherché à mettre en évidence un rôle de telle ou telle voie nerveuse dans la transduction du signal cardioprotecteur, en réalisant des sections de nerfs afin d'abolir l'effet. Ding *et al.* et Dong *et al.* ont respectivement mis en évidence que la section du nerf rénal ou du nerf fémoral pouvait abolir l'effet cardioprotecteur du RIPreC [124,125]. L'ablation des nerfs vagues pouvait également inhiber la cardioprotection à distance quand le cœur est l'organe qui subit le conditionnement. Brzozowski *et al.* ont en effet montré que le RIPreC, par des cycles d'I/R de l'IVA, pouvait être aboli en cas de vagotomie [133]. En 2010, une étude a confirmé que la section du nerf sciatique et du nerf fémoral était capable de bloquer l'effet cardioprotecteur du RIPreC [134]. A l'inverse, l'application de capsaïcine au niveau de l'abdomen ou la stimulation électrique directe du nerf fémoral s'est montrée capable de mimer la cardioprotection induite par le RIPreC [135].

Ce n'est que tout récemment que des travaux visant à identifier avec précision les fibres nerveuses, le type de neurones ou de ganglions impliqués ont vu le jour.

Après avoir démontré que l'injection intrathécale de naloxone méthiodide (dérivé quaternaire de la naloxone, antagoniste non spécifique des récepteurs opioïdes) était capable d'inhiber les effets cardioprotecteurs du RIPreC et du RCT, Wong *et al.* ont utilisé plusieurs agents chimiques afin d'identifier le type de récepteur opioïde qui pouvait être impliqué dans le transfert de la cardioprotection au niveau de la moelle épinière [136]. Ils ont donc testé sans effets des antagonistes spécifiques pour les récepteurs κ et δ , mais l'antagoniste des récepteurs μ a totalement inhibé la cardioprotection. Ils ont donc conclu que se sont les récepteurs opioïdes μ qui sont capables de relayer, au niveau de la moelle épinière, le signal cardioprotecteur (**Figure 5**).

L'hexaméthonium, antagoniste des récepteur nicotiques à l'acétylcholine, a clairement été démontré comme capable d'inhiber la cardioprotection induite par le RIPreC [121,126,136]. Les récepteurs nicotiques sont essentiellement présents au niveau de la jonction neuromusculaire ainsi qu'au niveau pré et post-ganglionnaire pour les systèmes nerveux sympathique et parasympathique. L'hexaméthonium n'ayant que peu d'affinité pour les récepteurs nicotiques musculaires, cela suggère que le RIPreC serait en partie relayé par le système neurovégétatif. Dans l'étude de Mastitskaya *et al.*, l'hypothèse était que le RIPreC était dépendant de l'activité des neurones pré-ganglionnaires du nerf vague, et donc de la voie parasympathique du

système neurovégétatif. Ils ont donc montré que l'inhibition spécifique de ces neurones par une transfection virale était capable d'inhiber l'effet du RIPreC. A l'inverse, leur stimulation était capable de mimer l'effet du RIPreC. L'utilisation d'un bloqueur des récepteurs cholinergiques muscariniques, l'atropine, a également inhibé l'effet cardioprotecteur du RIPreC [137]. Il y a donc bien un rôle du système neurovégétatif dans la transduction de la cardioprotection induite par le RIPreC, et en particulier par la principale voie efférente du cœur, le nerf vague. Il semblerait qu'à la fois les récepteurs cholinergiques nicotiques et muscariniques soient impliqués (**Figure 5**).

Une troisième étude, réalisée sur des lapins, montrait que la cardioprotection induite par le RIPreC au niveau d'une patte était inhibée par différents traitements, à savoir : la section de la moelle épinière entre T9 et T10, la vagotomie bilatérale, le blocage des récepteurs cholinergiques muscariniques à l'acétylcholine ou la section des nerfs sciatiques et fémoraux. En revanche, la stimulation électrique du nerf vague était capable de mimer la cardioprotection du RIPreC [138].

L'ensemble des études montrent donc que différentes voies neuronales peuvent médier la cardioprotection à distance, à différentes étapes de la conduction.

- Dans un premier temps le signal initial du RIC ou du RCT serait pris en charge par les nerfs moteurs et sensitifs périphériques, *via* une cascade de signalisation dépendante de plusieurs molécules telles que l'adénosine, la bradykinine, le NO ou encore le CGRP.

- Il serait ensuite transmis à la moelle épinière par l'intermédiaire des récepteurs opioïdes μ .

- Enfin, il serait véhiculé au cœur par les voies efférentes et en particulier le système neurovégétatif parasympathique *via* le nerf vague et les récepteurs cholinergiques nicotiques et muscariniques.

2. La voie humorale

Bien que la théorie neuronale soit aujourd'hui bien documentée, d'autres études apportent une vision différente sur la façon dont peut être médiée la

cardioprotection par le RIC. Dès 1993, McClanahan *et al.* ont en effet montré qu'une période de reperfusion de l'organe à distance était essentielle pour obtenir l'effet cardioprotecteur [70]. Cette observation va à l'encontre d'une réponse neuronale rapide et plus dans le sens d'une libération dans le temps de facteurs humoraux. Cette nécessité d'une reperfusion de l'organe à distance, pour induire la libération de facteurs dans la circulation sanguine, a ensuite été confirmée par Weinbrenner *et al.* qui ont démontré que la réalisation d'un RPreC, par 15 min d'occlusion de l'aorte abdominale, n'était protecteur que lorsque ce conditionnement était suivi d'une période de reperfusion de 10 min [139].

2.1. La preuve du concept

Dickson *et al.* furent les premiers à démontrer que le transfert de la cardioprotection pouvait passer par d'autres mécanismes que la signalisation nerveuse. Dans une première étude de 1999, ils démontrèrent qu'il était possible de transférer la cardioprotection d'un lapin ayant subi un RPreC à un lapin naïf, par transfert de sang. Le conditionnement était appliqué au niveau de l'artère coronaire circonflexe ainsi qu'à l'artère rénale par 5 épisodes de 5 min d'ischémie-10 min de reperfusion. 5 mL de sang étaient récupérés 1 min avant et 1 min après chaque épisode ischémique puis transfusés à un animal non conditionné. A la suite de cet échange sanguin, la taille de l'infarctus observée chez l'animal transfusé était réduite de 77% par rapport aux animaux non traités [140].

Ces travaux ont ensuite été confirmés dans un modèle de cœur isolé-perfusé selon la technique de Langendorff. Des cœurs non traités recevaient l'effluent coronaire collecté à partir de cœurs ayant subi un conditionnement local par 3 cycles de 5 min d'ischémie globale-10 min de reperfusion. Les cœurs ainsi traités présentaient une fonction améliorée [141,142] et une taille d'infarctus réduite d'environ 75% par rapport aux cœurs contrôles [143].

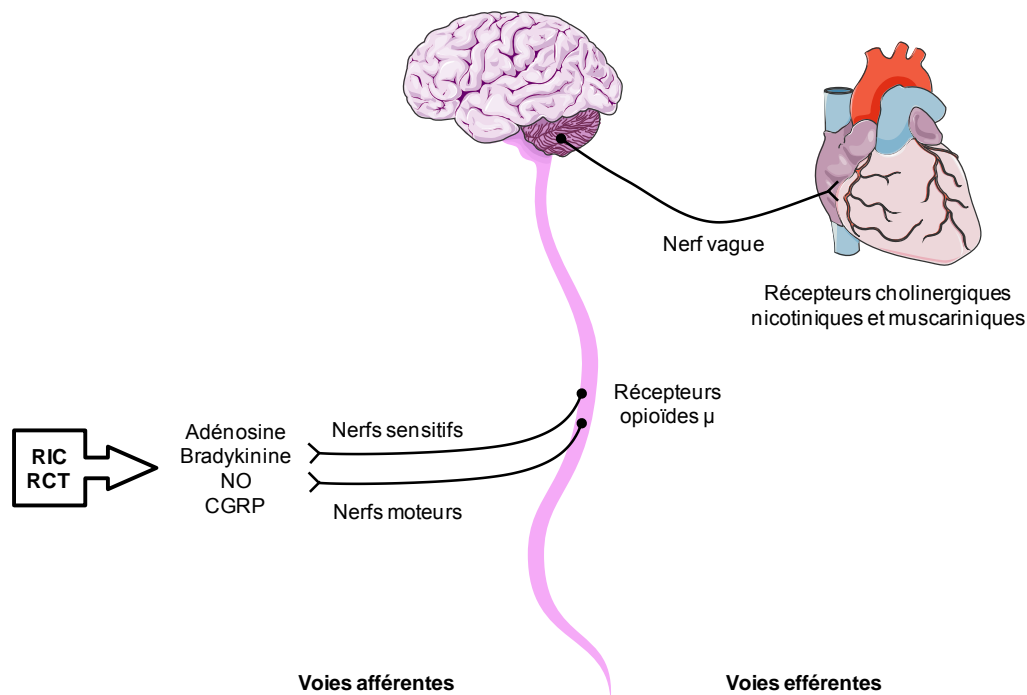


Figure 5. La voie neuronale. L'hypothèse de la transmission du signal cardioprotecteur par une voie neuronale met en jeu deux types de conditionnements : le conditionnement ischémique (RIC) et le conditionnement traumatique (RCT) à distance. Ils sont tous les deux capables de provoquer, au niveau périphérique, la libération de médiateurs qui vont activer des voies nerveuses périphériques. Ces voies afférentes passent par des nerfs sensitifs ou moteurs, dépendamment du type de conditionnement utilisé et de l'organe conditionné. Le signal semble ensuite pris en charge au niveau de la moelle épinière par l'intermédiaire des récepteurs μ aux opioïdes. Il est finalement véhiculé jusqu'au cœur par des voies efférentes, et en particulier par le système neurovégétatif parasympathique du cœur, c'est-à-dire le nerf vague. Cette transmission de l'information passe par les récepteurs cholinergiques nicotiques et muscariniques.

Ces preuves du concept de la cardioprotection à distance par des facteurs humoraux furent de nouveau étayées par une étude en 2005, montrant que la dénervation d'un cœur n'empêchait pas d'obtenir un effet cardioprotecteur par le RIPreC. Dans ce modèle, le cœur d'un porc non traité était transplanté à un autre animal, et était donc privé d'innervation. La réalisation d'un RIPreC, par 4 cycles de 5 min d'ischémie de patte-5 min de reperfusion, était capable de réduire de 57% la taille de l'infarctus, ce qui excluait l'hypothèse neuronale d'une voie efférente jusqu'au cœur, notamment par le nerf vague [83].

2.2. Taille et propriétés physicochimiques

Le débat sur la nature et la taille des facteurs humoraux mis en jeu n'est pas encore tout à fait tranché. Différentes études ont été menées pour pouvoir répondre à cette question.

La 1^{ère} étude est celle de Lang *et al.* qui ont utilisé une méthode protéomique pour identifier des facteurs circulants de l'IPreC et du RIPreC mais sans succès. Comme le seuil de détection de leur technique protéomique était de 8 kDa, ils en ont conclu que la cardioprotection passait soit par une voie neuronale, soit par des facteurs humoraux de taille inférieure à 8 kDa [144]. Il est néanmoins possible que la technique utilisée à l'époque ne permettait pas d'identifier toutes les protéines sanguines modifiées par l'IPreC ou le RIPreC.

En 2007, Serejo *et al.* ont utilisé une technique de filtration pour déterminer la taille des facteurs circulants. Pour cela ils ont récupéré le perfusat coronaire issu d'un cœur préconditionné selon la technique de Langendorff et l'ont dialysé à travers une membrane présentant des pores de 3.5 kDa. La fraction non dialysée, donc supérieure à 3.5 kDa a ensuite été séparée en une fraction hydrophobe et une fraction hydrophile, à l'aide d'une colonne C-18. Ils ont ensuite obtenu une cardioprotection avec la fraction hydrophobe et ont donc conclu que les facteurs circulants libérés par le conditionnement étaient de taille supérieure à 3.5 kDa et de nature hydrophobe. Ils ont également observé que cette cardioprotection était perdue lorsque le perfusat était chauffé à 70°C, à 100°C ou bien laissé 24 h à température ambiante. Cette cardioprotection était en revanche conservée lors de l'ajout d'inhibiteurs des protéases au perfusat avant de le laisser 24 h à température ambiante. Serejo *et al.* ont donc conclu que les facteurs circulants sont thermolabiles et plutôt de nature protéique [145].

Shimizu *et al.* ont également utilisé une colonne C-18 pour traiter le plasma de lapins ayant subi un RIPreC. De la même façon, la fraction hydrophile n'était pas capable de reproduire la cardioprotection, à l'inverse de la fraction hydrophobe. La dialyse du plasma au travers de pores de 15 kDa permettait d'obtenir un éluat cardioprotecteur, permettant ainsi de conclure à des facteurs circulants du RIPreC de nature hydrophobe et <15 kDa [146].

Il existe des limites dans ces deux dernières études. En effet Serejo *et al.* et Shimizu *et al.* n'ont pas testé réciproquement l'effet du dialysat <3.5 kDa et >15 kDa sur la cardioprotection. Ils n'ont également pas testé l'effet cardioprotecteur de la fraction hydrophile non dialysée. Il est donc possible qu'ils soient passés à côté de facteurs circulants d'une nature et d'une taille différente de ceux qu'ils ont décrits.

L'étude de Breivik *et al.* est venue apporter des précisions quand à ces limites. En effet, contrairement aux études précédentes, Breivik *et al.* ont traité l'effluent coronaire issu d'un IPRc, par une colonne C-18, avant de le dialyser. Ils ont ainsi montré que peu importe la taille des molécules protectrices, seule la fraction hydrophobe était capable d'induire la cardioprotection. Ils ont donc apporté une donnée nouvelle sur les facteurs circulants en concluant qu'ils sont nécessairement de nature hydrophobe et que cette fraction est cardioprotectrice qu'elle soit injectée en pré, en per ou en postconditionnement. Ensuite, Breivik *et al.* ont réalisé différentes dialyses de cette fraction hydrophobe en utilisant une membrane à 10 kDa et une membrane à 30 kDa. Ils ont ainsi montré que les fractions <10 kDa, >10 kDa et <30 kDa étaient capables d'induire la cardioprotection, mais pas celle >30 kDa [94].

L'ensemble des études ayant investigué la nature de ces facteurs s'accorde donc sur un point : la nature hydrophobe des facteurs circulants.

Concernant la taille des molécules impliquées, il existe encore des zones d'ombre. Breivik *et al.*, en fractionnant leur portion hydrophobe, ont clairement décrit qu'il existe plusieurs facteurs circulants, certains <10 kDa et d'autres entre 10 et 30 kDa. Si on recoupe cette étude avec celles de Serejo *et al.* et Shimizu *et al.*, qui montrent respectivement des facteurs protecteurs >3.5 kDa et <15 kDa, alors il est possible qu'il existe des facteurs compris entre 3.5 et 10 kDa et/ou entre 10 et 15 kDa et/ou entre 15 et 30 kDa. De plus, dans leur étude, Serejo *et al.* ont exclu la participation de facteurs <3.5 kDa tels que l'adénosine (267 Da), la bradykinine (1060 Da) ou les opioïdes (500-800 Da) dans la cardioprotection induite par leur fraction hydrophobe. Il n'en reste pas moins qu'ils n'ont pas testé l'effet cardioprotecteur de leur dialysat <3.5 kDa. Il est donc possible que des facteurs inférieurs à ce seuil puissent malgré tout induire la cardioprotection.

La nature des facteurs circulants n'est aujourd'hui pas clairement établie mais Serejo *et al.* ont statué clairement pour une nature protéique de ces molécules.

Actuellement il n'y a donc pas de réel consensus quant à la nature et taille des facteurs circulants du RIC. Ce que montre l'étude de Breivik *et al.*, c'est que la cardioprotection à distance est le fait d'un ensemble de molécules et non d'une seule. Celles-ci sont peut être même dépendantes de la nature du conditionnement à distance ou encore de l'organe à distance auquel il est appliqué.

L'amélioration des techniques de purification et d'identification pourrait également expliquer les différences et les incertitudes observées dans ces études. C'est notamment le cas de l'étude de Lang *et al.* qui en 2006, en utilisant une technique protéomique de *2-dimensional differential in-gel electrophoresis* (DIGE-2D) / *matrix assisted laser desorption and ionisation - time of flight - mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) et *liquid chromatography - mass spectrometry / mass spectrometry* (LC-MS/MS), n'avait pas réussi à identifier des facteurs circulants >8 kDa. Les progrès de ces méthodes dans les dernières années ont permis à Hepponstall *et al.* de récemment étudier, par ces mêmes techniques protéomiques, le protéome de patients volontaires sains ayant subis un RPreC. Ils ont cette fois démontré une forte modification de l'expression protéique dans les plasmas avec pas moins de 51 protéines modulées. Parmi ces protéines identifiées, plusieurs correspondent aux critères de taille <30 kDa et d'hydrophobicité [147]. C'est donc la preuve que l'amélioration des techniques utilisées permet aujourd'hui d'avoir une vision différente sur les facteurs humoraux du RIC. De plus, il est probable que toutes ces études n'observent qu'une partie de la réponse humorale au RIC et qu'il existe différents facteurs circulants cardioprotecteurs de taille et de nature physicochimique différentes.

2.3. Espèces chimiques

En parallèle des études sur la taille des facteurs circulants, les années 2000 ont été marquées par de nombreux travaux visant à identifier les espèces chimiques pouvant être responsables de la cardioprotection à distance. De multiples molécules ont donc été décrites comme impliquées dans le RIC, et certaines sont aujourd'hui bien documentées.

2.3.1. Opiïdes

La famille des opioïdes est constituée de plusieurs types de peptides (enképhalines, endorphines et dynorphines) ainsi que de plusieurs types de récepteurs (δ , κ , μ). Ces molécules sont présentes dans le système nerveux central et jouent un rôle de neuromodulation et neurotransmission, mais sont aussi présentes dans les régions neuromusculaires du cœur, de l'intestin ou encore des muscles squelettiques. Cette famille de molécules, déjà décrite dans l'hypothèse neuronale, a également fait l'objet de plusieurs travaux évoquant une transmission humorale du RIC.

Dickson *et al.* ont décrit en 2001 que l'effluent coronaire, issu d'un cœur préconditionné par un IPreC, pouvait induire une cardioprotection sur un cœur contrôle. Cet effet bénéfique pouvait être aboli par la naloxone, un antagoniste non spécifique des récepteurs aux opioïdes, alors que l'effet protecteur de l'IPreC n'était pas inhibé [148]. C'est donc la première mise en évidence que, contrairement au conditionnement local, le RIC est dépendant d'un signal humoral de nature opioïde. La même équipe a ensuite démontré cet effet inhibiteur de la naloxone, sur la protection induite par l'effluent coronaire d'un cœur conditionné, au niveau de la contractilité d'une portion isolée de jéjunum [149].

In vivo, c'est Patel *et al.* qui ont décrit le rôle des opioïdes dans la voie humorale du RIC, en montrant que le RIPreC par 15 min d'ischémie mésentérique-10 min de reperfusion, n'était plus cardioprotecteur en présence de naloxone [150]. Une étude récente est venue confirmer l'effet inhibiteur de la naloxone sur le RIPreC non plus réalisé sur un animal mais chez l'homme. S'appuyant sur les connaissances que l'exercice physique est capable de protéger contre les lésions de reperfusion, Michelsen *et al.* ont utilisé le sang de volontaires sains, préconditionnés par un exercice physique, pour protéger des cœurs de lapins isolés. Cette méthode de conditionnement a permis de réduire la taille de l'infarctus dans les cœurs traités, mais pas lors de l'administration concomitante de naloxone aux cœurs isolés. La cardioprotection induite dans ce modèle par le conditionnement ischémique à distance était donc dépendante des récepteurs aux opioïdes [151].

Par la suite, les études se sont attachées à essayer d'identifier le type de récepteurs opioïdes impliqués dans le RIC. Addison *et al.* ont utilisé un cycle de conditionnement au niveau de la patte pour réduire l'infarctus et l'infiltration des neutrophiles au niveau de muscles périphériques (dorsaux, abdominaux, de la cuisse). Cet effet protecteur, perdu en présence de naloxone, l'était également en présence d'un antagoniste spécifique des récepteurs $\delta 1$ aux opioïdes, le 7-benzylidene naltrexone maleate (BNTX). L'injection du bloqueur des ganglions, l'hexaméthonium, de l'antagoniste non spécifique des récepteurs à l'adénosine, le 8-SPT, ou d'un antagoniste spécifique des récepteurs A1 à l'adénosine, le 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), n'était en revanche pas capable d'inhiber la protection musculaire [152]. Ceci validait l'hypothèse d'une transmission humorale par les opioïdes au détriment de l'hypothèse neuronale. Le BNTX fut également capable d'inhiber la cardioprotection induite par 15 min d'occlusion-10 min de reperfusion de l'aorte abdominale. A l'inverse le [D-Pen2,5] enkephaline (DPDPE), un agoniste des récepteurs $\delta 1$ aux opioïdes, a induit la cardioprotection [76]. Dans cette étude, et contrairement à celle de Dickson *et al.* en 2001, la cardioprotection induite par un IPreC était également abolie lors de l'inhibition de la voie des opioïdes, suggérant de potentielles interactions entre les conditionnements, par la voie des opioïdes.

Bien que les récepteurs $\delta 1$ soient décrits comme impliqués dans la cardioprotection induite par le RIC, Zhang *et al.* ont montré que l'utilisation de naltrindole, un antagoniste des récepteurs δ , n'a pas d'effet sur la cardioprotection induite par un RIPreC à la patte. En revanche, la nor-binaltorphimine, un antagoniste des récepteurs κ aux opioïdes, est capable d'inhiber cette protection. Le U50,488H, un agoniste des récepteurs opioïdes κ , permet également de réduire la taille de l'infarctus de façon similaire au RIPreC, de diminuer la libération de lactate déshydrogénase (LDH), et aussi de réduire l'ouverture du mPTP [84]. En 2011, dans un modèle d'ischémie cérébrale, Zhou *et al.* ont confirmé l'effet cardioprotecteur du RIPostC par une voie humorale *via* les opioïdes, puisque la protection est perdue lors de l'utilisation de naloxone, et mimée par l'ajout de morphine, un agoniste des récepteurs opioïdes [153].

L'implication des deux types de récepteurs aux opioïdes δ et κ , dans l'hypothèse humorale de la cardioprotection à distance, ne semble donc pas encore

totallement définie. Il est cependant intéressant de noter qu'à l'heure actuelle aucun travail ne semble évoquer un rôle des récepteurs μ aux opioïdes dans cette voie humorale, alors que dans l'hypothèse neuronale, ce sont ceux qui semblent impliqués, contrairement aux récepteurs δ et κ .

2.3.2. Endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes sont des molécules jouant divers rôles, à la fois neuromodulateurs et neuroprotecteurs, mais également dans le système cardiovasculaire.

En 2004, Di Filippo *et al.* ont mis en évidence que les endocannabinoïdes pouvait induire une cardioprotection dans leur modèle d'I/R myocardique *in vivo* chez la souris. L'utilisation de WIN55212-2, un agoniste des récepteurs CB1 et CB2 aux endocannabinoïdes, a en effet permis de réduire de 51% la taille de l'infarctus, de diminuer la production d'interleukine (IL)-1 β et de réduire l'infiltration leucocytaire. L'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur CB2 (AM630) inhibait la cardioprotection induite par le WIN55212-2, mais pas l'utilisation d'AM251, antagoniste spécifique du récepteur CB1 [154]. Hajrosouliha *et al.* ont ensuite confirmé cette hypothèse en l'appliquant au domaine de la cardioprotection à distance. Ils ont montré qu'un RPreC par 15 min d'ischémie de l'artère mésentérique suivi de 15 min de reperfusion était capable de diminuer la taille de l'infarctus et la durée des arythmies. La protection obtenue était perdue lors de l'utilisation d'AM630 mais pas avec l'AM251 [155].

L'implication du récepteur CB2 dans la protection cellulaire a également été démontrée au niveau du système nerveux central. Les endocannabinoïdes étant en effet très présents dans ces tissus, Viscomi *et al.* ont réalisé des ischémies cérébrales à des animaux, en présence ou non d'un agoniste des récepteurs CB2 (JWH-015). En présence de l'agoniste, une protection cellulaire était observée par la diminution de la mort neuronale et par la diminution de la libération de cytochrome C. Ces effets bénéfiques étaient ensuite perdus lorsque les animaux recevaient un antagoniste des récepteurs CB2 (SR144528) [156]. Su *et al.* ont continué à explorer l'effet protecteur des endocannabinoïdes dans le système nerveux central en réalisant un RPreC à la patte de rats pour les protéger contre une future ischémie

cérébrale. L'effet protecteur, passant par une diminution du déficit moteur ainsi qu'une augmentation du nombre de neurones normaux, était ensuite inhibé par l'utilisation d'AM251 mais pas par l'AM630. Dans ce modèle de RIC, ce sont donc les récepteurs CB1 qui semblent impliqués dans la transduction humorale du signal protecteur [157].

2.3.3. Oxyde nitrique

Une autre molécule qui semblerait impliquée dans la transmission du signal protecteur du RIC est le NO.

Les données de la littérature ne sont pas toutes en accord et certaines même ne décrivent pas cette molécule comme impliquée dans la voie humorale. C'est le cas d'un travail dans lequel un RPreC par une ischémie de l'intestin réalisé en présence d'un inhibiteur de la NOS, le *N* ω -nitro-L-arginine (L-NNA), ne permettait pas d'inhiber la cardioprotection [158]. Le même inhibiteur, utilisé dans un modèle de RPreC à la patte avant une ischémie cérébrale, n'était de nouveau pas capable de bloquer la protection tissulaire précoce à 15 min. Un inhibiteur spécifique de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), le S-methylisothiourée sulfate, permettait en revanche de bloquer la protection tardive à 48 h [159].

Dans d'autres modèles et d'autres organes, les études mettent en évidence un rôle du NO dans le RIC. C'est le cas d'un préconditionnement réalisé au niveau hépatique, qui permet de protéger les poumons, mais pas en présence de L-NAME [160]. Ce même inhibiteur, utilisé dans un modèle de préconditionnement à la patte était également capable d'inhiber la protection musculaire à l'ischémie [161]. Les travaux de Kanoria *et al.* ont aussi décrit le NO comme impliqué dans le phénomène du RIC. Dans plusieurs études, ils ont montré que le RPreC au niveau d'une patte était capable de protéger le foie contre l'ischémie. Cela se traduisait par une diminution des phénomènes délétères observés lors d'une ischémie seule, tels que l'élévation des niveaux d'aminotransférases, une réduction de la pression artérielle, du flux hépatique, de l'oxygénation périphérique et mitochondriale. Ces effets bénéfiques du RIC étaient corrélés à une augmentation du taux de NO circulant, à la fois au niveau artériel périphérique et au niveau veineux hépatique [96,162,163].

Tokuno *et al.* ont décrit que le RPreC par ischémie cérébrale était capable de diminuer l'expression de l'eNOS, d'augmenter celle d'iNOS, de diminuer la contraction et d'augmenter la relaxation d'anneaux aortiques isolés. Ils ont suggéré que l'augmentation de l'expression d'iNOS était un signe du rôle de médiateur du NO dans la cardioprotection. Il pouvait également être un effecteur final de cette protection par ses propriétés vasodilatatrices [164]. Dans une autre étude, cette même équipe a décrit le RPreC par une ischémie cérébrale, comme capable de protéger contre l'infarctus, mais pas chez des souris iNOS KO. Au niveau du myocarde, l'expression d'iNOS est restée inchangée 24 h après le RPreC. Le NO semblait donc jouer plus un rôle de cible finale de la cardioprotection [81]. Wang *et al.* ont montré que l'utilisation de deux inhibiteurs de l'iNOS, l'aminoguanidine et le S-methylisothiourée sulfate, était capable d'inhiber les effets cardioprotecteurs d'un RPreC intestinal. Alors que le NO semble impliqué dans cette cardioprotection, les auteurs n'ont pas détecté d'augmentation de l'expression d'iNOS au niveau myocardique, 24 h après le conditionnement. En revanche, 30 min après l'ischémie myocardique, l'expression d'iNOS était augmentée. Cette augmentation était bloquée par les deux inhibiteurs [165]. A l'inverse, Li *et al.* ont détecté une augmentation de l'iNOS myocardique 24 h après un RPreC [101].

La fonction précise du NO, notamment dans la cardioprotection tardive du RIC, n'est pas encore très claire et la distinction entre médiateur humoral et effecteur final reste donc encore à préciser.

2.3.4. Autres médiateurs

De nombreuses autres molécules ont fait l'objet d'études quant à leur capacité à véhiculer l'effet cardioprotecteur du RIC. C'est le cas de l'érythropoïétine (EPO) qui permet de mimer l'effet du RPreC chez des rats en insuffisance rénale, alors que celui-ci était inefficace [73]. L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs A1 à l'angiotensine permet également de bloquer la cardioprotection du RPreC [75]. L'hème oxygénase-1 présente des propriétés protectrices dans le RIC puisque son expression est augmentée dans le foie à 4 h et à 24 h après le conditionnement. Son inhibition par le Zinc protoporphyrin IX abolit cette protection [166]. Kanoria *et al.* ont aussi suggéré que l'hème oxygénase-1 jouait un rôle en association avec le NO [85]. Le facteur de réponse à l'hypoxie (HIF- α) semble également jouer un rôle dans la

réponse humorale au RIC. Habituellement dégradé par les prolyl-hydroxylases, l'inhibition de ces molécules permet de mimer la cardioprotection induite par le RIPreC. L'activation de ces prolyl-hydroxylases, ou l'inhibition de la signalisation de HIF- α passant par le *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), bloque l'effet protecteur [167]. Ce travail est cependant en désaccord avec celui publié récemment par notre laboratoire, et démontrant l'absence d'implication de HIF- α dans la cardioprotection à distance. Notre étude a eu recours à l'utilisation de souris HIF- $\alpha^{+/-}$ et à l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique du HIF- α , le cadmium. Dans ces deux modèles *in vivo*, la cardioprotection induite par le RIPreC n'était pas abolie [168].

3. La voie systémique

La voie de réponse systémique au RIC consiste en une modification de l'expression génique globale ainsi qu'en une modulation de la réponse inflammatoire. L'ensemble aboutit à l'inhibition de phénomènes de stress cellulaire et d'apoptose.

3.1. L'expression génique

Un profil génique favorable semble être induit en réponse au RIC, et pourrait médier la cardioprotection par l'inhibition ou l'activation de gènes apoptotiques/anti-apoptotiques. Konstantinov *et al.* ont été les premiers à démontrer l'influence du RIC sur la transcription. Dans leur étude, ils ont appliqué le conditionnement à des volontaires sains par des ischémies au niveau du bras, et ont observé les modifications dans l'expression des gènes au niveau des leucocytes circulants. Des protéines proinflammatoires et proapoptotiques telles que les récepteurs de type Toll 4 (*toll like receptors 4*, TLR4), le *TNF receptor superfamily, member 6* (TNFR6), le CD11b ou encore la caspase 8 voyaient leur expression réduite. En revanche, des protéines anti-inflammatoires comme la calpastatine ou l'*heat shock protein 70* (HSP70) étaient surexprimées [169]. Ces observations ont été confirmées par deux études chez l'animal montrant une modification de l'expression génique dans le cœur de souris en réponse à un RIPreC [170,171].

3.2. L'inflammation

En étroite relation avec la modulation de l'expression génique, la suppression de l'inflammation induite par le RIC joue un rôle central dans la réduction des lésions d'I/R. Le duo NF- κ B et son inhibiteur (*inhibitor of NF- κ B*, I- κ B) est un acteur majeur de cette modulation de l'inflammation. Dans le myocarde, le RIPreC induit la translocation de NF- κ B dans le noyau et provoque l'expression de molécules anti-inflammatoires. Cela permet ainsi de réduire la taille de l'infarctus. Les souris KO pour la sous-unité p105 de NF- κ B ne présentent pas de cardioprotection en réponse au RIPreC [101].

Le TNF- α , un autre marqueur de l'inflammation, est également modulé en réponse au RIC. Peralta *et al.* ont montré que l'augmentation de TNF- α , observée après une ischémie du foie, était diminuée suite au RIPreC, empêchant ainsi l'expression de la P-selectine et le recrutement des leucocytes dans les autres organes [172]. Le RIPostC appliqué au niveau de l'aorte abdominale induit également la diminution de l'inflammation dans les poumons et les reins *via* la réduction de l'expression des ROS et du TNF- α [173]. La même protection des poumons a été constatée par Harkin *et al.* ainsi que Waldow *et al.* suite au RIPreC à la patte. Ce conditionnement a réduit l'expression d'IL-6, d'IL-1 β , l'importance des œdèmes, l'infiltration leucocytaire et la phagocytose [174,175]. Wei *et al.* ont également décrit que le RIPreC à la patte était capable de diminuer la taille de l'infarctus *via* notamment la diminution de l'infiltration des macrophages et des polynucléaires neutrophiles, ainsi que l'expression de la protéine chimioattractante monocytaire (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) [88].

Chez l'homme, le RIPreC au niveau du bras induit également une réponse anti-inflammatoire au niveau circulatoire. Elle se manifeste notamment par la diminution de l'adhésion, la phagocytose et l'exocytose des leucocytes circulants [176].

Tous ces résultats suggèrent donc un rôle central de l'inflammation, et notamment par l'infiltration leucocytaire, dans les lésions d'ischémie-reperfusion. La modulation de ce phénomène par le RIC semble donc être une part essentielle dans son effet protecteur.

La transduction du signal

Comme pour le conditionnement local (*Ischemic Conditioning*, IC), de nombreuses études ont exploré les capacités protectrices du RIC, mais sans que la signalisation qui permet d'obtenir ces effets ne soit clairement élucidée.

La transduction du signal serait organisée en différentes étapes successives depuis l'organe à distance jusqu'au cœur. La première étape serait l'induction, par l'organe conditionné, d'un message protecteur. Comme décrit précédemment, plusieurs hypothèses (neuronale, humorale ou systémique) existent quant à la nature de ce message. La deuxième étape consisterait à l'activation, par le message protecteur, de protéines G au niveau du cœur. Ces protéines permettraient l'intégration du message et l'activation d'une signalisation intracellulaire. En réponse à ces cascades de signalisation, des effecteurs de la cardioprotection seraient à leur tour activés et permettraient de répondre au stress ischémique et ainsi de protéger le myocarde. Cette protection aurait lieu au travers de différentes régulations physicochimiques, voire même au travers de l'activation de nouvelles signalisations intracellulaires.

Toutes ces étapes concernant la transduction du signal sont à considérer avec précaution et aucune n'est démontrée avec certitude. Compte tenu des différentes hypothèses de transfert de la cardioprotection à distance, et de la multitude de médiateurs envisagés, il est très probable qu'il existe plusieurs cascades de signalisation et plusieurs effecteurs finaux induits par le RIC. De plus, comme il n'existe que peu d'études ayant permis d'explorer les voies de signalisation du RIC, il est possible de faire le parallèle avec celles concernant l'IC, mais sans avoir la certitude que les signaux mis en jeu sont strictement identiques.

1. Les voies RISK et SAFE

Les kinases de survie cellulaire des voies RISK et SAFE sont classiquement décrites dans le conditionnement local, et sont capables d'induire la cardioprotection au travers de l'activation de protéines anti-apoptotiques et de l'inhibition de phénomènes apoptotiques comme l'ouverture du mPTP. A l'heure actuelle, seuls quelques travaux ont étudié l'implication de ces voies de survie RISK et SAFE dans le RIC.

Dans un travail sur l'étude des facteurs circulants du RIC, Huffman *et al.* ont utilisé l'effluent coronaire d'animaux ayant subi un conditionnement local. Cet effluent coronaire, injecté à un cœur non traité, était capable d'induire une cardioprotection. Ils ont ainsi montré que ce conditionnement à distance était capable d'induire une surexpression de la protéine STAT-3 ainsi qu'une diminution de l'expression de STAT-1 et de la protéine apoptotique *Bcl-2-associated X protein* (Bax). Cette augmentation de STAT-3 était perdue en cas d'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la protéine JAK, l'AG490 [142].

D'autres protéines kinases furent décrites comme impliquées dans le RIC par Heidbreder *et al.* Dans cette étude, le RIPreC était appliqué au niveau intestinal et était comparé à l'IPreC classique. Les deux conditionnements étaient capables d'augmenter la phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 et *c-Jun N-terminal kinases 1/2* (JNK1/2). De façon surprenante cette augmentation suite au RIPreC a eu lieu non pas dans le myocarde mais dans l'intestin grêle. Il n'en reste pas moins que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces deux kinases était capable d'inhiber l'effet cardioprotecteur du RIPreC [77]. Il s'agirait donc d'une activation des voies de survie dans l'organe à distance, induisant ensuite une autre signalisation cardioprotectrice dans le myocarde. La capacité des deux types de conditionnements à activer les mêmes voies de survie a ensuite été retrouvée dans l'étude de Xin *et al.* Le RIPerC et l'IPostC augmentaient la phosphorylation d'Akt et de ERK1/2, et de manière intéressante, encore plus lorsque les deux conditionnements étaient associés. Des inhibiteurs spécifiques de la PI3K et d'ERK1/2 étaient capables d'inhiber l'effet protecteur de l'association RIPerC + IPostC, mais les auteurs n'ont pas testé l'effet des inhibiteurs seuls, sur chacun des conditionnements [177].

L'activation des mêmes voies de signalisation, par les conditionnements locaux et à distance, a également été explorée dans un travail de notre équipe. Nous avons testé l'effet de l'IPostC et du RIPerC, sur l'activation des deux voies de survie, RISK et SAFE. Démontrés comme protecteurs séparément, la cardioprotection induite par l'association des deux conditionnements était supérieure à celle obtenue avec l'IPostC seul, suggérant ainsi un effet synergique. Nous avons démontré que l'IPostC et le RIPerC activaient tous les deux à la fois la voie RISK, *via* Akt, ERK1/2, GSK-3 β , et la voie SAFE *via* STAT-3. Ces activations de la voie RISK n'étaient pas

supérieures lorsque les deux conditionnements sont associés, en revanche l'activation de STAT-3 était significativement augmentée dans le groupe RPerC + IPostC. Contrairement à l'étude de Xin *et al.* nous avons cherché à mettre en évidence un cross-talk entre les voies RISK et SAFE, pouvant expliquer l'effet synergique observé en terme de cardioprotection ou d'activation de STAT-3. L'utilisation d'un inhibiteur de la voie SAFE, l'AG490, nous a donc permis de mettre en évidence la perte totale de l'effet cardioprotecteur, liée à l'absence de phosphorylation de STAT-3. Nous avons également pu observer la perte de la phosphorylation des protéines de la voie RISK en réponse à l'AG490. Ce lien intéressant entre les deux cascades de signalisation a également été retrouvé lors de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la voie RISK. Nous avons utilisé la wortmannine, qui bloque PI3K-Akt, et le U0126 qui bloque MEK1/2-ERK1/2, et comme précédemment la cardioprotection était totalement inhibée et l'ensemble des kinases était non phosphorylé. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un lien entre les deux cascades de signalisation intracellulaire RISK et SAFE [47].

Il est maintenant clair que la signalisation de l'IC et du RIC passe par les voies de survie RISK et SAFE, et que celles-ci peuvent interagir entre elles. Il existe cependant quelques divergences quand à ces activations, notamment entre les études de Heidbreder *et al.* et Xin *et al.* En effet, les premiers n'ont pas montré de phosphorylation des kinases dans le myocarde suite au RPreC, à l'inverse des seconds. La raison qui pourrait expliquer ces différences peut être le fait que les deux RPreC ne sont pas appliqués aux mêmes organes à distance, en l'occurrence respectivement l'intestin et la patte. Il est également possible que pour un même organe conditionné, selon que les cycles soient appliqués en pré, en per ou en post-conditionnement, l'influence sur la cascade de signalisation mise en jeu ne soit pas identique. Hausenloy *et al.* ont en effet montré que pour un même organe conditionné, à savoir la patte, le RPreC et le RPerC ne partagent pas la même signalisation. Ces deux méthodes sont capables de réduire la taille de l'infarctus mais seul le RPreC est sensible à un inhibiteur de PI3K-Akt [178]. Il est donc possible qu'il existe le même type de différence de signalisation entre un RPreC à la patte ou à l'intestin.

2. Les canaux potassiques mitochondriaux ATP dépendants

Un élément qui semble essentiel à la cardioprotection, et qui a fait l'objet de nombreuses études, est l'activation des canaux potassiques mitochondriaux ATP dépendants. Ces canaux ont largement été décrits comme impliqués dans la cardioprotection locale, mais également à distance. Localisés au niveau des membranes internes des mitochondries, ils permettent l'entrée de K^+ dans le compartiment interne. Ils sont inhibés par la présence d'ATP, et à l'inverse, leur ouverture peut être médiée par différentes molécules comme le NO. Durant l'ischémie, ils s'ouvrent et permettent ainsi de compenser la perte en ATP, de préserver le potentiel de membrane mitochondrial et de diminuer la surcharge calcique. Il existe des canaux de ce type également au niveau des sarcolemmes. Ces derniers ne semblent cependant pas jouer un rôle dans le RIC, puisque la protection induite par le conditionnement n'est pas perdue lors de l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, l'HMR-1098 [97,132,179].

2.1. Mise en évidence de l'effet protecteur

La mise en évidence de l'effet cardioprotecteur du RIC par l'intermédiaire de ces canaux mK_{ATP} est maintenant ancienne. En effet, dès 1998, Pell *et al.* ont décrit que le RIPreC au niveau rénal était capable d'induire la cardioprotection, en passant par un mécanisme dépendant des récepteurs à l'adénosine, mais également en mettant en évidence un rôle de ces mK_{ATP} . L'utilisation d'un inhibiteur spécifique, le 5-hydroxydecanoate (5-HD), permettait en effet d'abolir l'effet protecteur du RIPreC [74]. Cet effet inhibiteur du 5-HD a ensuite été retrouvé dans un grand nombre d'études sur le RIC [97,179,180]. Un inhibiteur non spécifique des canaux mitochondriaux, le glibenclamide (Glib), a également été utilisé pour démontrer l'implication de ces mK_{ATP} dans la cardioprotection à distance [83,87,89,97,149,179]. A l'inverse, l'utilisation d'activateurs de ces mK_{ATP} a également été une approche pour tester leur effet sur le RIC. Moses *et al.* ont réalisé un RIPreC au niveau de la patte pour protéger des muscles dorsaux de l'ischémie, et ont démontré que l'utilisation de BMS-191095, un activateur des canaux mK_{ATP} , était capable de mimer l'effet protecteur du RIPreC, et de diminuer l'infiltration leucocytaire [97]. De la même façon, Kristiansen *et al.* ont utilisé le diazoxide pour activer les canaux, et ont obtenu ainsi une cardioprotection similaire au RIPreC à la patte [179]. Dans le RCT, les

canaux mK_{ATP} semblent aussi jouer un rôle, puisqu'une étude récente de Gross *et al.* a décrit que l'utilisation de 5-HD bloque l'effet protecteur de l'incision abdominale [132].

Décrit chez l'animal, le rôle de ces canaux dans la cardioprotection a également été démontré chez l'homme. Dans la cardioprotection à distance, l'application d'un RIPreC ou d'un RIPerC au niveau d'un bras ou d'une jambe, pendant l'ischémie prolongée de l'autre bras, permet de préserver la fonction endothéliale. L'administration aux patients de Glib par voie orale permet en revanche d'inhiber la protection induite [181]. Dans le conditionnement local, le même résultat a été obtenu en appliquant un IPostC durant la première minute de reperfusion du bras ayant subi l'ischémie. L'inhibition des lésions endothéliales observées était de nouveau perdue par l'administration préalable de Glib aux patients [182].

2.2. Activation des canaux mK_{ATP}

2.2.1. La protéine kinase A et la kinase Rho

Malgré les nombreuses études mettant en évidence l'implication des mK_{ATP} dans le conditionnement local et à distance, peu d'entre elles ont réussi à expliquer comment ces canaux seraient activés. Zhao *et al.* ont donné un premier élément de réponse en décrivant que le RIPreC était capable d'inhiber la taille de l'infarctus, l'importance du *no-reflow*, d'augmenter le volume coronaire, et d'inhiber l'activation de la kinase Rho (Rho K). Cette Rho K semblait avoir un rôle néfaste pour la cardioprotection, puisque l'utilisation d'un inhibiteur spécifique était capable de mimer l'effet du RIPreC. L'hypothèse que la Rho K est un inhibiteur des mK_{ATP} a donc été confirmée par l'utilisation de Glib. Celui-ci était capable d'inhiber les effets protecteurs du RIPreC et de l'inhibiteur de la Rho K, mais sans empêcher son activation [89]. La Rho K se trouve donc en amont dans la signalisation menant aux mK_{ATP} et en conditions normales elle inhibe l'ouverture de ces canaux. Lors d'un RIPreC, cette kinase est inhibée, permettant ainsi d'activer les mK_{ATP} et d'induire la cardioprotection. Décrite dans d'autres domaines que la cardioprotection, la signalisation de la kinase Rho semble dépendante de la protéine kinase A (PKA), qui aurait un rôle inhibiteur [183,184]. L'activation de la PKA, décrite dans la

cardioprotection, serait donc responsable de cette inhibition de la kinase Rho et de l'activation des mK_{ATP} (**Figure 7**) [185-187].

2.2.2. La protéine kinase C

2.2.2.1. Utilisation d'inhibiteurs

Déjà décrite comme impliquée dans la cardioprotection induite par l'IC, la PKC- ϵ semblerait également jouer un rôle dans le RIC. Son implication a été mise en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs de cette protéine, la chelerythrine et la staurosporine, qui ont tous les deux bloqué l'effet protecteur du RIPreC au niveau intestinal ou de l'aorte abdominale [79,126,139,180]. La chelerythrine s'est même montrée efficace pour inhiber l'action de l'IPreC, démontrant bien son effet dans les deux types de conditionnement [139].

Les différentes études ayant exploré son rôle sont cependant contradictoires, et ne mettent pas en évidence les mêmes médiateurs impliqués. Dans leur étude, Wolfrum *et al.* ont utilisé l'hexaméthonium, un bloqueur des ganglions, et le Hoechst-140, un antagoniste spécifique des récepteurs B2 à la bradykinine, et ont démontré une inhibition de l'activation de la PKC- ϵ ainsi que de la cardioprotection induite par le RIPreC [126]. Ils ont donc suggéré un rôle neuronal par la bradykinine dans l'activation de la PKC- ϵ . Weinbrenner *et al.* ont contredit cette conclusion et suggèrent plutôt l'action d'un facteur humoral puisque, dans leur modèle de RIPreC au niveau de l'aorte abdominale, la cardioprotection n'était pas inhibée par l'hexaméthonium [139]. Wang *et al.* ont également confirmé que, dans leur modèle de RIPreC intestinal, l'hexaméthonium n'avait pas d'effet inhibiteur, contrairement à un bloqueur des mK_{ATP} [180]. En 2005, contrairement aux deux études précédentes, Wolfrum *et al.* ont confirmé le rôle neuronal dans l'activation de la PKC- ϵ . Ils ont montré que le RIPreC intestinal augmentait la concentration plasmatique en CGRP, mais pas en présence de chelerythrine. L'injection de ce peptide permettait de mimer la cardioprotection à distance et l'utilisation d'un antagoniste de ses récepteurs bloquait le RIPreC. L'hexaméthonium, bien qu'inhibant l'activation de la PKC- ϵ et le RIPreC, n'avait aucun effet sur la libération de CGRP par l'ischémie à distance. C'est donc que le CGRP est impliqué en amont de la PKC- ϵ et que ces deux molécules sont liées dans l'action cardioprotectrice du RIPreC (**Figure 7**) [79].

2.2.2.2. Liens avec les ROS

Comme dans l'IC, les ROS semblent jouer un rôle majeur dans l'induction de la cardioprotection à distance. La mitochondrie, et en particulier les canaux mK_{ATP} , sont à l'origine de cette production de ROS. Leur ouverture, sous l'effet du RIC, va augmenter l'entrée de K^+ dans la matrice mitochondriale, et donc induire son gonflement et son alcalinisation. Ceci a pour effet d'activer la chaîne de transport de protons, aboutissant à la production d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) puis de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Figure 7**) [188]. L' H_2O_2 ainsi produit jouerait donc un rôle de messenger de la cardioprotection. Cet effet dans le RIC a été démontré par l'utilisation de N-2-mercaptopropionyl glycine (MGP), un bloqueur de la libération de radicaux libres. Son administration *in vivo* à des rats, avant un RIPreC au niveau de l'aorte abdominale, était capable d'inhiber la production de ROS ainsi que l'effet cardioprotecteur observé [188].

Décrit par Costa *et al.*, le lien entre ROS et mK_{ATP} s'établi grâce à la PKC- ϵ , qui est présente sous 2 isoformes, PKC- ϵ_1 et PKC- ϵ_2 . Activée par le cGMP et la PKG, la PKC- ϵ_1 est responsable de l'ouverture des canaux mK_{ATP} , aboutissant ainsi à la production de ROS. Ceux-ci vont ensuite avoir un rôle de rétrocontrôle positif en activant à leur tour la PKC- ϵ_1 . Queliconi *et al.* ont démontré que l' $O_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 ont des effets activateurs sur les canaux mK_{ATP} , mais également les dérivés nitrés [189]. Ces résultats sont concordants avec l'hypothèse que le NO activerait le cGMP, responsable à son tour de l'activation de la PKG, et donc de la PKC- ϵ_1 (**Figure 7**).

2.2.2.3. Les connexines-43

Les connexines sont des protéines transmembranaires formant des jonctions communicantes entre les cellules. La connexine-43 (Cx-43) est très présente dans les cellules cardiaques et son implication dans la signalisation de la PKC a également été décrite. Rottlaender *et al.* ont décrit que la PKC induirait la phosphorylation de la Cx-43, elle-même aboutissant à l'ouverture des canaux mK_{ATP} . Cette phosphorylation de la Cx-43 serait habituellement inhibée par la protéine GSK-3 β , mais la PKC aurait un rôle d'inhibiteur de cette GSK-3 β (**Figure 7**) [190]. La GSK-3 β est en effet une protéine active sous sa forme non phosphorylée, et donc l'activation de la PKC induirait une phosphorylation inhibitrice sur cette protéine. Plus

éloignée de la PKC et des canaux mitochondriaux, la Cx-43 pourrait également jouer un rôle de cofacteur de la sous-unité G β des protéines G. L'activation de ces protéines G, décrite comme étant une voie de transduction du signal du RIC, induirait l'activation de la PI3K, d'Akt, et au final une phosphorylation de la GSK-3 β [191]. C'est cette même signalisation par PI3K et Akt qui mène à la production de NO par la NOS et donc à l'activation des mK_{ATP}.

2.3. Effets bénéfiques des mK_{ATP}

Le consensus serait donc qu'un médiateur du RIC se lierait au niveau de protéines G, induisant une cascade de signalisation passant par l'augmentation de l'activité de la PKA. La Rho kinase serait ainsi inhibée. La signalisation du RIC passerait aussi par la production de NO, l'activation des PKG, ainsi que des PKC. L'ensemble aboutirait finalement à l'ouverture des canaux mK_{ATP}. Il existe ensuite plusieurs hypothèses concernant les effets bénéfiques de cette ouverture, compte tenu des différents rôles physiologiques liés à la mitochondrie et à ces canaux potassiques. Il est probable que plusieurs de ces hypothèses soient exactes et qu'elles ne soient pas nécessairement exclusives les unes des autres.

2.3.1. Action sur la physiologie de la mitochondrie

La première action de l'ouverture des canaux mK_{ATP} passerait par une légère dépolarisation de la membrane mitochondriale, engendrant une diminution de l'accumulation de Ca²⁺ dans la matrice [192]. Une augmentation du volume de la matrice mitochondriale serait également induite par l'ouverture des canaux potassiques. Cela inhiberait ainsi la contraction de cette matrice, causée par la phosphorylation oxydative, pouvant avoir des effets délétères sur la mitochondrie [193]. Enfin, la préservation de l'intégrité de la mitochondrie, afin de limiter les pertes en ATP pendant l'ischémie, serait causée par l'ouverture des mK_{ATP}. La mitochondrie pourrait ainsi mieux répondre à la demande énergétique à la reperfusion. Elle éviterait ainsi le fonctionnement anarchique de la chaîne respiratoire lors de la reperfusion, et donc des contractions de la matrice mitochondriale [194].

Le contrôle de la production de ROS semble aussi être un rôle essentiel des canaux mK_{ATP} et de la protection induite par le RIC. Classiquement, une production

néfaste de ROS est observée durant l'ischémie [195,196] ainsi que pendant la reperfusion [197,198]. A l'inverse, une production de ROS, tels que l' $O_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 , est également retrouvée dans la cardioprotection passant par les PKC- ϵ . Il semble donc que se soit la quantité de radicaux libres produite qui soit responsable d'un effet délétère ou bénéfique. La cardioprotection à distance, comme locale, a été démontrée comme capable de bloquer cette production excessive de ROS, observée pendant l'I/R, et ce d'une façon dépendante des mK_{ATP} et de la PKC [177,197]. Les ROS ont donc des propriétés dichotomiques puisqu'ils peuvent dans une certaine mesure être responsables de lésions tissulaires par leur surproduction, mais également induire une signalisation cardioprotectrice lorsqu'ils sont produits par l'ouverture des canaux potassiques mitochondriaux.

3. Le pore de transition de perméabilité mitochondrial

3.1. Physiopathologie du canal

L'ouverture des mK_{ATP} est également en relation directe avec le mPTP. Décrit initialement par Haworth and Hunter, la structure exacte du canal est encore sujette à débat mais 3 constituants semblent être aujourd'hui identifiés [199]. Il s'agit du canal anionique voltage-dépendant (*voltage-dependent anion channel*, VDAC) [200], présent au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, de l'ATP/ADP translocase de la membrane interne (*adenine nucleotide translocase*, ANT) [201], et de la cyclophiline D (CyP-D) présente dans la matrice mitochondriale [200]. D'autres protéines, dites régulatrices, pouvant interagir avec ces 3 composants, constitueraient également le mPTP. Il s'agit notamment de l'hexokinase, de la créatine kinase, des récepteurs périphériques des benzodiazépines ou encore des protéines *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) et Bax [202] (**Figure 6**).

Ce pore est essentiel pour l'intégrité de la chaîne respiratoire mitochondriale, et ce sous sa forme fermée. Son ouverture est provoquée par différents phénomènes tels que l'accumulation de calcium, la production excessive de ROS ou encore de faibles niveaux en ATP [203]. Cela rend la membrane interne de la mitochondrie perméable à l'eau et aux solutés, faisant ainsi s'effondrer le potentiel de membrane mitochondrial. Les conséquences sont alors dramatiques pour la cellule puisque la phosphorylation oxydative s'arrête, provoquant une déplétion en ATP, un gonflement

de la matrice et pour finir la mort de la cellule par nécrose [204]. En plus de ces phénomènes physiques et énergétiques, la libération de molécules apoptotiques peut également expliquer la mort cellulaire engendrée par l'ouverture du mPTP. La membrane externe, sous l'effet du gonflement de la matrice mitochondriale, libère en effet le contenu de l'espace inter-membranaire et notamment du cytochrome C et l'*apoptosis inducing factor* [203].

Le mPTP, de part la nature des facteurs pouvant influencer son ouverture, a donc très rapidement été décrit comme responsable d'une partie des lésions d'I/R. En effet, bien qu'il soit fermé durant l'ischémie, l'accumulation de calcium ainsi que la déplétion en ATP classiquement décrites, correspondent aux facteurs pouvant induire son ouverture. A la reperfusion, la production excessive de ROS est également un mécanisme pouvant activer l'ouverture de ce pore [12]. Fermé durant l'ischémie, le mPTP s'ouvre donc dans les premières minutes de la reperfusion et provoque ainsi une partie des dommages cellulaires de l'I/R [58,204].

3.2. mPTP et cardioprotection

Le mPTP est donc une cible potentielle de cardioprotection. Les premières études ont eu recours à des agents pharmacologiques pour inhiber son ouverture, et ainsi mettre en évidence un effet protecteur contre l'infarctus. La ciclosporine-A et la sanglifehrine-A sont deux immunosuppresseurs qui se lient à la CyP-D et inhibent ainsi la formation du mPTP. Leur utilisation comme agents cardioprotecteurs s'est donc montrée efficace pour réduire la taille de l'infarctus [205,206].

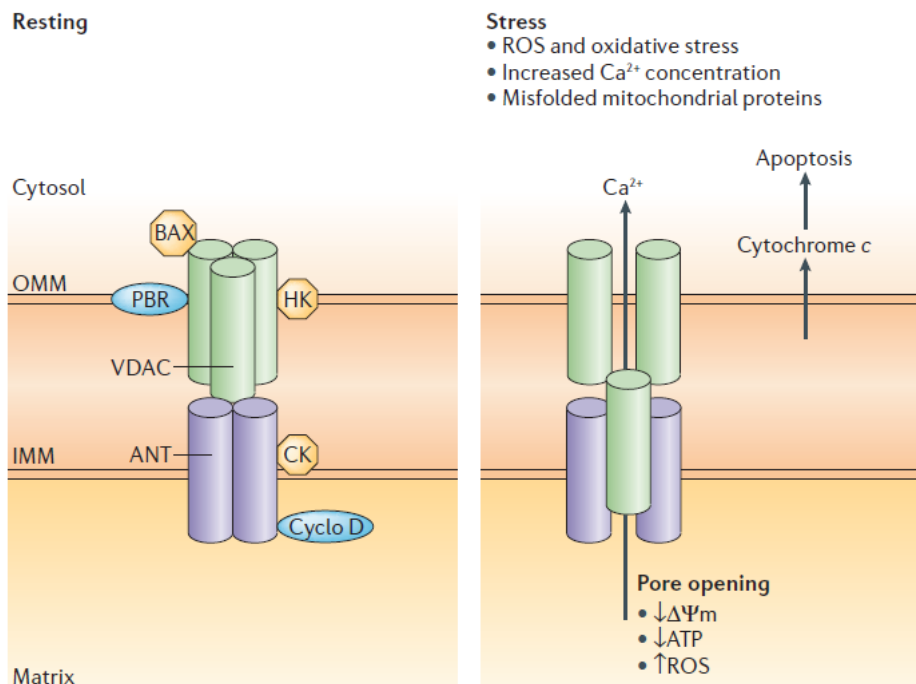


Figure 6. Schéma hypothétique de la structure du mPTP. Le mPTP est un pore liant la membrane interne (IMM) à la membrane externe (OMM) de la mitochondrie. Plusieurs molécules régulatrices sont suspectées d'intervenir dans sa constitution. Dans les conditions de stress cellulaire, comme lors d'une ischémie-reperfusion, son ouverture entraîne de nombreux phénomènes physiopathologiques aboutissant à la mort cellulaire. Abréviations : ANT, *adenine nucleotide translocase*; BAX, *Bcl-2-associated X protein*; CK, créatine kinase; Cyclo D, cyclophiline D; PBR, *peripheral benzodiazepine receptor*; ROS, espèces réactives de l'oxygène; VDAC, *voltage-dependent anion channel*; $\Delta\Psi_m$, *mitochondrial membrane potential*. Abou-Sleiman *et al.* 2006 [207].

La démonstration que la CyP-D, et donc le mPTP, sont impliqués dans les lésions d'I/R, a également été faite par l'utilisation de souris KO pour le gène de la CyP-D. Ces souris, déficientes pour cet élément du pore de transition, se sont montrées plus résistantes à l'ischémie-reperfusion [208,209]. Chez l'homme l'utilisation de ciclosporine-A, lors d'une reperfusion par PCI à la phase aiguë d'infarctus, a permis de réduire de façon significative le taux de créatinine kinase ainsi que la masse de tissu infarcté, mettant ainsi en évidence le rôle essentiel du mPTP dans les dommages liés à l'infarctus [210].

La démonstration que le RIC pouvait inhiber l'ouverture du mPTP a été réalisée par Zhang *et al.* Appliqué au niveau de la patte, le RPreC s'est montré cardioprotecteur mais l'utilisation d'atractyloside, un activateur de l'ouverture du mPTP, inhibait cette protection. Ce même agent, sur des cardiomyocytes en culture,

était capable de bloquer la diminution de l'ouverture du mPTP, produite par un agoniste des récepteurs opioïdes κ [84].

Le lien entre mK_{ATP} , mPTP et cardioprotection s'établit par la PKC- ϵ et les ROS. On sait que l'ouverture des canaux mK_{ATP} va induire la production de ROS, aboutissant à un rétrocontrôle positif sur l'ouverture de ces mêmes canaux, *via* la PKC- ϵ_1 (**Figure 7**). En parallèle, la PKC- ϵ_2 est également contrôlée par la production de ROS mais cette fois-ci avec un effet inhibiteur sur l'ouverture du pore de transition mitochondrial (**Figure 7**) [57,188]. L'inhibition de l'ouverture du mPTP est ainsi retrouvée *via* des activateurs des mK_{ATP} , tel que le diazoxide. Le NO, activateur de la PKC- ϵ_1 *via* la PKG, a également un effet inhibiteur sur cette ouverture du mPTP [211]. Pour finir, l'ajout d'un bloqueur de la libération de radicaux libres empêche le blocage du pore et démontre donc le rôle essentiel des ROS dans cette signalisation cardioprotectrice [57].

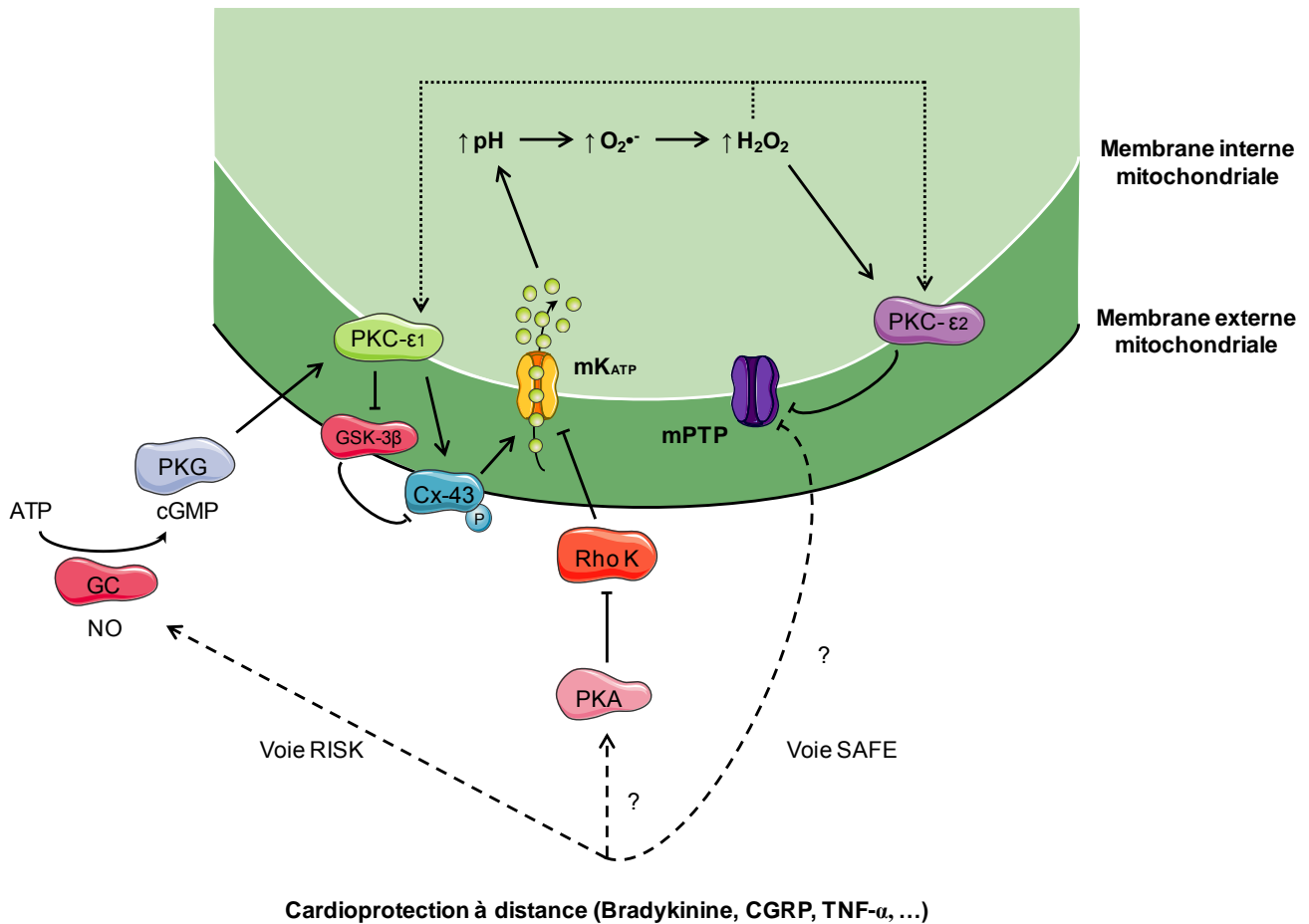


Figure 7. Voies effectrices finales au niveau de la mitochondrie. La cardioprotection à distance permet d'empêcher l'ouverture du mPTP lors de la reperfusion myocardique. La voie RISK, au travers de l'activation de la PKG, active la PKC- ϵ_1 , capable à son tour d'inhiber la GSK-3 β . La connexine-43 (Cx-43) peut alors être phosphorylée par la PKC- ϵ_1 et provoquer l'ouverture du mK_{ATP}. Par un mécanisme encore inconnu, la PKA peut également être activée par la cardioprotection à distance. Elle inhibe alors la Rho K, levant ainsi l'inhibition de l'ouverture du mK_{ATP}. L'entrée d'ions K⁺ induit l'augmentation du pH intramitochondrial, responsable de la production de ROS, et en particulier d'H₂O₂. La PKC- ϵ_2 est alors activée. Elle permet d'inhiber l'ouverture du mPTP, et induit ainsi la cardioprotection contre les lésions d'ischémie-reperfusion. La voie SAFE peut elle aussi intervenir dans l'inhibition du mPTP mais les mécanismes impliqués sont encore mal connus. *Adaptée de Costa et al. 2008 [212].*

Chapitre 2. L'apolipoprotéine A-I et la cardioprotection

Métabolisme de l'ApoA-I et des High Density Lipoproteins

1. Les Apolipoprotéines

1.1. Généralités

Les éléments lipidiques tels que le cholestérol (C), les phospholipides (PL) ou les triglycérides (TG) sont insolubles en milieu aqueux et vont donc se lier dans le sérum à des protéines appelées apolipoprotéines (Apo). Celles-ci vont ainsi permettre la prise en charge et le transport de ces molécules hydrophobes dans le sang.

Il s'agit d'une famille constituée d'une vingtaine de membres, avec des structures, des séquences et des fonctions relativement proches, de par leur origine génétique commune [213]. Il existe néanmoins des différences entre toutes les Apo, permettant de les diviser en différentes classes et sous classes [214].

L'association des lipides plasmatiques aux Apo permet la formation et la stabilisation des lipoprotéines (**Figure 8**). Chacune d'elles possède un profil en Apo caractéristique. Il varie par la nature et la quantité de la ou des Apo présentes au sein de cette lipoprotéine. Ce sont les Apo qui vont être responsables du devenir métabolique spécifique de chaque type de lipoprotéine [215].

1.2. L'apolipoprotéine A-I

1.2.1. Structure

Le groupe des ApoA est constitué de 5 protéines différentes, et l'apolipoprotéine A-I (ApoA-I) est la plus abondante. Son gène est situé sur le locus 11q23, regroupé en tandem avec les gènes codants pour les apolipoprotéines C-III et A-IV [216].

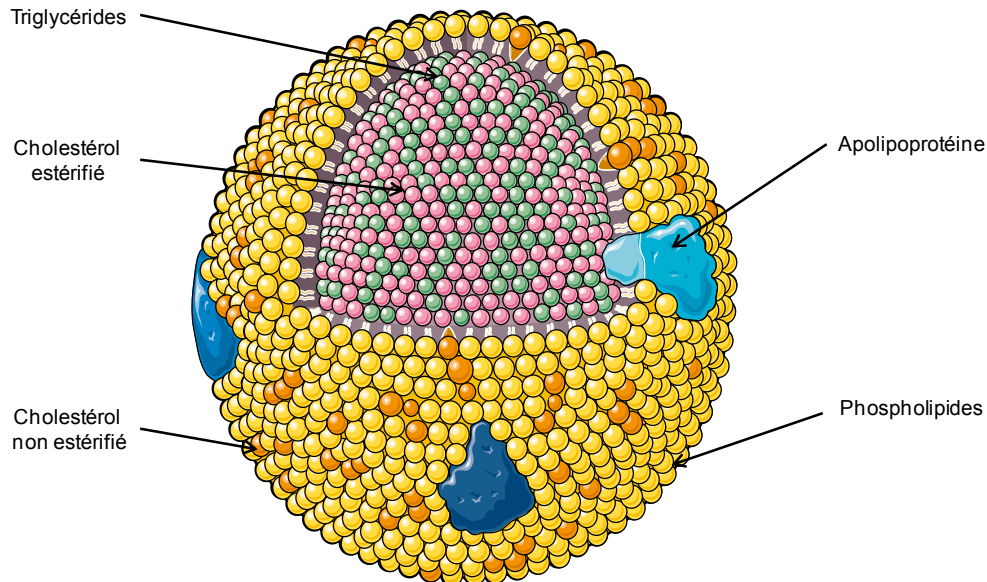


Figure 8. Représentation schématique d'une lipoprotéine.

Synthétisée par le foie et l'intestin, l'ApoA-I est une protéine de 28 kDa, formée d'une simple chaîne polypeptidique de 243 acides aminés [217]. Elle comporte au sein de cette séquence 10 répétitions en tandem de 11 ou 22 résidus, qui vont induire la formation de 10 hélices α (**Figure 9A**). Ces structures s'organisent en fer à cheval et possèdent une face hydrophobe, à l'origine de la forte affinité de l'ApoA-I pour les phospholipides des *high density lipoproteins* (HDL), et une face hydrophile riche en acides aminés chargés négativement [218,219].

1.2.2. Biologie clinique

La concentration plasmatique de l'ApoA-I varie d'un individu à l'autre, en fonction de l'âge et du sexe, mais sa mesure seule ne présente que peu d'intérêt. Par conséquent, elle est souvent associée à celle de l'ApoB, et le rapport entre ces deux concentrations est un bon indicateur de l'état du métabolisme lipidique. Ces deux Apo ont en effet une demi-vie longue dans le sang et varient peu à la suite d'un apport alimentaire léger, leur mesure est donc plus fiable que celle de marqueurs comme le C ou les TG [220].

En routine clinique, ces deux protéines sont dosées par des méthodes de turbidimétrie ou de néphélométrie, et le ratio ApoB/ApoA-I est ainsi un bon index du

processus de transport du C et des lipides dans le sang. Les ApoB constituant principalement les *low density lipoproteins* (LDL), à l'origine de la formation de plaques d'athérome, et les ApoA-I étant associées aux HDL, et donc à l'élimination du C excédentaire, plus la valeur de ce rapport est haute, plus il est synonyme de dépôts de C dans les tissus et les parois artérielles. Il permet ainsi d'évaluer le risque d'athérogenèse et le risque d'un évènement cardiovasculaire [221].

Le foie étant l'organe principal à l'origine de la synthèse d'ApoA-I, les pathologies hépatiques sont fréquemment reliées à de faibles taux d'ApoA-I. C'est le cas notamment des hypertriglycéridémies, des affections hépatiques et également lors du processus de fibrose hépatique, inhérent à des complications suite à une affection hépatique [222,223]. En revanche, dans certains cas l'ApoA-I peut voir son taux plasmatique augmenter. C'est le cas dans certaines pathologies comme l'hyper- α -lipoprotéïnémie familiale ou l'hyperthyroïdie [224-226].

2. Le transport inverse du cholestérol

2.1. Synthèse des HDL

Les HDL sont une classe de lipoprotéines plasmatiques jouant un rôle de transport inverse du C, c'est-à-dire qu'elles retirent le C des membranes cellulaires et des tissus périphériques pour le ramener jusqu'au foie [227-229]. Ces molécules, de petite taille mais de forte densité, subissent différentes modifications dans leur composition au cours du temps, et en fonction de leur contenu en lipides et en Apo. Les ApoA-I constituant la fraction protéique majoritaire des HDL, elles sont essentielles pour la régulation de la taille et de la distribution de ces HDL [230,231]. Classiquement, les HDL sont décrites comme ayant une géométrie discoïdale, structurée par deux molécules d'ApoA-I disposées de façon antiparallèle. Ces deux molécules d'ApoA-I viennent ceinturer la bicouche lipidique et ainsi stabiliser et conformer les HDL (**Figure 9B**) [229,232,233].

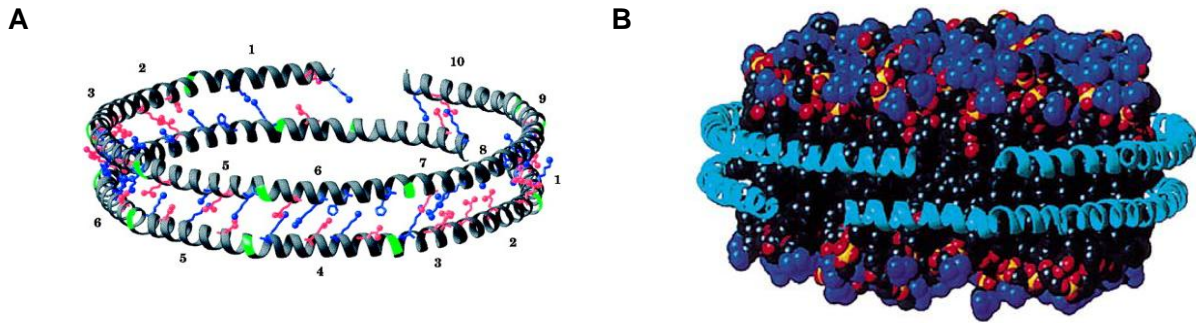


Figure 9. Organisation de l'ApoA-I au niveau des HDL. **A.** Deux molécules d'ApoA-I, comprenant chacune 10 hélices α , s'organisent l'une au-dessus de l'autre, de façon antiparallèle. *Saito et al. 2004.* **B.** Elles entourent une bicouche de phospholipides et forment ainsi des HDL discoïdales. *Segrest et al. 2000 [234].*

Deux organes principaux sont à l'origine de la synthèse des HDL, appelées initialement pré β -HDL. Il y a principalement le foie qui synthétise l'ApoA-I et qui libère ensuite cette protéine associée à des PL dans le plasma. Il y a également l'intestin, qui libère des chylomicrons, constitués d'ApoA-I, de PL et de C non-estérifié, dont la dégradation va aboutir à la formation des pré β -HDL (**Figure 10**) [235].

2.2. Devenir des HDL circulantes

Les pré β -HDL formées migrent ensuite dans la circulation sanguine jusqu'aux tissus périphériques, où elles vont permettre le transport inverse du C. Le chargement des pré β -HDL en C s'effectue en grande majorité par des phénomènes actifs, médiés par des récepteurs spécifiques qui seront décrits plus tard. Les HDL ainsi chargées en C sont dites HDL₃ [236].

Une enzyme essentielle va ensuite intervenir dans le métabolisme du C, à savoir la *lecithine cholesterol acyl transferase* (LCAT), synthétisée par le foie et associée aux HDL. Cette protéine, dont l'ApoA-I est le cofacteur, va permettre d'estérifier le C, de le stocker au centre de la particule d'HDL et ainsi de modifier sa conformation [230,237]. Les HDL₃ passent en effet d'une forme discoïdale à une forme sphérique, s'enrichissant de plus en plus en esters de cholestérol (EC). La taille de la particule augmente, et sa densité diminue, jusqu'à aboutir à la formation d'HDL₂, riches en EC au cœur de la particule (**Figure 10**) [238].

Il existe ensuite deux possibilités quant à l'avenir des ces HDL₂ dans la circulation sanguine. Première possibilité, elles peuvent ne subir aucune modification et être directement prises en charge par le foie ou un tissu stéroïdogénique pour recycler leur C. Deuxième possibilité, elles entrent en contact avec des lipoprotéines plus légères comme les chylomicrons ou les lipoprotéines de très faible densité (*very low density lipoproteins*, VLDL). Via l'activation de la *cholesterol ester transfer protein* (CETP) les HDL₂ vont ainsi échanger les EC contre des TG [239,240]. Le C échangé est alors pris en charge, sur ces lipoprotéines de faible densité, par l'ApoB-100 et les TG obtenus en échange des EC sont hydrolysés par la lipase hépatique (*hepatic lipase*, HL) [241]. Les HDL₂ vont ainsi perdre en diamètre, mais gagner en densité, pour redevenir des HDL₃ qui sont de nouveau capables de se charger en C au niveau périphérique et de réintégrer le cycle d'élimination du C (**Figure 10**) [236].

Les HDL₃ peuvent également subir une autre étape de remodelage, consistant à fusionner 2 particules de HDL₃ pour donner une HDL₂ et des préβ-HDL. Cette fusion est contrôlée par l'action de la *phospholipid transfer protein* (PLTP), aussi activée par l'ApoA-I. Cette protéine permet également le passage des PL des VLDL aux HDL [242,243].

2.3. Dégradation des HDL

Le métabolisme des HDL est donc un circuit complexe, faisant intervenir de nombreux partenaires enzymatiques. *In fine*, l'excédant de C périphérique, stocké sous forme d'EC au centre des HDL, est soit éliminé au niveau hépatique, soit métabolisé sous forme d'hormones stéroïdiennes dans un tissu stéroïdogénique. Cette élimination requiert une liaison sélective entre l'HDL et un récepteur spécifique, nommé *scavenger receptor class B type I* (SR-BI), situé sur les membranes des cellules cibles au niveau des cavéoles [244]. Les EC diffuseraient ainsi à l'intérieur de la cellule sans qu'il n'y ait endocytose de l'HDL [245]. Celle-ci est ensuite remise en circulation pour recommencer un nouveau cycle de transport inverse du C [246]. Le rein serait également capable de lier l'ApoA-I des HDL. Cette liaison se fait au travers d'une internalisation complète de la particule grâce à un récepteur à l'ApoA-I appelé cubiline. Cette ApoA-I est ensuite dégradée et éliminée par les cellules du tube contourné proximal [247].

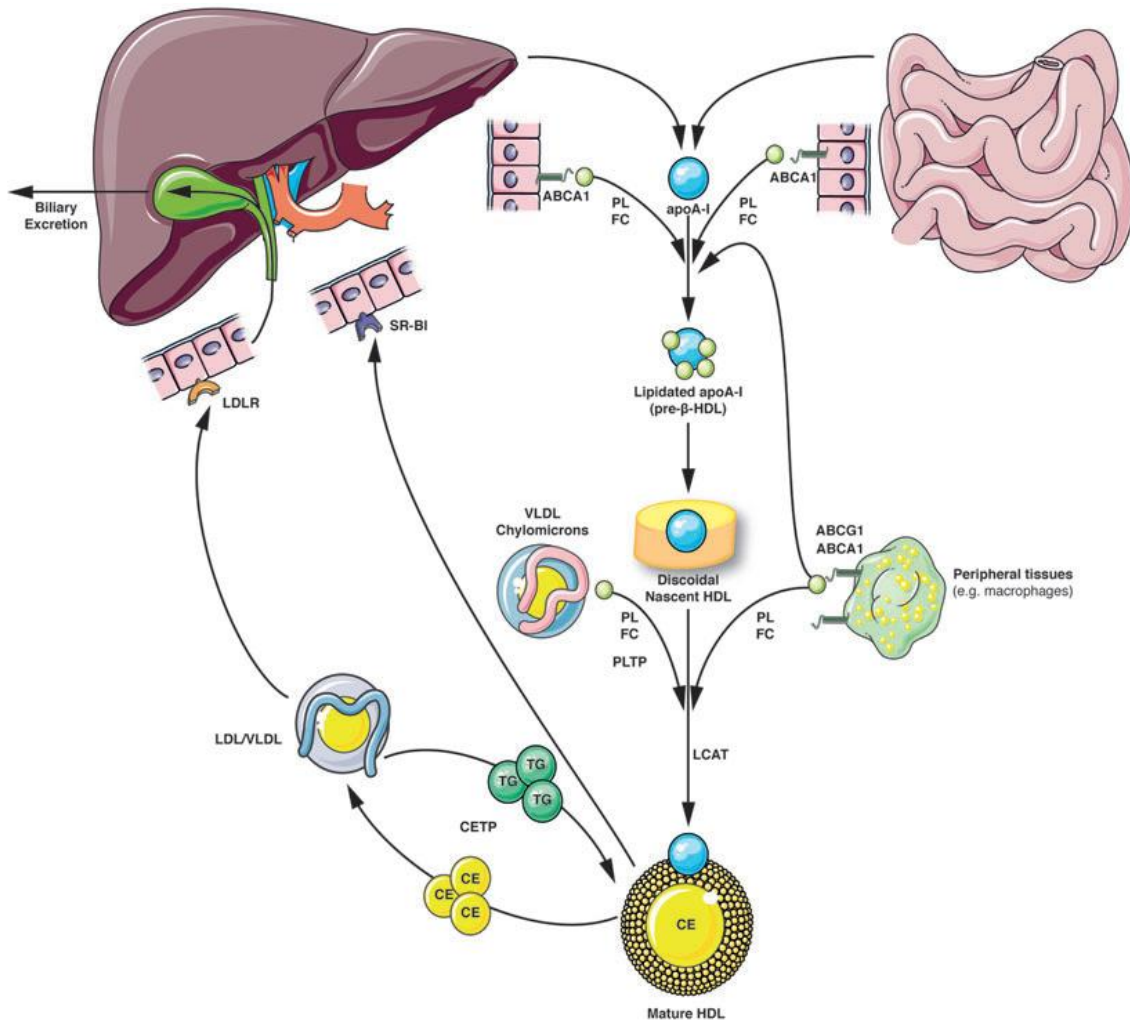


Figure 10. Le métabolisme des HDL et du cholestérol. Les HDL et l'ApoA-I, sécrétées majoritairement par le foie sous forme de préβ-HDL immatures, ont un rôle central dans le transport inverse du cholestérol (FC). Au niveau périphérique, elles vont capter et éliminer le cholestérol des cellules et des tissus puis l'estérifier *via* la LCAT, pour devenir des HDL matures. Ces HDL matures peuvent ensuite être éliminées par le foie, le rein, ou des tissus producteurs d'hormones, en se fixant au niveau des récepteurs SR-BI. Elles peuvent également subir une étape de remodelage, en entrant en contact avec des VLDL/LDL. L'action de la CETP et de la PLTP va réciproquement permettre d'échanger le cholestérol estérifié (CE) contre des triglycérides et des phospholipides (PL). Les triglycérides (TG) captés sont ensuite hydrolysés par la HL. Les HDL redeviennent alors des HDL immatures, capables de recommencer un cycle d'élimination du cholestérol périphérique. Abréviations : ABC, *ATP binding cassette*; ApoA-I, apolipoprotéine A-I; CETP, *cholesterol ester transfer protein* ; LCAT, *lecithine cholesterol acyl transferase*; LDLR, *LDL receptor*; PLTP, *phospholipid transfer protein*; SR-BI, *scavenger receptor class B type I*. Speer et al. 2013 [248].

3. Les récepteurs de l'ApoA-I et des HDL

3.1. Le transporteur ATP Binding Casette A1

Les transporteurs *ATP binding cassette A1* (ABCA1) sont des protéines transmembranaires présentes au niveau du cerveau, du rein, du foie ou encore de l'intestin [249]. Ils permettent le passage de nombreuses molécules, et en particulier du C, au travers de la membrane plasmique. Ce sont ces transporteurs qui sont en partie responsables du transfert du C et des PL cellulaires vers les HDL lors du transport inverse du C [250].

La liaison entre l'ABCA1 et les HDL s'effectue au niveau extracellulaire, mais le motif intracellulaire du transporteur est essentiel dans la fixation de l'ApoA-I [251]. Présent au niveau des cavéoles sur la membrane plasmique, l'ABCA1 est également à l'origine de la formation de pré β -HDL en captant l'ApoA-I et en lui transférant des PL (**Figure 11**) [252-254]. L'ABCA1 est également présent au niveau des macrophages, où il joue un rôle d'élimination de l'excès de cholestérol cytoplasmique présent sous forme de cristaux [255]. Tous ces échanges sont des processus actifs qui nécessitent de l'énergie, apportée sous forme d'ATP.

L'expression de ce transporteur est fortement dépendant de l'ApoA-I puisque la liaison de cette molécule à sa surface inhibe sa dégradation par le protéasome, augmente sa phosphorylation par la PKC, ce qui stabilise son expression à la membrane, et augmente sa capacité d'efflux des lipides [256,257].

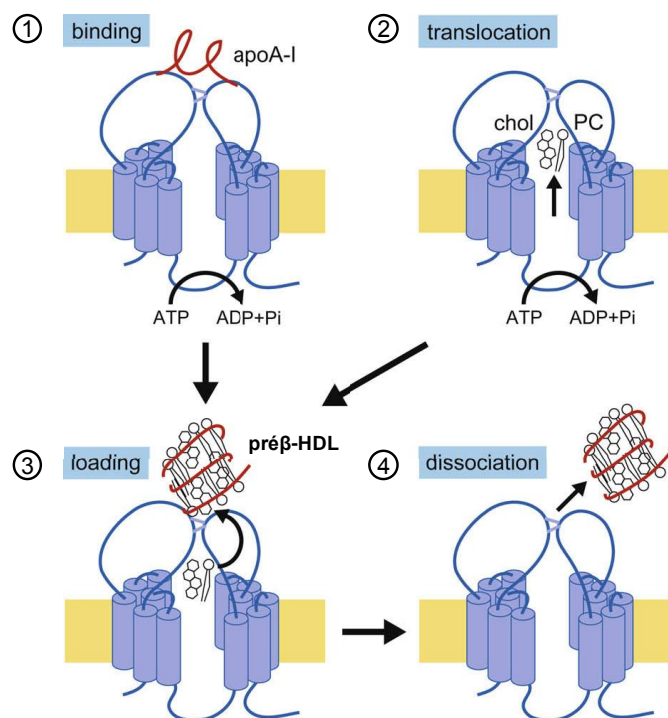


Figure 11. Le récepteur ABCA1. Différentes étapes modulent la liaison de l'ApoA-I au récepteur ABCA1, et la formation de pré β -HDL. De l'ApoA-I libre va se fixer au niveau des domaines extracellulaires du récepteur ①. Du cholestérol (chol) et des phospholipides (PC) vont également être transférés au niveau du récepteur ②. Ces deux étapes sont indépendantes et nécessitent toutes les deux de l'ATP. L'ApoA-I libre et les lipides vont alors fusionner pour former des pré β -HDL ③. Cette fusion induit un changement de conformation de l'ApoA-I, permettant la dissociation des pré β -HDL du récepteur ABCA1 ④. *Adaptée de Nagao et al. 2010 [258].*

3.2. Le récepteur SR-BI

Le récepteur SR-BI est une protéine avec une structure en fer à cheval, localisée au niveau des cavéoles, et avec ses extrémités N et C-terminales intracytoplasmiques [259,260]. Il a pour rôle de favoriser l'efflux du C et de récupérer les EC des HDL [261]. Pour cela le récepteur SR-BI est capable de lier les HDL, et préférentiellement les HDL chargées en EC (**Figure 12**). Cette liaison est décrite comme fortement dépendante de la conformation et de l'organisation de l'ApoA-I au niveau des HDL [262]. Elle induit la formation d'un canal hydrophobe permettant le passage des molécules lipidiques selon le gradient de concentration. Ainsi au niveau des macrophages, riches en EC, les HDL vont se charger, alors qu'au niveau de tissus hépatiques ou stéroïdiques, demandeurs en C, les HDL vont libérer leur contenu [263,264].

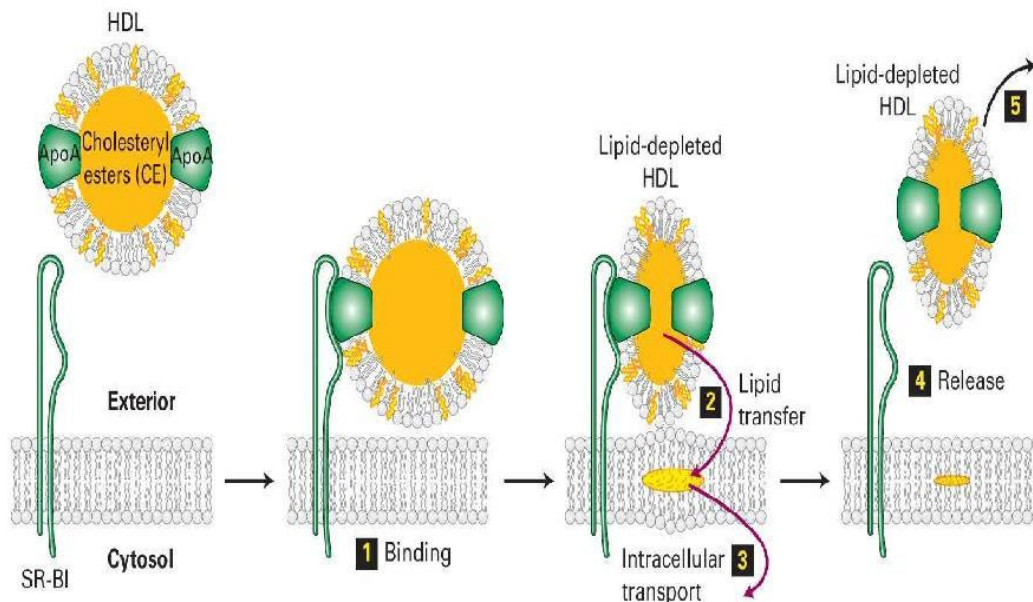


Figure 12. Le récepteur SR-BI. Ce récepteur est capable de se lier aux HDL, *via* l'ApoA-I, et de contrôler le transfert des EC. Au niveau du foie, SR-BI favorise le transport inverse du cholestérol en permettant l'efflux des EC vers les hépatocytes, sans internaliser la particule d'HDL. Au niveau périphérique, SR-BI permet de charger les HDL en récupérant l'excès d'EC des membranes des cellules (cellules endothéliales, macrophages, etc.). « *Les Lipoprotéines* », Dr. Chikouche, <http://share.pdfonline.com>.

3.3. Les récepteurs à la sphingosine-1-phosphate

La sphingosine-1-phosphate (S1P) est une molécule lipidique, obtenue par l'addition d'un groupement phosphate sur une sphingosine, *via* les sphingosine kinases [265]. Les sources principales de S1P dans le plasma sont les érythrocytes [266], les plaquettes [267] et les cellules endothéliales [268]. Cette S1P est véhiculée en grande partie dans le plasma par les HDL [269,270]. La S1P est impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques, grâce à la variété de récepteurs existants pour cette molécule [271,272]. En effet, la S1P peut se lier à 5 récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, appelés S1P₁ à S1P₅, et présentant chacun des fonctions et des signalisations différentes (**Figure 13**) [272-274]. De nombreux rôles liés à la liaison de cette S1P sur ses récepteurs sont donc attribués aux HDL [275].

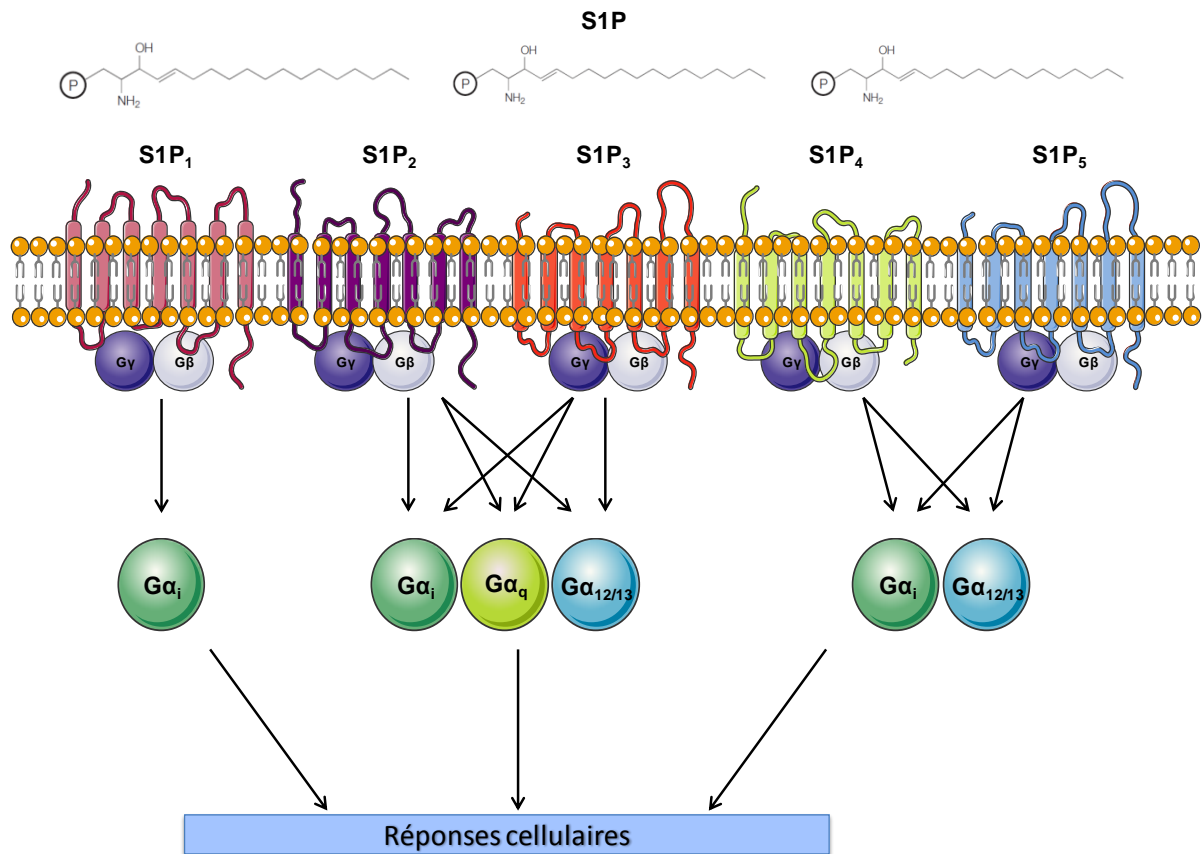


Figure 13. Les récepteurs à la S1P. Les réponses cellulaires engendrées par la liaison de la S1P sur ses récepteurs dépendent du type de récepteur impliqué ainsi que de la sous-unité G α activée. L'existence de 5 récepteurs différents (S1P₁ à S1P₅), et de la variété de protéines G couplées, explique les nombreux rôles de la S1P. *Adaptée de Spiegel and Milstien. 2003 [272].*

4. Mutations dans le métabolisme de l'ApoA-I

Comme décrit précédemment, l'ApoA-I joue un rôle crucial dans le métabolisme du C, puisqu'elle participe à l'activité de nombreuses enzymes essentielles. Pour preuve, des mutations au niveau de ses récepteurs, comme l'ABCA1 [276], le SR-BI [277,278], les récepteurs S1P [279,280], ou bien au niveau de ses partenaires, comme la LCAT [281,282], ont des effets néfastes sur la physiologie des HDL.

Il existe également à ce jour une cinquantaine de mutations connues au niveau du gène de l'ApoA-I lui-même. Elles sont habituellement séparées en 3 groupes (**Figure 14**) :

- Les mutations associées avec des amyloïdoses héréditaires. Localisées au niveau de la partie N-terminale de la séquence peptidique, la plupart de ces mutations sont associées avec un faible niveau en HDL circulantes [283]. La mutation ApoA-I Iowa fut la première mutation à amyloïdose héréditaire décrite. Elle est causée par la substitution d'une glycine par une arginine au niveau du fragment N-terminal de la protéine. Cela engendre une rapide clairance de l'ApoA-I au niveau du plasma, et donc une diminution de 30 à 50% des taux d'ApoA-I et d'HDL. Chez les patients, les dépôts amyloïdes retrouvés sont majoritairement constitués de cette ApoA-I mutée, et non de transthyrétine (TTR) mutée, comme c'est le cas habituellement [284,285].

- Les mutations associées uniquement à des faibles niveaux en HDL. C'est le cas des mutations ApoA-I Milano et ApoA-I Paris [286,287], qui sont caractérisées par une substitution d'un acide aminé au profit d'une cystéine dans la séquence peptidique. Cela se traduit par une mauvaise activation de la LCAT engendrant un manque de maturation et donc un déficit en HDL [284]. Ces mutations sont pour la plupart localisées dans la partie centrale, voire pour certaines dans la partie C-terminale de la séquence peptidique. La diminution des taux d'ApoA-I et d'HDL chez ces patients est plus importante que chez les patients atteints d'amyloïdose. Dans le cas d'un allèle muté la réduction est de l'ordre de 40 à 50%, et dans le cas d'une mutation sur les deux allèles, on peut atteindre 85 à 90% de perte des taux d'ApoA-I et d'HDL [283,288].

- Il existe également de nombreuses mutations de l'ApoA-I (plus d'1/3) ne présentant ni association avec une amyloïdose héréditaire, ni avec un faible taux en HDL. Elles ne possèdent pas de localisation particulière sur la séquence peptidique de l'ApoA-I [283]. En 2011, Haase *et al.* ont décrit une nouvelle mutation se caractérisant par la substitution, en position 164 de la séquence peptidique, d'une alanine par une sérine. Cette mutation, présente dans 1 cas sur 500 dans la population étudiée, est synonyme d'une augmentation du risque de pathologie cardiaque, et en particulier d'infarctus du myocarde, ainsi que d'une réduction de 10 ans de la survie post-pathologie cardiaque. Elle ne s'accompagne cependant pas d'une réduction du taux circulant d'ApoA-I et d'HDL, contrairement à deux mutations déjà connues à savoir la V11X et la L144R, qui sont caractérisées par une diminution des taux d'ApoA-I et d'HDL mais sans augmentation du risque de pathologie cardiaque [289].

ApoA-I mutations associated with familial amyloidosis and low HDL levels

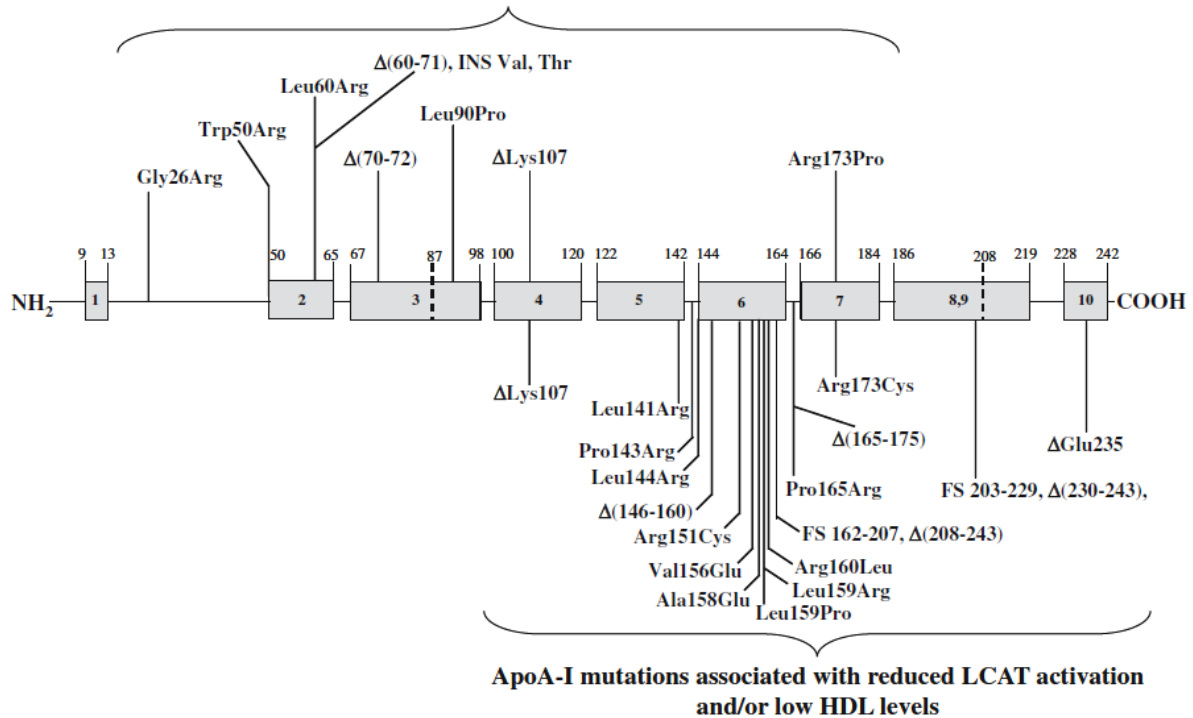


Figure 14. Les mutations naturelles de l'ApoA-I. Sont décrites classiquement 3 types de mutations naturelles sur le gène de l'ApoA-I, se caractérisant par leur localisation sur le génome ainsi que par le phénotype pathologique associé. *Zannis et al. 2006 [229]*.

Il existe donc de nombreuses pathologies liées à des mutations impliquant directement l'ApoA-I ou ses partenaires moléculaires. Ces mutations, bien que rares pour certaines, ne sont pas anecdotiques puisque par exemple l'ApoA-I Paris est décrite dans près de 10% de la population. De plus, et ce de façon surprenante, les mutations ApoA-I Milano et ApoA-I Paris ne se traduisent pas par une augmentation du risque cardiovasculaire, malgré un faible taux en HDL, mais au contraire par un effet anti-athérogénique. Cet effet inattendu peut en partie s'expliquer par la capacité de ces ApoA-I à empêcher la peroxydation des PL [290,291]. Ces mutations de l'ApoA-I ont donc notamment été étudiées, lors d'études pré-cliniques et cliniques, pour leurs propriétés anti-athéromateuses importantes. Les propriétés protectrices de ces ApoA-I, et des HDL en résultant, seront détaillées par la suite.

Les effets des ApoA-I/S1P/HDL sur le système cardiovasculaire

1. Synergie entre ApoA-I et S1P dans l'effet des HDL

Afin de décrire les propriétés que peuvent avoir les HDL dans le système cardiovasculaire, il est important de s'intéresser aux liens qui peuvent exister entre ses constituants majeurs, à savoir l'ApoA-I et la S1P. Certaines propriétés des HDL pourraient en effet être dues à l'action de chacune de ces protéines indépendamment, mais il semblerait également qu'il existe une forme de synergie dans leur mode d'action.

Une raison qui pourrait expliquer cet effet synergique de l'ApoA-I et de la S1P, serait la proximité physique entre leurs récepteurs. En effet, ces deux molécules possèdent des récepteurs différents, et donc des actions différentes, mais le regroupement de ces récepteurs au niveau des cavéoles des membranes cellulaires serait à l'origine d'une certaine coopération entre eux (**Figure 15**) [292].

Pour preuve de cette coopération, des HDL reconstituées (rHDL), composées d'ApoA-I, de PL et de C, étaient incapables de mimer l'activation de l'eNOS et des MAPK, observée avec des HDL natives. En revanche, l'utilisation d'anticorps anti-ApoA-I ou anti-SR-BI était capable de bloquer l'activation induite par des HDL natives. C'est donc que l'effet des HDL est médié par la S1P et ses récepteurs, mais d'une façon dépendante d'une co-activation par l'ApoA-I et SR-BI [293].

Des démonstrations que les différents constituants des HDL peuvent avoir des effets similaires, mais indépendants les uns des autres, ont également été réalisées. Nofer *et al.* ont démontré que la vasodilatation induite par les HDL était réduite d'environ 60% lors d'une déficience dans les récepteurs S1P₃, alors que la totalité de l'effet vasodilatateur était perdu lors d'une administration de S1P seule. C'est la démonstration qu'un autre élément des HDL, sûrement l'ApoA-I, peut jouer un rôle similaire à la S1P sur la vasodilatation et/ou est nécessaire à l'action de celle-ci [294]. De la même façon, l'inhibition de l'expression de molécules d'adhésion, par l'activation de l'eNOS *via* les HDL, était partiellement inhibée par l'utilisation de *small interfering RNA* (siRNA) anti-récepteurs S1P ou anti-SR-BI. Cette inhibition était ensuite totale lors de l'utilisation des deux siRNA simultanément [295].

Au niveau de certaines fonctions, il semblerait que seule l'ApoA-I joue un rôle dans l'effet des HDL. C'est le cas pour stimuler l'efflux du cholestérol des macrophages, puisque des rHDL composées uniquement d'ApoA-I et de PL, sont aussi efficaces que des rHDL, contenant à la fois ApoA-I et S1P [296]. De la même façon, des rHDL sans S1P présentent la même efficacité que des HDL natives dans le transport inverse du C [297-299] et dans l'activation de l'eNOS. Ce sont donc des rôles de l'ApoA-I indépendants de la S1P.

Parfois il semble que la S1P soit capable d'avoir des effets indépendamment de l'ApoA-I. C'est le cas au niveau des protéines de signalisation intracellulaire Akt et ERK1/2, que seules les rHDL contenant la S1P ont permis de phosphoryler [296].

En conclusion, l'ApoA-I et la S1P sont toutes les deux capables d'avoir des effets indépendants l'une de l'autre, mais également d'interagir entre elles, probablement par une coopération au niveau de leurs récepteurs. Il est donc très difficile de différencier l'apport de chaque molécule dans l'effet global des HDL.

2. Effets des HDL sur les cellules endothéliales et les vaisseaux

2.1. Régulation du tonus vasculaire

Une des propriétés principales des HDL est de pouvoir réguler le tonus vasculaire, par la libération notamment de NO au niveau des cellules endothéliales (CE). Cela induit un relâchement des cellules musculaires lisses des vaisseaux, et donc une vasodilatation. Cette libération de NO par les CE est le résultat de la phosphorylation, et donc de l'activation, de l'enzyme eNOS à l'origine de sa synthèse. Cette eNOS a été démontrée comme activée par les HDL à la fois dans des modèles de CE en culture [293,300] et également dans des modèles d'artères isolées [293,294].

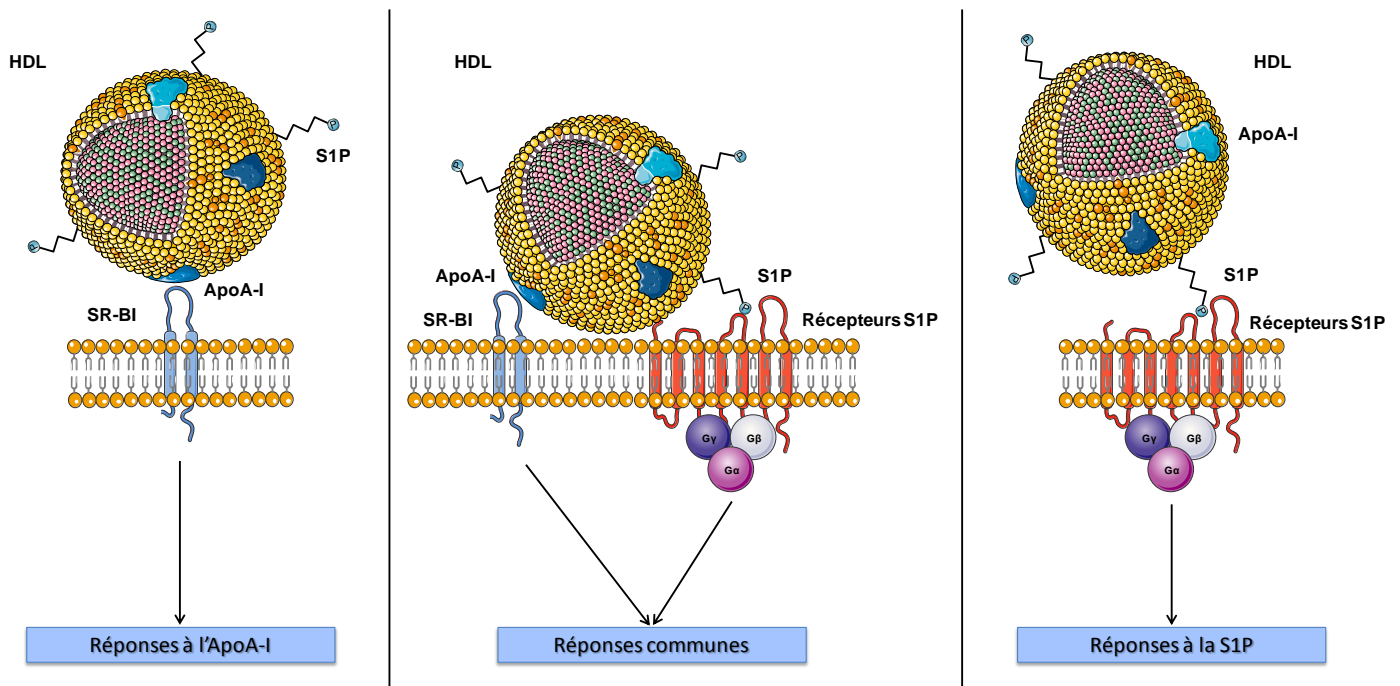


Figure 15. Effets indépendants et synergiques de l'ApoA-I et de la S1P.

Une part de l'action des HDL résulte de la fixation individuelle de l'ApoA-I et de la S1P sur leurs récepteurs spécifiques, réciproquement SR-BI et les récepteurs à la S1P. Ont lieu alors des réponses cellulaires indépendantes les unes des autres. Un phénomène de coopération entre l'ApoA-I et la S1P est également décrit. Les réponses cellulaires qui résultent de la liaison des deux molécules à leurs récepteurs sont communes. Elles sont donc attribuées aux HDL dans leur globalité. *Adaptée de Brewer. 2011 [301].*

L'ApoA-I est une des molécules décrites comme à l'origine de cette production de NO. En effet, dans un travail publié en 2001 par Yuhanna *et al.*, il a été démontré que l'activation de l'eNOS, induite par les HDL, était retrouvée à la fois au niveau de CE en culture, mais également au niveau de cavéoles endothéliales isolées comprenant l'eNOS et le récepteur SR-BI. Cette activation était en revanche perdue lors de l'utilisation d'anticorps anti-ApoA-I et anti-SR-BI [293]. Bien que le mécanisme impliqué dans cette activation de l'eNOS soit encore inconnu, il semblerait que la liaison de l'ApoA-I au récepteur SR-BI, lors de l'efflux du C, permette une interaction entre l'ApoA-I et l'eNOS, aboutissant à sa phosphorylation et son activation (**Figure 16**) [297,298].

La S1P est également impliquée dans la production de NO, puisque cette molécule, ou son analogue le FTY720, se sont montrés capables d'induire une vasodilatation similaire à celle obtenue avec des HDL [294,302]. *In vivo*, les HDL via le récepteur S1P₃ ont également permis la synthèse de NO et une augmentation de

la perfusion myocardique (**Figure 16**) [303]. A l'inverse, lors d'une délipidation des HDL [269,292,294], ou lors de l'utilisation de souris déficientes pour le récepteur S1P₃ [294,302], la vasodilatation induite par la S1P ou les HDL est perdue.

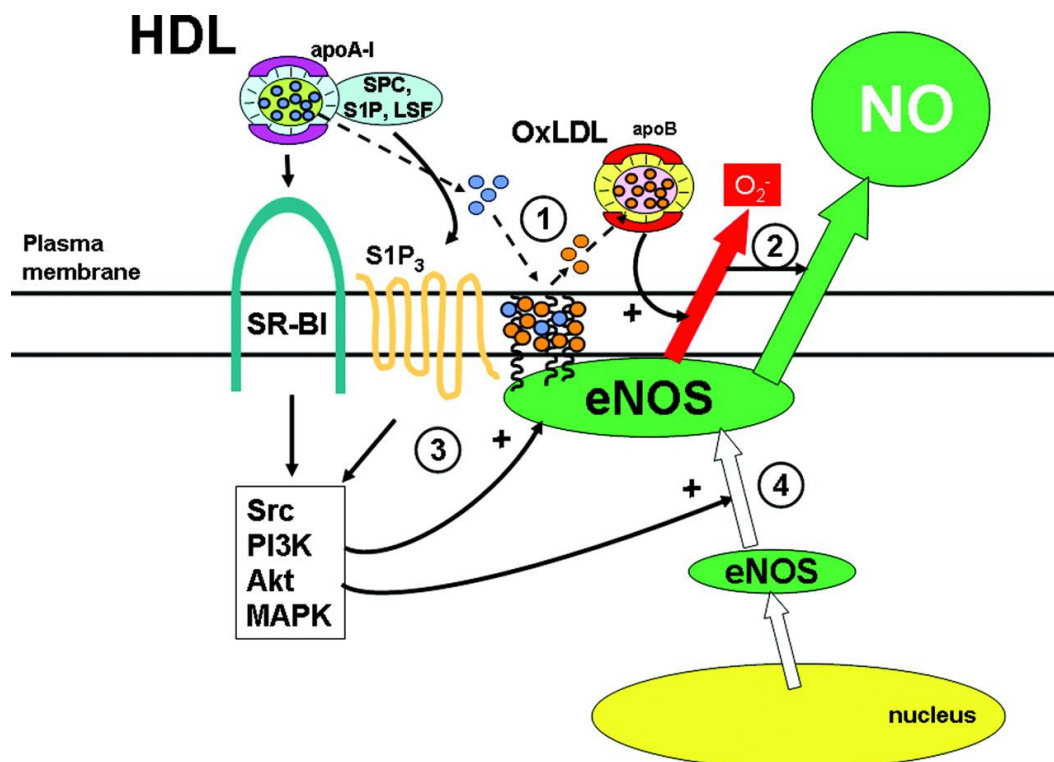


Figure 16. Rôle du NO dans l'effet vasodilatateur des HDL. La production de NO est l'élément principal de la réponse vasodilatatrice liée aux HDL. La fixation de l'ApoA-I sur SR-BI, et de la S1P sur ses récepteurs, active des signalisations intracellulaires aboutissant à l'augmentation de la synthèse ④ et à l'activation de l'eNOS ③. De plus, les HDL peuvent bloquer l'effet délétère des LDL oxydées ①. Elles sont en effet capables de remplacer le cholestérol membranaire capté (cercles oranges) par des esters de cholestérol (cercles bleus). Elles empêchent ainsi la perturbation de l'expression de l'eNOS à la membrane, et préviennent la production d'anion superoxyde ②. *Mineo et al. 2006* [304].

Le NO n'est pas la seule molécule vasodilatatrice qui soit induite par les HDL. La prostacycline I₂ (PGI₂) est également synthétisée sous l'induction des HDL, par les CE et les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Cette production repose sur la capacité des HDL à stimuler la transcription du gène cyclooxygénase-2 (COX-2), qui synthétise la PGI₂ (**Figure 17**) [305-307]. Il semble que ce soit la S1P qui induise cette vasodilatation dépendante de PGI₂. Son utilisation seule mime en effet l'induction de COX-2 et PGI₂ induite par les HDL [308], alors que la délipidation des HDL, ou l'utilisation d'antagonistes des récepteurs S1P₂ et S1P₃, abolit l'induction de

COX-2 [308,309]. Récemment l'ApoA-I a également été montrée comme capable d'induire l'activation de COX-2 et de PGI₂ par sa liaison aux récepteurs ABCA1 [310] et SR-BI [311].

Les voies de signalisation impliquées dans la production de NO et de PGI₂ sont des voies classiques de signalisation cellulaire, à savoir la voie PI3K/Akt/MAPK pour le NO [300], et ERK1/2, p38 MAPK et *cyclic-AMP response element binding protein* (CREB) pour la PGI₂ (**Figure 17**) [308,311].

Chez l'homme, lors de carences en HDL, comme c'est le cas dans les hypo- α -lipoprotéïnémie, la vasodilatation ne se fait pas suffisamment, ce qui peut entraîner progressivement le développement de l'athérosclérose [312]. L'utilisation d'HDL, pour traiter les patients hypercholestérolémiques ou déficients en HDL, a donc permis de restaurer la fonction endothéliale, par la vasodilatation et l'augmentation du flux [313,314].

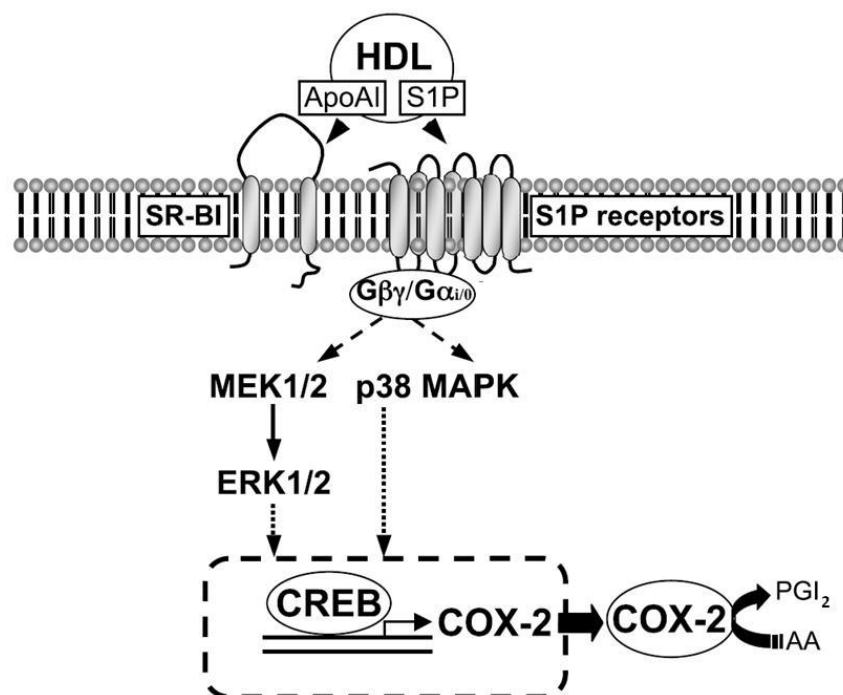


Figure 17. Synthèse de PGI₂ par les HDL. L'autre élément de la réponse vasodilatatrice liée aux HDL est la synthèse de COX-2 et de PGI₂. Cette production est dépendante de l'activation du facteur de transcription CREB par les kinases cellulaires MEK1/2, p38 MAPK et ERK1/2. Abréviations : AA, acide arachidonique; CREB, *cyclic-AMP response element binding protein*. Adaptée de González-Díez et al. 2008 [308].

2.2. Propriétés anti-thrombotiques

En parallèle de la vasodilatation induite par le NO et la PGI₂, les HDL sont capables de protéger contre l'athérosclérose en réduisant la thrombose. Cet effet anti-thrombotique est la résultante de plusieurs propriétés des HDL et de leurs constituants (**Figure 18**).

Premièrement, les HDL sont capables d'agir directement au niveau des éléments cellulaires de la coagulation que sont les plaquettes [315]. L'ApoA-I Milano, comme les rHDL, est capable de réduire l'agrégation plaquettaire chez l'animal [316], et ce par une interaction directe avec les plaquettes [317]. Les HDL peuvent également réduire l'agrégation plaquettaire en régulant la synthèse de thromboxane A-2, et en produisant de la PGI₂ et du NO [304,318,319].

Les HDL sont également capables d'interagir avec un ensemble de facteurs intervenants dans la cascade de coagulation. Elles peuvent notamment induire la libération de la thrombomoduline [320], et leur présence est inversement corrélée à la libération de fragments de la prothrombine, signe d'une inhibition de la coagulation [321]. Le tandem protéine C activée (APC)/protéine S, qui joue un rôle crucial dans la coagulation, est également une des cibles des HDL. La concentration en ApoA-I est en effet liée à la réponse anticoagulante du couple APC/protéine S [322], et la S1P a été démontrée comme étant un des cofacteurs de l'APC [323,324]. Les HDL possèdent donc des propriétés anti-thrombotiques en réduisant la coagulation.

Elles peuvent également influencer sur la dégradation du thrombus. C'est ce que décrivent différents travaux mettant en évidence une augmentation de la fibrinolyse induite par les HDL. Cette fibrinolyse passe par l'inhibition de l'expression du *plasminogen activator inhibitor-1*, qui est un agent anti-fibrinolytique puisqu'il inhibe la transformation du plasminogène en plasmine. A l'inverse, elles induisent la production de *tissue plasminogen activator*, qui pour sa part est un agent fibrinolytique [306,325,326].

Chez l'homme, les pathologies du métabolisme lipidique se traduisant par de faibles concentrations sériques en HDL sont classiquement associées à une thrombose artérielle. C'est le cas notamment des dyslipidémies et des

dyslipoprotéinémies [327]. A l'inverse, les patients présentant des particules HDL de grande taille sont moins sujets à des accidents artériels [328]. L'injection de rHDL chez des patients sains a également permis de démontrer l'effet anti-thrombotique des HDL, en diminuant l'agrégation plaquettaire [329].

2.3. Apoptose et survie des cellules endothéliales

Une couche intacte de CE permet de réguler l'homéostasie de la barrière vasculaire et de protéger les cellules musculaires lisses des différents stress. La perturbation de cette intégrité de la barrière endothéliale, notamment par des phénomènes apoptotiques, induit l'exposition à des facteurs circulants pro-inflammatoires et aux cellules inflammatoires, pouvant être à l'origine de processus pathologiques favorisant l'athérosclérose [330]. Plusieurs facteurs pro-apoptotiques peuvent être contrôlés par les HDL et leurs composants, l'ApoA-I et la S1P (**Figure 19**) :

- L'apoptose induite par le TNF- α est capable d'être inhibée par les HDL, notamment en diminuant l'activité de la caspase 3 [331].

- L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, causée par les LDL oxydées (oxLDL), est responsable de la mort des CE. Les HDL et l'ApoA-I seule, sont capables de bloquer cette élévation du calcium et ainsi d'empêcher l'apoptose [332]. Une autre propriété apoptotique des LDL oxydées, est leur capacité à diminuer la quantité de S1P présente au niveau des HDL, empêchant ainsi la protection induite par cette molécule [333].

- La privation en facteurs de croissance est également une cause d'apoptose pour les CE, notamment en perturbant le potentiel de membrane mitochondrial, en induisant la génération excessive de ROS ou bien en libérant du cytochrome C. Les HDL, et leurs sphingolipides, sont capables de protéger les CE de cette mort cellulaire, par l'intermédiaire de la voie de survie Akt/ *Bcl-2-associated death promoter* (BAD)/*B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL) [334].

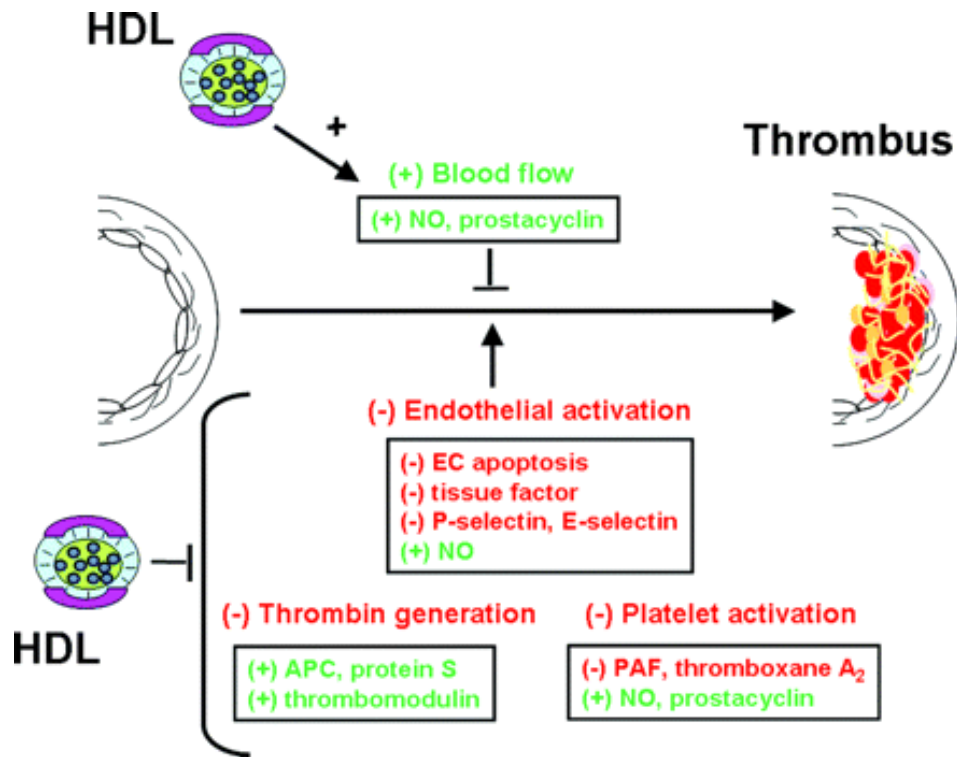


Figure 18. Effets anti-thrombotiques des HDL. L'action des HDL sur la formation du thrombus est double. Elles sont capables de stimuler les processus bénéfiques que sont l'augmentation de la vasodilatation et du flux sanguin, *via* la production de prostacycline (PGI₂) et de NO. Elles peuvent réguler négativement de nombreux phénomènes néfastes comme l'activation endothéliale, l'activation des plaquettes ou encore la formation de thrombine. Mineo *et al.* 2006 [304].

Cette action bénéfique des HDL semble médiée par plusieurs facteurs. La S1P est décrite comme capable d'activer la voie PI3K/ERK1/2 [335], ainsi que la production de NO *via* l'eNOS [336]. Les récepteurs S1P₁ et S1P₃ sont les vecteurs de cette protection induite par la S1P [335,336]. Pour preuve de cet effet de la S1P, les HDL₃, plus riches en S1P, sont plus efficaces que les HDL₂ pour protéger les CE de l'apoptose [337]. La S1P n'est pas la seule molécule active des HDL, puisqu'un peptide synthétique mimétique de l'ApoA-I, le D-4F, a également montré des capacités à réduire la fragmentation et la desquamation de l'épithélium vasculaire *in vivo* [338].

2.4. Migration/prolifération/angiogenèse

En réponse à une lésion vasculaire ou lors de la formation de nouveaux vaisseaux, il est nécessaire d'induire une prolifération et une migration des cellules

endothéliales vasculaires. Ces processus ont été démontrés comme régulés par de nombreux facteurs, et en particulier les HDL (**Figure 19**).

Initialement, c'est Tauber *et al.* qui ont décrit l'induction de la prolifération des CE en réponse aux HDL [339]. L'induction de la migration des CE par les HDL a été décrite plus tard, par Murugesan *et al.* [340]. Ces phénomènes ont ensuite été confirmés à la fois *in vivo* et *in vitro* sur différents modèles, et plusieurs facteurs semblent impliqués.

Il y a tout d'abord la S1P qui semble être un élément essentiel, puisque les récepteurs S1P₁/S1P₂/S1P₃ sont très largement décrits comme responsables de cette réponse des CE aux HDL [296,341]. Dans un modèle d'ischémie de patte notamment, la récupération du flux sanguin était augmentée lors de l'administration de S1P, mais perdue chez des souris KO pour le récepteur S1P₃ [342]. De la même manière, les HDL riches en S1P étaient plus efficaces que les HDL pauvres en S1P pour induire la migration des CE [335].

L'ApoA-I est également capable de médier la réponse des CE aux HDL, notamment par l'intermédiaire du récepteur SR-BI. En effet, alors que les HDL sont capables *in vitro* de provoquer la prolifération, la migration et la réendothélisation suite à une lésion, l'utilisation de souris ApoA-I ou SR-BI KO abolit ces effets bénéfiques [343].

Le processus d'angiogenèse est lui aussi modulé par les lipoprotéines, puisque la formation de capillaire est stimulée par les HDL [344] et la S1P [345]. Comme la prolifération et la migration, il semble que de nombreuses kinases soient mises en jeu dans l'action angiogénique des HDL, et notamment les kinases PI3K/Akt, ERK1/2, p38 MAPK ou encore Rho [296,335,344]. La voie du NO est également décrite comme un facteur essentiel de cette action des HDL, au travers de l'action de la eNOS et de la production de NO liée aux HDL [345,346].

A l'opposé de leurs actions sur les CE, les HDL et la S1P vont bloquer la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses des vaisseaux, empêchant ainsi l'envahissement de l'intima par ces cellules et donc le développement de la plaque d'athérome. Ces effets inhibiteurs des HDL passent en partie par la régulation

de COX-2 et la production de PGI₂, qui va bloquer les cellules à la phase G1 du cycle cellulaire [347]. Le blocage des récepteurs S1P₃ et SR-BI réprime l'action des HDL : c'est la démonstration de l'implication de la S1P et de l'ApoA-I dans ce processus [348].

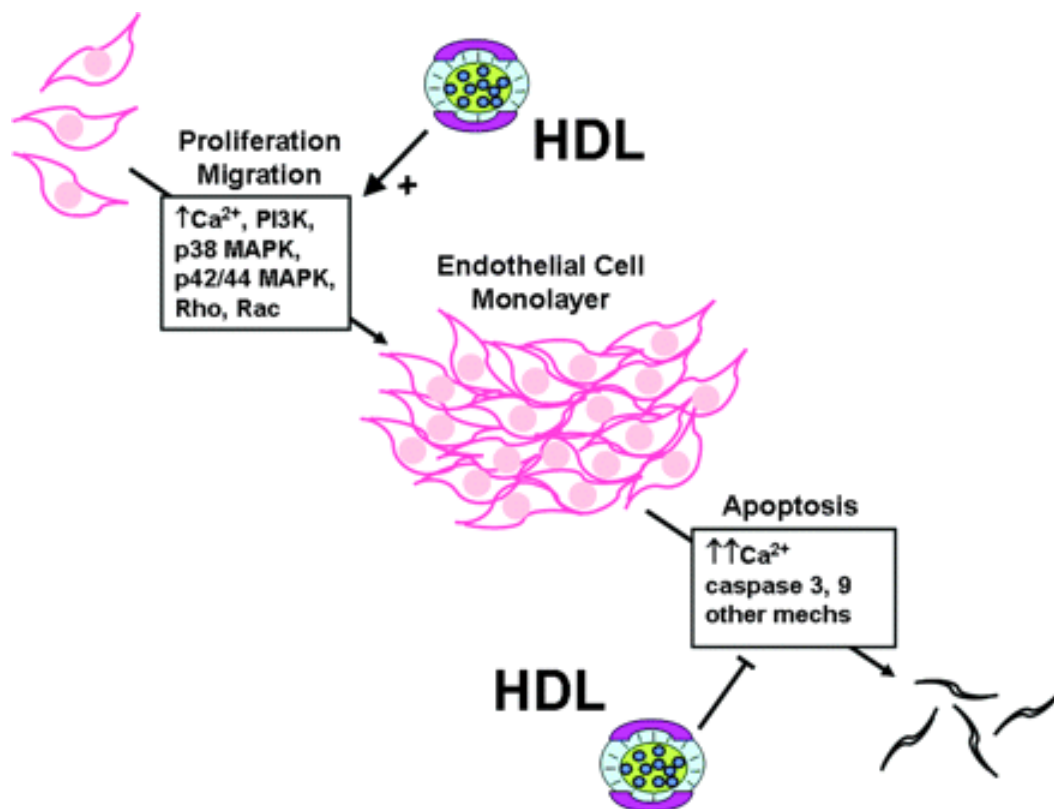


Figure 19. Préservation de l'intégrité de la barrière endothéliale. En inhibant l'apoptose des cellules endothéliales, et en stimulant leur prolifération et leur migration, les HDL contribuent au maintien de l'homéostasie vasculaire. L'existence d'une barrière endothéliale fonctionnelle est en effet essentielle pour la survie des cellules musculaires lisses vasculaires. Ces phénomènes protecteurs des HDL sont médiés par l'inhibition des caspases, par l'activation de nombreuses kinases de survie cellulaire, ainsi que par l'inhibition de la production excessive de calcium par les LDL oxydées. Mineo *et al.* 2006 [304].

2.5. Régulation de l'activation de l'endothélium

Il existe plusieurs molécules permettant l'adhésion des cellules leucocytaires aux CE vasculaires. Les molécules qui sont décrites comme sensibles aux HDL, sont la molécule d'adhésion aux cellules vasculaires-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1), la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), la E-sélectine et MCP-1. Le rôle de ces molécules est de réguler le

roulement, l'adhésion, l'arrêt et la transmigration des leucocytes au travers de l'épithélium vasculaire [349]. Cette diapédèse des cellules leucocytaires est un des phénomènes principaux en réponse à l'inflammation induite par l'athérosclérose.

L'inhibition de ces processus par les HDL explique en grande partie leurs effets anti-inflammatoires (**Figure 20**).

En effet, les HDL ont été décrites comme ayant la capacité d'inhiber l'expression de ces molécules au niveau de la membrane des CE. Cockerill *et al.* ont ainsi décrit une réduction de l'expression membranaire de VCAM-1, d'ICAM-1 et de la E-sélectine, en réponse à des HDL humaines purifiées [350]. MCP-1, induite par les oxLDL, a également été décrite comme inhibée par la présence d'HDL dans les travaux de Mackness *et al.* et Navab *et al.* [351,352]. Ces effets des HDL ont ensuite été retrouvés dans de nombreuses études, et cela que ce soit avec des HDL natives ou des rHDL ne contenant que l'ApoA-I [305,353-355]. De façon intéressante, l'inhibition de MCP-1 par les HDL est également retrouvée au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux. C'est le lien entre l'inhibition de l'activation de l'endothélium et l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses, observées dans l'athérosclérose [348].

Ces effets des HDL peuvent, comme souvent, être dépendants des deux principales molécules qui les composent, à savoir l'ApoA-I et la S1P. Comme décrit précédemment, l'ApoA-I seule au niveau de rHDL est capable de mimer l'effet des HDL sur l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion. Le récepteur SR-BI a par conséquent été étudié et mis en évidence comme impliqué dans l'action des HDL [295]. La protéine C-réactive (CRP), qui intervient dans l'induction de l'inflammation, est également la cible de l'ApoA-I, puisque qu'elle peut engendrer l'expression des molécules d'adhésion (**Figure 20**). Wadham *et al.* ont donc étudié l'effet d'HDL natives et de rHDL sur l'inflammation médiée par la CRP, et ont décrit une inhibition par les deux types d'HDL [356].

Bien que les données soient parfois contradictoires, le rôle de la S1P dans l'action des HDL est lui aussi bien établi. Plusieurs études démontrent en effet une inhibition de l'expression des molécules d'adhésion en réponse à la S1P et aux sphingolipides des HDL [295,357,358]. C'est essentiellement le récepteur S1P₁ qui

semble permettre l'action de la S1P au niveau des cellules endothéliales, puisqu'il permet de réduire l'expression de VCAM-1 et donc l'adhésion des monocytes [359]. C'est également le récepteur S1P₁ qui induit la signalisation cellulaire aboutissant au réarrangement des intégrines de la face apicale à la face basale des CE, empêchant ainsi le recrutement des leucocytes [360]. Des effets inverses ont été décrits lors de la fixation de la S1P au niveau de son récepteur S1P₃ sur les CE. Cette interaction favorise l'expression des molécules d'adhésion, au travers de l'activation de NF-κB [299,361]. Ces différences de réponse entre les différents types de récepteurs à la S1P peut s'expliquer à la fois par des différences expérimentales, mais également par les multiples propriétés et les nombreuses signalisations engendrées par les récepteurs à la S1P.

Les mécanismes mis en jeu lors de cette régulation de l'activation de l'endothélium sont nombreux et dépendants de la molécule, l'ApoA-I ou la S1P, induisant la protection. Ils sont très similaires à ceux décrits précédemment pour les autres propriétés des HDL, à savoir :

- L'activation des voies PI3K/Akt [299,358]
- La synthèse de NO *via* l'eNOS [294,299]
- La production de PGI₂ par COX-2 [350,362]
- L'inhibition de la production excessive de ROS [363,364]

Tous ces phénomènes anti-inflammatoires et antioxydants, liés aux HDL, stoppent l'induction de NF-κB. Ce facteur de transcription, activé notamment par le TNF-α et les autres cytokines inflammatoires, est responsable de l'expression, entre autre, des molécules d'adhésion [299,357,363].

Les effets des HDL sur l'inflammation vasculaire ne sont pas uniquement démontrés *in vitro*. L'utilisation d'HDL chez des souris spontanément athérosclérotiques, a permis de réduire l'état d'activation de l'endothélium vasculaire [365] et de diminuer la présence de MCP-1 dans la plaque d'athérome [366]. Toujours *in vivo*, l'adhésion et la migration des monocytes était également inhibée par les HDL, mais pas chez des souris S1P₃ KO [362]. *In vivo* chez le lapin, dans un

modèle d'athérogenèse induite par la pose d'un collet autour des carotides, la forte inflammation manifestée par la production de ROS, l'expression de molécules d'adhésion et par l'infiltration des polynucléaires neutrophiles, était inhibée par l'utilisation de rHDL contenant l'ApoA-I [320,367].

Toutes ces études sur l'effet bénéfique des HDL *in vivo* ont ouvert la voie à l'utilisation de ces molécules chez l'homme. Des essais cliniques ont été réalisés et se sont montrés concluants quant à la réduction de l'athérosclérose [368-370].

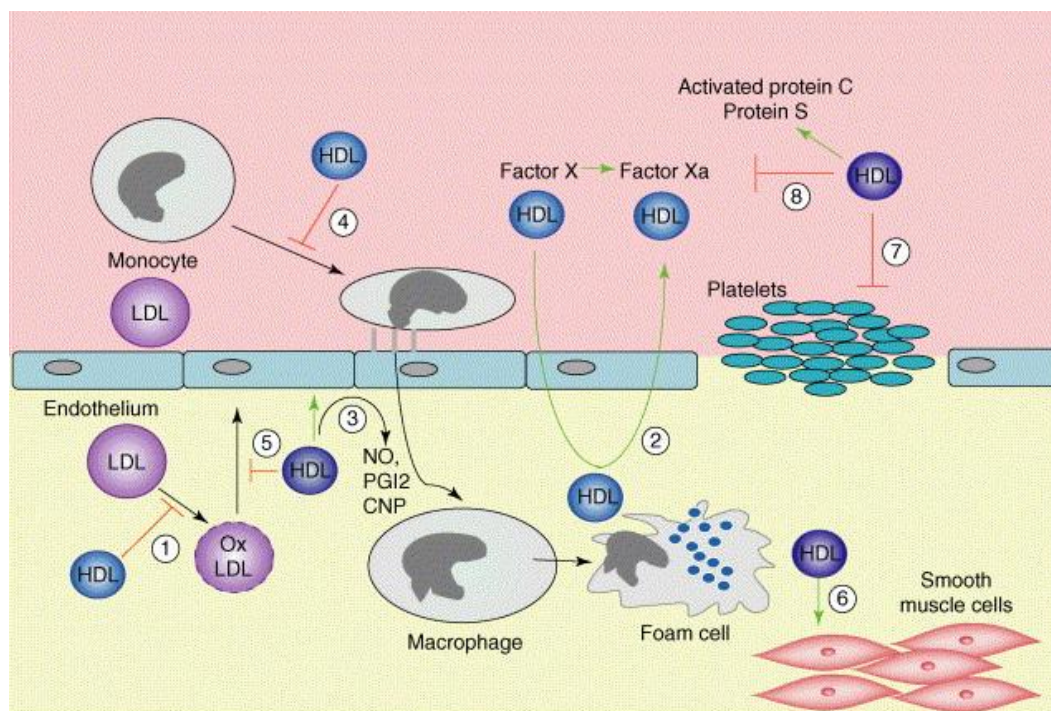


Figure 20. Propriétés vasculaires des HDL. Les HDL, et leurs constituants, sont capables d'exercer de nombreux effets protecteurs au niveau de la barrière vasculaire. Le rôle premier des HDL est d'éliminer le cholestérol membranaire, à la fois au niveau des macrophages, mais également au niveau des cellules endothéliales ②. L'apoptose de ces dernières peut être inhibée par les HDL ⑤ en bloquant l'oxydation des LDL (oxLDL) ①. Sous l'effet des HDL, les cellules endothéliales peuvent synthétiser des molécules vasodilatatrices (NO, PGI₂, CNP) ③. Ces molécules interviennent également dans l'inhibition de la synthèse de cytokines et dans l'inhibition de l'expression membranaire de molécules d'adhésion, bloquant ainsi l'adhésion et la diapédèse des leucocytes au niveau de l'épithélium vasculaire ④. Les HDL peuvent également réguler la coagulation ⑧ et l'agrégation plaquettaire ⑦, en particulier *via* le couple APC/protéine S. Le maintien de l'intégrité vasculaire passe également par la stimulation de la survie et de la prolifération des cellules musculaires lisses par les HDL ⑥. Abréviations : CNP, *C-type natriuretic peptide*. von Eckardstein. 2004 [371].

3. Effets des HDL sur les cellules immunitaires

Au-delà des nombreux effets des HDL sur la physiologie et la physiopathologie vasculaire, les HDL ont également des liens étroits avec l'immunité. En effet, les réactions régissant l'activation des cellules immunitaires découlent pour certaines directement de l'état d'activation des CE. C'est le cas notamment lorsque les CE présentent à leurs surfaces des molécules d'adhésion. Il va y avoir recrutement des leucocytes au niveau du vaisseau, puis infiltration du tissu sous-jacent, en l'occurrence au niveau des cellules musculaires lisses et au niveau des cardiomyocytes, si on se place dans le cas de l'inflammation liée à l'IDM.

Il est donc intéressant de constater, qu'en dehors de l'inhibition du recrutement des leucocytes au niveau vasculaire, les HDL sont capables d'agir directement sur les cellules immunitaires. Il ne s'agit pas seulement d'une régulation passive de leur activation *via* l'endothélium vasculaire.

Avant de décrire les différentes études mettant en évidence l'action des HDL sur l'immunité, il est nécessaire d'évoquer deux acteurs essentiels de cette régulation, que sont les radeaux lipidiques et les TLR :

- Les radeaux lipidiques (**Figure 21**) sont des microdomaines de la membrane plasmiques, très rigides, riches en cholestérol et en glycosphingolipides. Ils constituent des zones privilégiées pour la signalisation cellulaire, puisqu'ils permettent la concentration de nombreuses protéines et de nombreux récepteurs. Dans le cadre de l'immunité, les lymphocytes T reconnaissent des peptides antigéniques présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), au niveau de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), *via* leur récepteur spécifique (*T cell receptor*, TCR). Ces molécules, ainsi que de nombreuses molécules de co-stimulation sont présentes en grande quantité au niveau de ces radeaux lipidiques. Ils sont donc importants dans la signalisation de l'inflammation et de l'immunité [372].

- Les TLR sont des récepteurs transmembranaires, présents à la surface de nombreux types cellulaires, et en particulier des cellules de l'immunité (**Figure 22**). Ils permettent la reconnaissance de motifs pathogéniques, et ont donc un rôle de

mise en place de l'immunité innée. Les deux TLR classiquement décrits dans la littérature consacrée aux HDL sont les TLR2 et TLR4. La reconnaissance de motifs antigéniques par ces TLR va permettre l'induction de cascades de signalisation spécifiques, aboutissant à l'activation de gènes de défense. Il y a la voie du *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), conduisant à la synthèse de cytokines inflammatoires, et la voie *TRIF-related adaptor molecule / TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β* (TRAM/TRIF). Cette dernière est responsable de l'expression de gènes permettant une réponse antivirale, une maturation des cellules dendritiques et des macrophages, l'expression de molécules de co-stimulation du CMH, ainsi que la sécrétion d'IFN- β . C'est ce qu'on appelle la réponse interféron de type I [373].

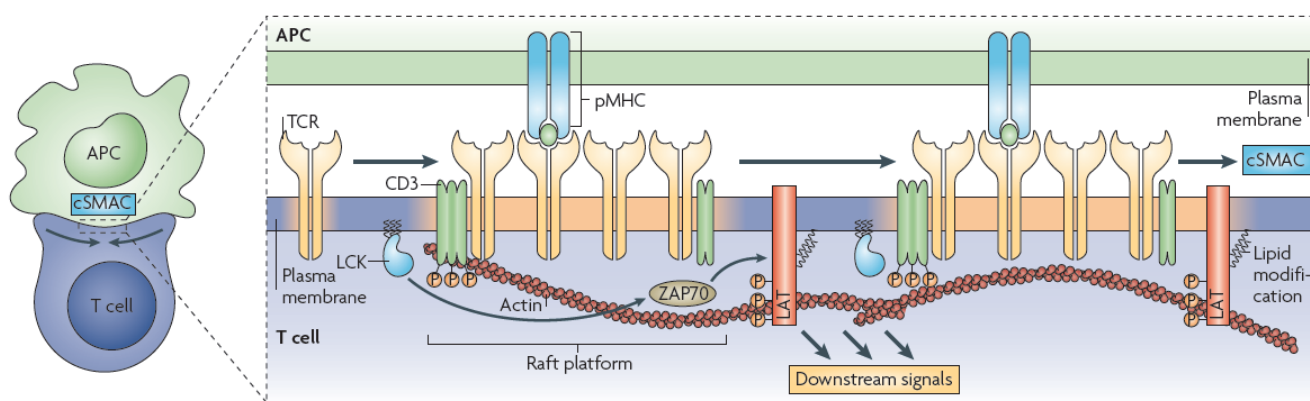


Figure 21. Interaction CMH/TCR au niveau des radeaux lipidiques. L'activation des lymphocytes T (T cell) par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) est fortement dépendante de la présence de radeaux lipidiques membranaires (Raft platform). Ils permettent le contact entre les molécules de CMH, présentant un peptide antigénique (pMHC), et les TCR des lymphocytes. De nombreuses molécules de costimulation sont nécessaires à la formation du complexe supramoléculaire central d'activation (c-SMAC) et donc à l'initiation de signaux intracellulaires en réponse à la liaison CMH/TCR. Abréviations : LAT, *linker for T cell activation*; LCK, *lymphocyte cell-specific protein Tyr kinase*; ZAP70, *Tyr kinase 70 kDa ζ -associated protein*. Simons et Gerl. 2010 [372].

Comme décrit précédemment, les radeaux lipidiques, et plus généralement l'expression de récepteurs membranaires, est cruciale pour le bon fonctionnement de la réponse immunitaire. La stabilité de ces radeaux et de leur contenu est donc dépendante de la régulation de l'efflux de C. Déjà démontrée, la déplétion en C par des agents chimiques est capable d'inhiber la présentation d'antigènes par les CPA et donc l'activation des lymphocytes T [374,375]. Les HDL et l'ApoA-I étant des

chélateurs naturels du C, il est logique de supposer qu'elles peuvent avoir un effet similaire.

Dans leur étude *in vitro*, Wang *et al.* ont ainsi démontré que l'ApoA-I et les HDL pouvaient inhiber la stimulation des lymphocytes T par les CPA, en perturbant les radeaux lipidiques par une augmentation de l'efflux de C. Il y avait ainsi moins de radeaux présents à la surface de la membrane plasmique, et ceux restants contenaient moins de C. En résulte une mauvaise distribution des molécules de CMH-II à la membrane et une diminution de l'activation des lymphocytes T. Ces effets se traduisaient par une réduction de synthèse d'IL-2 et d'IFN- γ par les lymphocytes T [376]. Hyka *et al.*, ont également démontré la capacité de l'ApoA-I à bloquer le contact entre les monocytes et les lymphocytes T, empêchant ainsi la synthèse d'IL-1 β et de TNF- α [377].

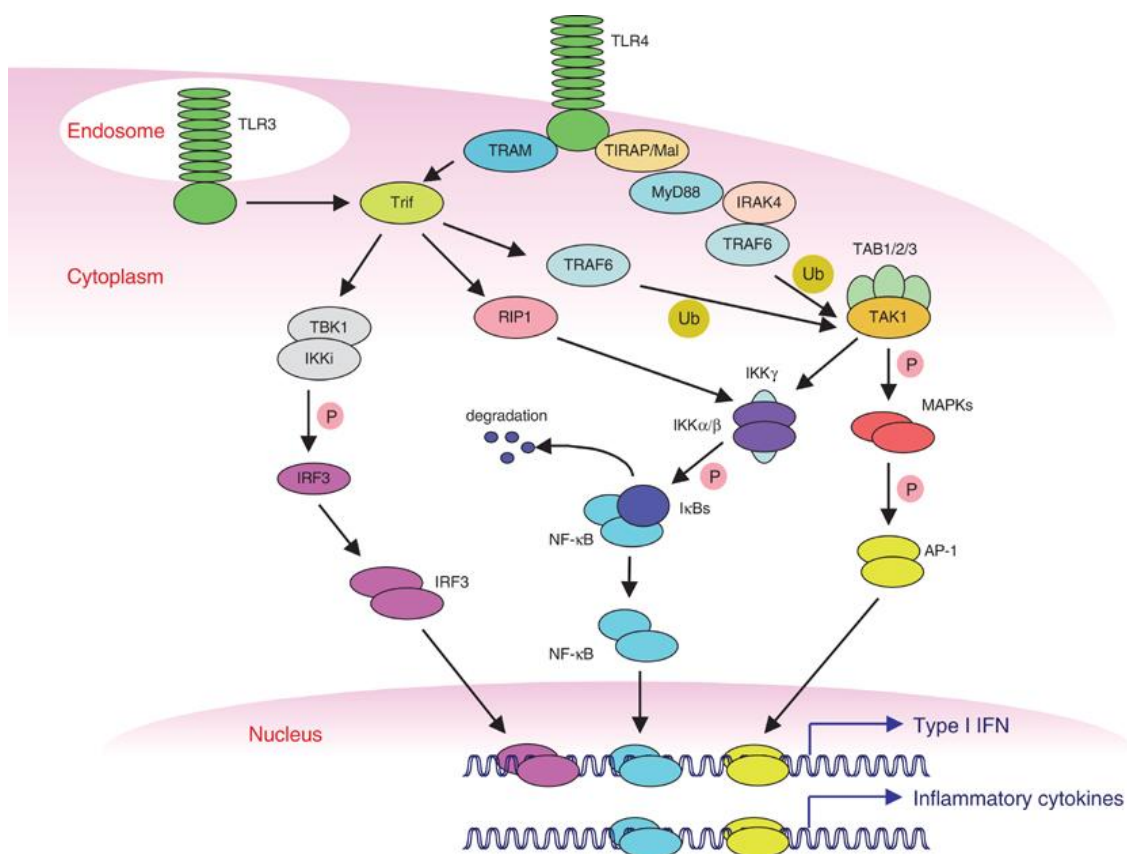


Figure 22. Voies de signalisation dépendantes du TLR4. De multiples protéines interviennent dans la signalisation du TLR4. On distingue deux voies principales: la voie TRAM/TRIF, aboutissant à l'activation de la réponse interféron de type I via l'*interferon regulatory factor-3* (IRF-3), et la voie MyD88, induisant la synthèse de cytokines inflammatoires via NF- κ B et l'*activator protein-1* (AP-1). Kawai *et Akira*. 2006 [373].

Cet effet perturbateur de l'ApoA-I et des HDL est retrouvé par Umemoto *et al.* au niveau d'adipocytes. Dans leur étude, ils démontrent que la réduction de l'inflammation, liée aux HDL et à l'ApoA-I, passe par les récepteurs classiques à savoir ABCA1 et SR-BI, induisant l'augmentation de l'efflux du C des adipocytes vers l'ApoA-I/HDL, et perturbant ainsi la stabilité des radeaux lipidiques [378]. De la même manière, des souris déficientes pour le récepteur ABCA1, ou des monocytes de patients atteints de la maladie de Tanger (déficit en efflux du cholestérol), voient les effets anti-inflammatoires de l'ApoA-I et des HDL bloqués [379,380].

Il y a donc bien une relation entre l'ApoA-I des HDL et la voie principale d'élimination du C, à savoir ABCA1/SR-BI, et la stabilisation/perturbation des radeaux lipidiques [228].

La régulation de la signalisation cellulaire, au niveau des cellules leucocytaires, est une autre propriété des HDL. Comme au niveau des CE, la S1P est capable de se lier à ses récepteurs, présents au niveau des membranes des monocytes et des macrophages [381], et d'induire l'activation de signalisations aboutissant à la diminution des phénomènes inflammatoires [382]. Dans leurs études, Nofer *et al.* et Keul *et al.* ont décrit le FTY720, un analogue de la S1P, comme étant capable de réduire l'athérosclérose *in vivo*. L'action de cette S1P synthétique est médiée par la diminution de l'activation, de la migration et de la sécrétion des macrophages [383,384]. Elle peut également orienter la réponse des macrophages en favorisant le phénotype M2 anti-inflammatoire, au détriment du phénotype M1 pro-inflammatoire [385]. Au niveau de la signalisation intracellulaire, la S1P est capable d'inhiber l'action du facteur de transcription NF- κ B et donc l'inflammation [386].

NF- κ B est une plaque tournante de la signalisation intracellulaire en lien avec l'immunité. Il est notamment activé par la liaison de motifs antigéniques pathogènes au niveau de TLR, qui sont les senseurs de l'immunité innée, notamment antibactérienne. Les radeaux lipidiques jouent un rôle essentiel dans cette signalisation intracellulaire, puisqu'ils sont en effet des plateformes permettant la présence de nombreux récepteurs de l'immunité à la membrane, et en particulier les TLR. De façon surprenante, il a été démontré que les lipoprotéines pouvaient interagir avec les ligands des TLR pour moduler l'activation de ces récepteurs.

Plusieurs études ont donc étudié le rôle des TLR dans l'anti-inflammation induite par les HDL.

La 1^{ère} étude est celle de Suzuki *et al.* en 2010, réalisée sur des macrophages en culture, et explorant les voies de la réponse interféron de type I. Les macrophages stimulés par du lipopolysaccharide (LPS) présentaient un profil pro-inflammatoire en réponse à la fixation du LPS sur le TLR4, et à l'activation des molécules de signalisation TRAM/TRIF. Cette réponse interféron de type I était en revanche inhibée par l'ajout d'HDL, et ce en favorisant la translocation de TRAM dans le compartiment intracellulaire. Cet effet des HDL sur la signalisation du TLR4 est attribué à l'ApoA-I, de par sa capacité à perturber l'expression membranaire des récepteurs *via* la régulation du C, et a été confirmé par l'utilisation de souris ApoA-I KO. Lors d'une infection bactérienne, elles présentaient six fois plus de synthèse d'IFN- β que les souris sauvages, désignant bien l'ApoA-I comme une protéine inhibitrice de l'immunité liée au TLR4 [387].

La régulation du TLR4 par l'ApoA-I a ensuite été explorée par Mogilenko *et al.* Ils ont démontré que l'ApoA-I était localisée à la fois dans des vésicules intracytoplasmiques, mais également à la membrane, et plus particulièrement au niveau de son récepteur ABCA1 et des radeaux lipidiques. Elle est ainsi capable d'avoir un double effet régulateur sur les récepteurs membranaires, puisqu'elle peut à la fois stabiliser l'expression d'ABCA1 à la membrane, et à la fois réprimer l'expression du TLR4 [388].

En lien avec la signalisation du TLR, l'ApoA-I a également été décrite comme ayant un effet sur la signalisation du récepteur CD40. Le couple CD40/CD40 ligand est en effet capable d'interagir avec le *TNF receptor superfamily, member 6* (TRAF6), qui fait également partie de la signalisation liée à MyD88 au niveau du TLR4. En régulant le cholestérol cellulaire *via* ABCA1, l'ApoA-I peut ainsi perturber les radeaux lipidiques de macrophages et empêcher le recrutement de TRAF6 au niveau des radeaux. Elle bloque ainsi la signalisation dépendante de CD40, aboutissant à l'induction de cytokines inflammatoires *via* NF- κ B (**Figure 23**) [389].

Au niveau des cellules endothéliales, l'ApoA-I peut également jouer un rôle dans la régulation des radeaux lipidiques. En effet, en réponse à un régime

alimentaire contenant du cholestérol, l'expression de marqueurs des radeaux comme la cavéoline-1, la flotilline-1, ainsi que l'expression de TLR2 et TLR4, était augmentée chez des souris sauvages.

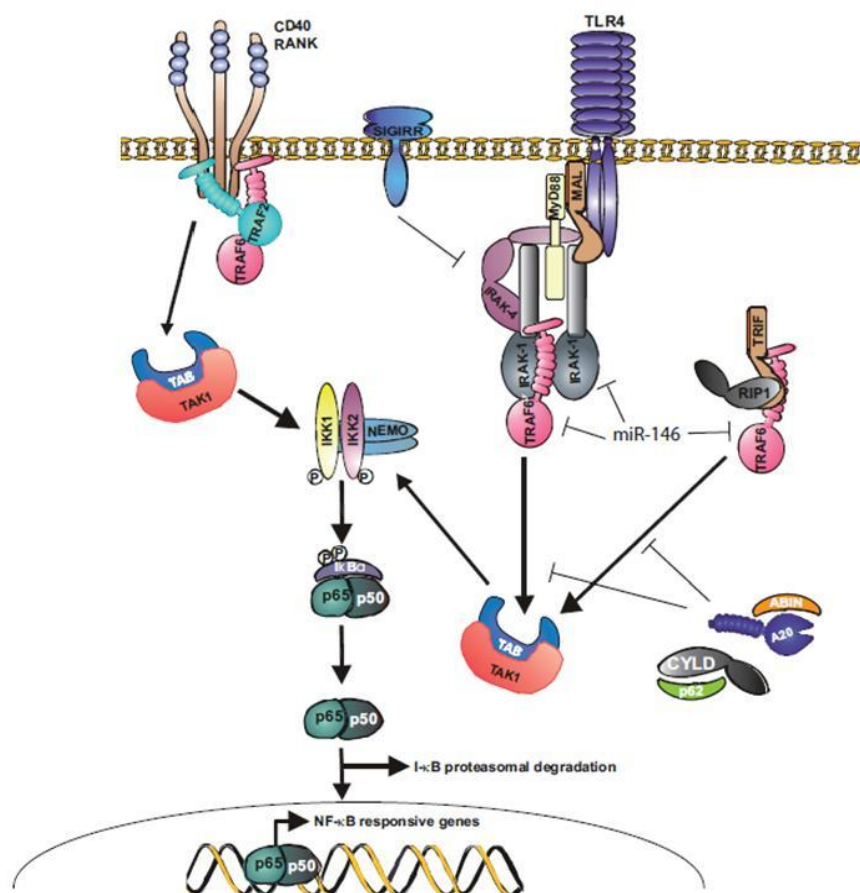


Figure 23. Interactions entre les voies CD40/CD40 ligand et TLR4/MyD88. La protéine TRAF6 est localisée à la membrane plasmique, au contact des récepteurs CD40 et TLR4. Elle joue un rôle central dans les signalisations permettant la synthèse de cytokines inflammatoires *via* NF-κB. L'ApoA-I des HDL est capable de perturber les radeaux lipidiques et d'empêcher ainsi le recrutement de TRAF6 à la membrane. *Adaptée de van Loo et Beyaert. 2011 [390].*

Chez des souris surexprimant l'ApoA-I humaine, leur expression était en revanche diminuée. De plus, l'ApoA-I était capable de bloquer le recrutement du TLR4 aux radeaux lors de la stimulation des cellules, empêchant ainsi l'expression de nombreuses molécules inflammatoires dépendantes de NF-κB, comme l'IL-6, le TNF-α ou MCP-1 [391].

In vivo, des études utilisant des souris doubles déficientes, pour le récepteur aux LDL et pour l'ApoA-I, ont été utilisées pour mettre en évidence les effets anti-inflammatoires de l'ApoA-I. Ces souris présentent constitutivement des dépôts de C et des infiltrations massives de macrophages sous la peau et dans le foie. Elles présentent également une sévère athérosclérose [392,393]. Elles possèdent également des ganglions lymphatiques plus chargés en C et en cellules immunitaires que les souris uniquement déficientes pour le récepteur aux LDL [394]. Cette infiltration massive de lymphocytes T, lymphocytes B, cellules dendritiques et macrophages dans les ganglions est réduite par l'injection d'ApoA-I à ces souris. Cette injection se traduit également par une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs, réduisant l'inflammation, ainsi que par une réduction des dépôts de C dans les ganglions et sous la peau [395].

Toutes ces études décrivent bien le rôle anti-inflammatoire que peuvent avoir les HDL, en agissant directement sur les principaux médiateurs de l'immunité que sont les leucocytes. Ces effets, complémentaires de ceux sur le mur vasculaire, vont permettre de lutter contre l'inflammation chronique, liée notamment à l'athérosclérose, mais également contre l'induction aiguë de phénomènes inflammatoires lors de l'IDM (**Figure 24**).

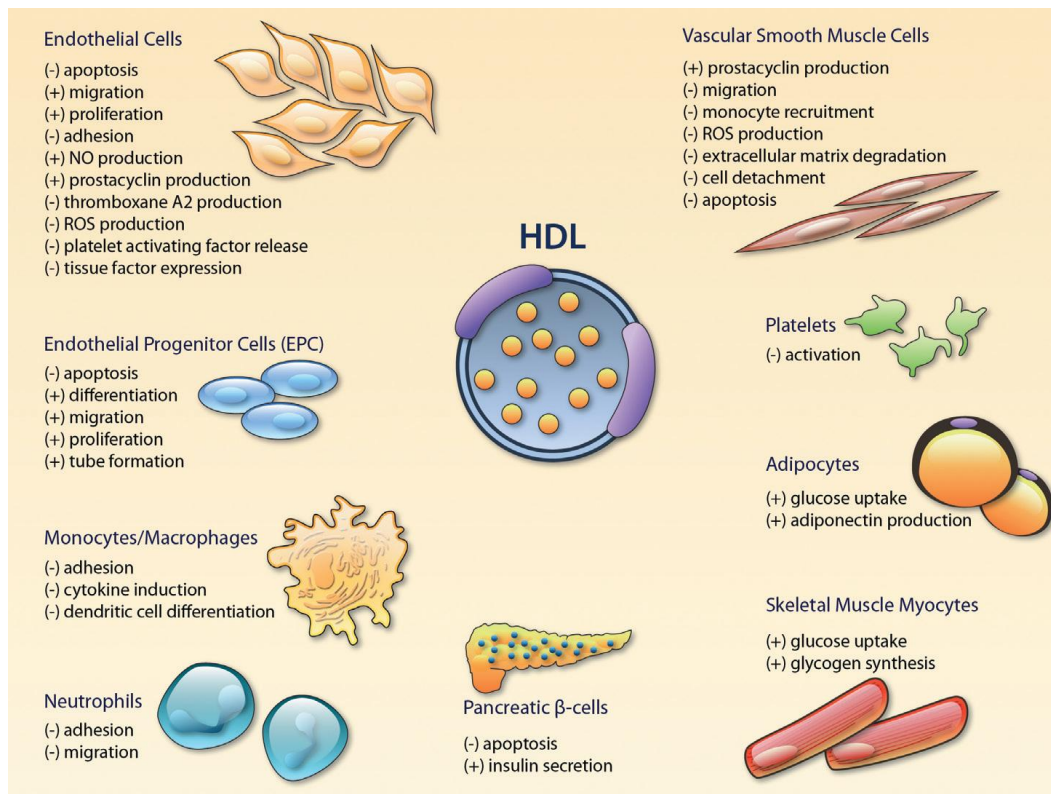


Figure 24. Effets biologiques des HDL. Schéma récapitulatif des différentes cibles cellulaires des HDL. *Mineo et Shaul. 2012 [396].*

4. Effets des HDL au niveau cardiaque

En lien avec le RIC, et au même titre que l'EPO, la ciclosporine, l'adénosine et de nombreuses autres molécules décrites précédemment, les HDL ont été étudiées dans le cadre de la protection contre les lésions d'I/R. Bien que leurs multiples propriétés vasculaires, à la fois anti-thrombotiques et anti-inflammatoires, soient des éléments essentiels à l'induction de cette cardioprotection, ces molécules ont également des effets directs au niveau cardiaque.

4.1. Protection induite par l'ApoA-I

De nombreux travaux ont étudié les propriétés cardioprotectrices des HDL et de l'ApoA-I, en utilisant des systèmes de cœur isolé perfusé. Ils sont pour la plupart issus de travaux de l'université de Milan, à l'origine de la découverte de la mutation ApoA-I Milano.

Dans ces modèles *ex vivo* selon la technique de Langendorff, les rHDL composées d'ApoA-I et de PL ont montré de nombreuses propriétés cardioprotectrices. Elles ont en effet permis d'obtenir une réduction de la taille de l'infarctus, corrélée à l'amélioration d'un ensemble de paramètres hémodynamiques. On peut citer l'augmentation de la pression développée par le ventricule gauche (*left ventricular developed pressure*, LVDP), la diminution de la pression de perfusion coronaire (*coronary perfusion pressure*, CPP) ou encore de la diminution de la pression télédiastolique du ventricule gauche (*left ventricular end diastolic pressure*, LVEDP). Cette action bénéfique des HDL, par l'ApoA-I, se manifeste également par la diminution de la libération de marqueurs de souffrance cellulaire et d'inflammation, comme le TNF- α ou les créatines kinases. A l'inverse on observe, en réponse à l'administration d'HDL, la production de facteurs bénéfiques comme la PGI₂ et la prostaglandine E₂ [397-401].

Ce rôle protecteur des HDL, en l'absence de sang circulant et de S1P, décrit probablement une action directe de l'ApoA-I sur les cardiomyocytes. Cette cardioprotection pourrait être médiée par les récepteurs ABCA1 et SR-BI, sans qu'il n'y ait pour l'instant de démonstration claire. Il semble néanmoins que l'ApoA-I ait besoin de partenaires, comme au niveau des CE, pour interagir avec ses récepteurs. En effet, dans toutes ces études, l'ApoA-I ne permet d'obtenir une cardioprotection que lorsqu'elle est sous la forme d'HDL natives ou de rHDL, donc liée à des PL. Il y aurait au niveau des cardiomyocytes le même genre de coopération entre l'ApoA-I et les PL, qu'entre l'ApoA-I et la S1P au niveau des CE. Cette nécessité de l'association de PL à l'ApoA-I pour former des rHDL tient peut-être d'une meilleure conformation spatiale et d'une meilleure présentation de l'ApoA-I à ses récepteurs.

In vivo, les HDL contenant l'ApoA-I ont également démontré des effets protecteurs lors d'administrations chroniques. Dans l'étude de Kiya *et al.*, après une ligature définitive de l'IVA chez le rat, le traitement pendant quatre semaines par des rHDL a permis de diminuer le remodelage et d'améliorer la fonction ventriculaire [402]. Chez l'homme, ces effets anti-inflammatoires et anti-athérogéniques des rHDL contenant l'ApoA-I ont également été étudiés par des traitements de plusieurs semaines [368,370]. En aiguë, l'administration de rHDL, composées d'ApoA-I, diminue les arythmies de reperfusion [403], et l'ApoA-I seule permet de diminuer l'expression des marqueurs de dommages tissulaires et d'inflammation que sont les

créatines kinases, le TNF- α , l'IL-6, ICAM-1 et l'infiltration des neutrophiles [404]. Dans d'autres modèles que la cardioprotection, à savoir la protection rénale et intestinale, l'ApoA-I seule et les rHDL contenant l'ApoA-I, ont montré le même type d'effets sur la diminution de l'expression de ces marqueurs [405-407].

4.2. Protection induite par la S1P

En parallèle de l'action de l'ApoA-I, la S1P est également capable d'agir au niveau myocardique puisque des travaux sur cœur isolé perfusé ont démontré que l'injection de S1P dans le liquide de perfusion était capable d'induire une cardioprotection contre l'ischémie [408-410]. Une découverte intéressante est que cette même S1P est libérée en réponse au conditionnement local, qu'il soit réalisé en pré ou en post-conditionnement [411,412]. De plus, cette protection induite par les HDL et la S1P peut être abolie par différents procédés agissant sur la voie de synthèse et sur la signalisation de la S1P. Les sphingosines kinases, à l'origine de la synthèse de S1P, sont en effet nécessaires à la protection induite par l'IPreC et l'IPostC, puisque l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou de souris déficientes ne mettait pas en évidence une diminution de la taille de l'infarctus [411,413,414]. L'activation de ces kinases par le ganglioside GM-1 stimule également la production de S1P et induit la cardioprotection [408]. Comme pour l'ApoA-I, la cardioprotection induite par la S1P est caractérisée *ex vivo* par la réduction de la taille de l'infarctus et par l'amélioration des paramètres hémodynamiques.

La capacité de la S1P à avoir un effet protecteur *in vivo* a été validée, avec la démonstration que son action peut passer par différents récepteurs. Pour cela des souris déficientes pour S1P₃ ou pour S1P₂ et S1P₃ ont été utilisées, de même que des inhibiteurs spécifiques. Les récepteurs S1P₁, S1P₂, et S1P₃ semblent donc tous les trois avoir un effet sur la cardioprotection induite par la S1P [362,412,415].

Sur des cultures de cardiomyocytes, de nombreuses études ont été menées afin d'explorer les mécanismes impliqués dans la cardioprotection induite par la S1P [416,417]. De la même façon qu'*ex vivo*, les sphingosines kinases ont été mises en évidence comme nécessaires, puisque les cardiomyocytes déficients pour ces enzymes avaient une libération de cytochrome C et une mort cellulaire augmentée [418]. Le ganglioside GM-1, en revanche, était capable de stimuler la synthèse de

S1P et d'induire la survie cellulaire dans des cardiomyocytes naïfs, mais pas dans les cardiomyocytes déficients [418]. Dans ces études *in vitro*, la protection induite par la S1P était de nouveau reliée aux récepteurs S1P₁, S1P₂ et S1P₃ [419,420].

4.3. La signalisation cellulaire mise en jeu

En raison de la variété de récepteurs pouvant lier l'ApoA-I et la S1P, il existe de multiples voies de signalisation intracellulaires qui peuvent induire une cardioprotection *via* les HDL.

Il y a tout d'abord les facteurs habituellement décrits dans la signalisation des HDL, au niveau des cellules endothéliales notamment, à savoir le NO [303,362,403], PI3K/Akt et ERK1/2 [403,419,420]. Ces voies sont décrites comme activées à la fois par l'ApoA-I et la S1P. La protéine effectrice GSK-3 β est elle aussi la cible des HDL, puisqu'elle est phosphorylée, et donc inhibée, en leur présence [416,419].

Ces facteurs de signalisation cellulaires, appartenant plutôt à la voie de survie RISK, sont à mettre en parallèle d'autres médiateurs appartenant à la voie survie SAFE, eux aussi décrits comme impliqués dans la signalisation des HDL.

Alors que le TNF- α est inhibé par les HDL, les souris TNF- α KO sont incapables d'être protégées par les HDL. Cette molécule, pourtant décrite comme un facteur pro-inflammatoire, aurait donc des effets bénéfiques sur la signalisation cellulaire, et notamment celle des HDL, lorsqu'elle est synthétisée en faibles quantités [421 ,422].

L'autre élément de la voie SAFE est le facteur de transcription STAT-3. La liaison du TNF- α sur ses récepteurs induit son activation et donc sa translocation au noyau. En revanche, cette action bénéfique induite par les HDL, disparaît dans des animaux STAT-3 KO [421-423]. D'autres observations, impliquant STAT-3 dans la protection induite par les HDL, la S1P, ou les rHDL contenant la S1P, ont été faites sur cardiomyocytes isolés. STAT-3 y est phosphorylé et sa fixation à l'ADN est ainsi augmentée, pour qu'il puisse jouer son rôle de facteur de transcription en activant l'expression de gènes anti-inflammatoires et anti-apoptotiques. La fraction mitochondriale de STAT-3 est elle aussi augmentée en réponse aux HDL et la S1P,

et cette augmentation est corrélée avec l'inhibition de l'ouverture du mPTP [422,424].

La mitochondrie, et en particulier le mPTP, est la cible finale de ces voies de survie RISK et SAFE. Les HDL sont donc capables, au travers de ces cascades de signalisation, d'agir sur la mitochondrie. Elles ont été clairement démontrées comme empêchant l'activation des caspases et donc de l'apoptose (**Figure 25**) [420,422]. Pour preuve de ce lien entre HDL/voie SAFE/caspases et apoptose, les souris STAT-3 KO présentent une activation plus grande de la caspase 3, et dans les CE, les HDL inhibent l'activation de cette caspase 3 [334,425].

Un autre moyen qu'ont les HDL de protéger contre l'ischémie-reperfusion, c'est de bloquer l'extension de la nécrose myocardique. Pour cela elles peuvent agir au niveau de molécules déjà décrites comme impliquées dans le RIC, et jouant un rôle essentiel dans le maintien des jonctions cellulaires : les connexines-43. Leur perturbation permettrait de dissocier suffisamment les cardiomyocytes pour stopper la propagation de signaux et de facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome C et les caspases. Ces Cx-43 sont phosphorylées par la PKC- ϵ , ainsi que par la voie SAFE *via* JAK/STAT, et participent donc à l'effet des HDL et de la S1P sur la cardioprotection (**Figure 25**) [410,426].

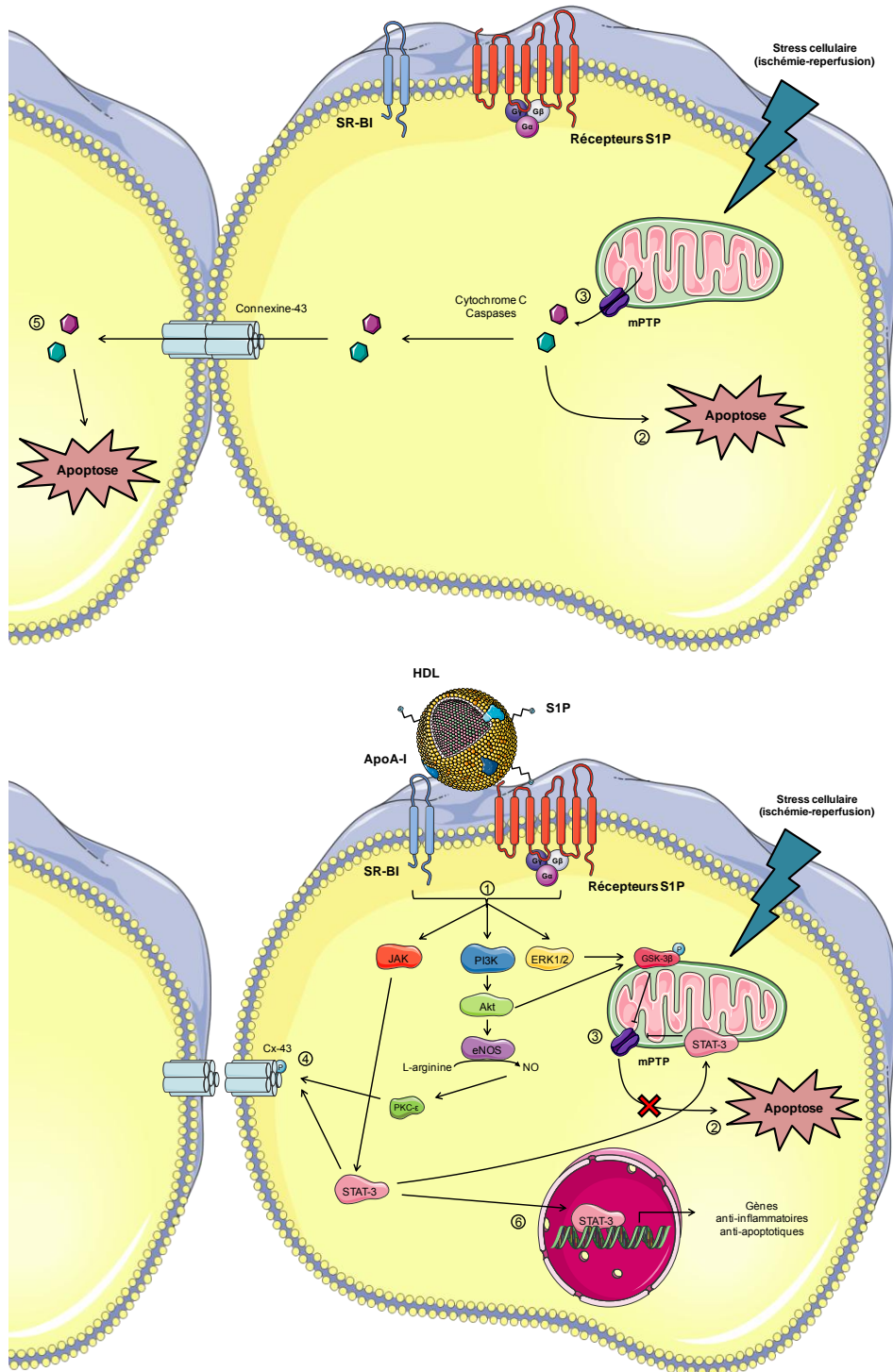


Figure 25. Signalisation des HDL au niveau cardiaque. La fixation des HDL sur leurs récepteurs induit l'activation des voies de survie RISK et SAFE ①. Elles empêchent ainsi l'apoptose ② engendrée par l'ouverture du mPTP à la reperfusion ③. Par l'activation et STAT-3 et de PKC-ε, les HDL peuvent également phosphoryler les connexines-43 (Cx-43) ④ et ainsi empêcher la diffusion de signaux apoptotiques entre les cardiomyocytes ⑤. STAT-3 est également transloqué au noyau pour activer l'expression de gènes anti-inflammatoires et anti-apoptiques ⑥.

5. Récapitulatif

Pour résumer les effets que peuvent avoir les HDL au niveau du système cardiovasculaire, il est nécessaire de bien appréhender leur mode d'action, en fonction du type cellulaire et tissulaire étudié. Il est également important de maîtriser les rôles que vont jouer leurs deux constituants majeurs, l'ApoA-I et la S1P, individuellement. Ces rôles peuvent varier, voire même être contradictoires, et la résultante, en termes d'effet protecteur des HDL, dépend fortement des récepteurs et des voies de signalisation mis en jeu. Dans le cas de l'utilisation d'HDL synthétiques, leur mode d'action sera essentiellement modulé par la présence ou l'absence de ces deux constituants majeurs (**Tableau 1**).

L'ApoA-I se fixe au niveau des récepteurs ABCA1 et SR-BI, et participe ainsi à la régulation du cholestérol cellulaire par les HDL. Ces récepteurs ne sont que très peu impliqués dans des cascades de signalisation cellulaire, ce qui explique l'effet limité de l'ApoA-I dans certains modèles. Au niveau de l'inflammation et des cellules immunitaires, l'ApoA-I semble cependant efficace à la fois *in vivo* et *in vitro*, seule ou liée aux HDL. Elle agit en perturbant la présence de C, et en supprimant les radeaux lipidiques, porteurs de molécules de signalisation à la membrane des cellules. Elle permet ainsi de diminuer leur activation et leur réactivité face à l'inflammation. Dans les études sur les cellules endothéliales, l'ApoA-I possède quelques actions, comme la production de NO, de PGI₂, la diminution de l'expression des molécules d'adhésion. Son effet est cependant moindre que celui observé avec la S1P.

Contrairement à l'ApoA-I, la S1P possède de nombreux récepteurs, couplés à des protéines G, et donc de nombreux effets sur les voies de signalisation cellulaire. C'est la raison pour laquelle cette molécule est efficace *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*, et cela au niveau des cellules endothéliales, des leucocytes et des cardiomyocytes. Elle est notamment décrite comme capable d'activer les voies de survie cellulaire RISK/SAFE alors que l'ApoA-I seule ne l'est pas.

Au-delà de leurs actions isolées, la S1P et l'ApoA-I sont également capables de potentialiser leurs effets. Pour preuve, dans les études *ex vivo* sans sang circulant, l'ApoA-I ne peut pas médier la réponse cardioprotectrice en modulant l'inflammation. Il est donc nécessaire de l'administrer sous la forme de rHDL, associée à des

partenaires moléculaires, comme les PL seuls, ou la S1P et des PL. Elle peut alors induire une cardioprotection, et ce probablement grâce à une meilleure reconnaissance de la particule lipoprotéique au niveau des récepteurs, comparé à l'ApoA-I seule.

Le modèle classiquement décrit est donc celui d'une co-activation des récepteurs ABCA1 ou SR-BI avec les récepteurs à la S1P. La liaison des deux molécules va permettre une meilleure liaison de la particule HDL à la membrane de la cellule cible, et une meilleure induction des cascades de signalisation intracellulaires. Elle permettra également à l'ApoA-I de mieux interagir avec la membrane plasmique, pour jouer son rôle d'épuration du cholestérol.

L'ensemble de ces éléments permet de résumer l'action de l'ApoA-I et de la S1P dans la protection cellulaire, et de mieux comprendre les différences qui peuvent survenir dans leur utilisation. *In vivo* l'ApoA-I peut moduler la réponse leucocytaire mais aussi se lier aux PL et à la S1P circulants dans le plasma, former des HDL et donc avoir de multiples effets. *In vitro* et *ex vivo* seule, elle n'est en revanche que très peu efficace en terme de cardioprotection. La S1P quant à elle est efficace quelque soit ses conditions d'utilisation.

Tableau 1. Tableau récapitulatif des effets des HDL/ApoA-I/S1P.

<i>In vitro</i>	HDL	ApoA-I	S1P	Récepteurs	Effets
Cellules endothéliales	++	+	++	S1PR SR-BI	↑ NO, PGI ₂ ↓ ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine
Leucocytes	++	++	++	S1PR SR-BI/ABCA1	↓ Radeaux lipidiques, adhésion, TRL4, NK-κB
Cardiomyocytes	++	-	++	S1PR	↑ RISK/SAFE ↓ apoptose
<i>Ex vivo</i>	HDL	ApoA-I	S1P	Récepteurs	Effets
	++	-	++	S1PR SR-BI/ABCA1 ?	↑ Paramètres hémodynamiques ↓ TNF-α, taille de l'infarctus
<i>In vivo</i>	HDL	ApoA-I	S1P	Récepteurs	Effets
	++	++	++	S1PR SR-BI/ABCA1	↓ Inflammation, taille de l'infarctus

Abréviation : S1PR, récepteurs à la S1P

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Modèles expérimentaux

Anesthésie

Toutes les expérimentations ont été menées en accord avec le comité régional d'éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire. Tous les animaux ont été traités en accord avec « *The guide for the care and use of laboratory animals* », publié par le « *National Institutes of Health* » (dernière révision en 1996).

Les rats utilisés, des mâles Wistar âgés de 8 à 10 semaines, ont été anesthésiés par une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique à raison de 60 mg/kg de masse corporelle (Penthotal® ; Ceva Santé Animale, France). Après sédation totale, les animaux ont été placés en décubitus dorsal sur une planche de contention en polystyrène. Ils ont été ensuite intubés à l'aide d'une sonde oro-trachéale de 16 gauges de diamètre interne. L'intubation a été réalisée en contrôlant visuellement la filière pharyngo-laryngée. Tout au long de l'expérimentation, l'animal a été ventilé mécaniquement à une fréquence respiratoire de 50-60 insufflations/minutes et une pression inspiratoire de 12 cm H₂O. La ventilation a été réalisée à l'aide d'un respirateur pour petit animal SAR-830/AP (CWE® ; PA, Etats-Unis). La température corporelle a été maintenue à 37±1°C à l'aide d'une couverture chauffante connectée à un régulateur de température relié à une sonde rectale (HB101/2 RS, BIOSEB, France).

Conditionnement à distance

Lorsque les animaux ont été soumis à un préconditionnement à distance celui-ci a été réalisé par la pose d'un clamp vasculaire atraumatique au niveau de l'artère et de la veine fémorale droite, préalablement exposées. L'occlusion complète du flux sanguin était confirmée par l'absence de pulsation au niveau de l'artère et par le collapsus de sa partie distale.

Ischémie-reperfusion myocardique

Pour les rats ayant subi une ischémie-reperfusion myocardique, une sternotomie médiane a été réalisée. Le péricarde a ensuite été réséqué afin de permettre l'exposition de la face antérieure du cœur. Afin de ligaturer l'artère coronaire interventriculaire antérieure gauche, un fil de suture non résorbable a été placé autour de sa partie proximale (fil Premio 7/0 ; Péters surgical®, France). Les extrémités du fil ont été introduites dans un court tube en plastique, appliqué contre la surface épicaudique, directement sur l'IVA, et l'occlusion a été maintenue grâce à un clamp. L'ischémie a été confirmée par le blanchiment et la cyanose du myocarde en aval de la ligature. Une akinésie au niveau de la paroi antérieure du ventricule gauche confirmait également la présence d'une ischémie.

Prélèvements

Deux types de prélèvements ont été réalisés au cours des différentes études.

Il y a tout d'abord l'analyse des plasmas de rats soumis ou non à un conditionnement à distance, mais sans ischémie-reperfusion myocardique. Du sang total a donc été collecté sur des tubes EDTA (Becton, Dickinson and Company ; NJ, Etats-Unis). Pour cela les animaux ont subi une laparotomie et 6 mL de sang a été prélevé en veine cave inférieure.

Les cœurs soumis à 40 min d'infarctus du myocarde ont été prélevés après 15 min ou 2 heures de reperfusion. Dans le premier cas, il s'agissait d'analyser les voies de survie par *western blot* (WB). Dans le deuxième, le prélèvement a permis l'analyse de la taille de l'infarctus ainsi que de l'effet anti-inflammatoire induit par l'ApoA-I.

Groupes expérimentaux

1. Analyse protéomique

Trois groupes de rats ont été constitués (**Figure 26B**) :

- 1) Groupe contrôle (Control) : 20 min de stabilisation puis prélèvement de sang, sans autre intervention ; n=10
- 2) Groupe RIPreC 5' : le RIPreC a été réalisé par 10 min d'occlusion des vaisseaux fémoraux et 5 min de reperfusion de la patte, suivi du prélèvement de sang ; n=10
- 3) Groupe RIPreC 10' : le RIPreC a été réalisé par 10 min d'occlusion des vaisseaux fémoraux et 10 min de reperfusion de la patte, suivi du prélèvement de sang ; n=10

2. Etude du RIPreC par séquences répétées de clampage artériel

- 4) Groupe RIPreC 4*5' : le RIPreC a été réalisé par 4 cycles de 5 min d'occlusion des vaisseaux fémoraux et 5 min de reperfusion de la patte, suivi du prélèvement de sang ; n=6 (**Figure 26B**)

3. Mesure de la taille d'infarctus

Tous les rats ont été soumis à 40 min d'ischémie suivies de 2 heures de reperfusion (**Figure 26A**).

- 5) Groupe MI (*myocardial infarction*) : infarctus seul ; n=9
- 6) Groupe RIPreC + MI : l'infarctus est précédé d'un RIPreC 10' appliqué 20 minutes avant la ligature coronaire ; n=11
- 7) Groupe ApoA-I + MI : Injection intraveineuse d'un bolus d'ApoA-I (Academy Bio-Medical Company, Inc., TX, Etats-Unis) à 10 mg/kg, 10 min avant l'occlusion coronaire ; n=8

4. Analyse des protéines par Western Blot

Tous les rats ont été soumis à 40 min d'ischémie suivies de 15 minutes de reperfusion (**Figure 26A**).

8) Groupe MI : infarctus seul ; n=6

9) Groupe ApoA-I + MI : Injection intraveineuse d'un bolus d'ApoA-I à 10 mg/kg, 10 min avant l'occlusion coronaire ; n=6

5. Evaluation histochimique de l'inflammation

Tous les rats ont été soumis à 40 min d'ischémie suivies de 2 heures de reperfusion (**Figure 26A**).

10) Groupe MI : infarctus seul ; n=2

11) Groupe ApoA-I + MI : Injection intraveineuse d'un bolus d'ApoA-I à 10 mg/kg, 10 min avant l'occlusion coronaire ; n=2

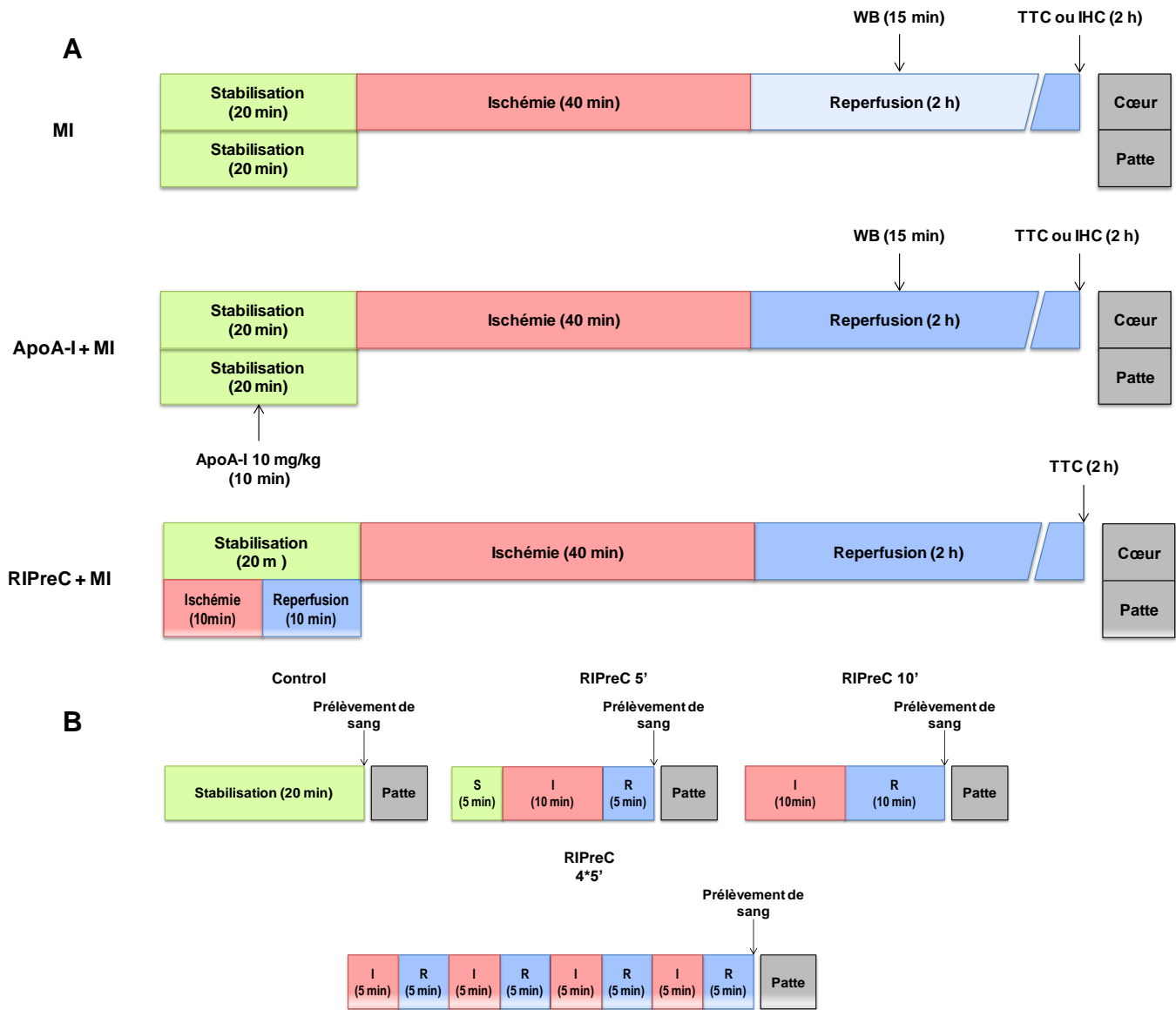


Figure 26. Groupes expérimentaux. Représentation schématique du protocole expérimental appliqué à chaque groupe de rats. **A.** Des rats mâles Wistar ont été divisés en 3 groupes et soumis à 40 min d'occlusion coronaire. Le groupe infarctus seul (MI) n'a reçu aucune autre intervention supplémentaire. Le groupe ApoA-I + MI a reçu l'injection de 10 mg/kg d'ApoA-I sous forme d'un bolus en intraveineuse, 10 min avant l'occlusion coronaire. Le groupe RIPreC + MI a été soumis à un cycle de conditionnement à distance par 10 min d'ischémie de la patte/10 min de reperfusion, 20 min avant l'occlusion coronaire. A la fin des 40 min d'ischémie myocardique, les cœurs ont été reperfusés puis prélevés à différents temps : à 15 min de reperfusion pour l'analyse *western blot* (WB) ; à 2 heures de reperfusion pour la mesure de la taille de l'infarctus par marquage au *triphenyltetrazolium chloride* (TTC) et de l'inflammation par immunohistochimie (IHC). **B.** Pour l'analyse protéomique, et pour les dosages ELISA de l'ApoA-I, des rats ont été soumis à des conditionnements à distance puis prélèvement de sang, sans ischémie myocardique. Il s'agissait d'un cycle unique de 10 min d'ischémie de patte/5 (RIPreC 5') ou 10 min (RIPreC 10') de reperfusion, ou bien de 4 cycles de 5 min d'ischémie de patte/5 min de reperfusion (RIPreC 4*5'). Le groupe Control n'a reçu aucune autre intervention que le prélèvement de sang.

Détermination de la zone à risque et de la taille d'infarctus

Les rats ayant servi à la mesure de la taille d'infarctus ont été soumis à 40 min d'ischémie myocardique puis 2 heures de reperfusion.

Les cœurs ont ensuite été prélevés puis canulés par l'aorte à une seringue contenant du Bleu Evans (Sigma-Aldrich Co, MO, Etats-Unis) dilué à 1% dans du *phosphate-buffered saline* (PBS). Préalablement à la canulation, le fil de suture laissé en place au niveau de l'IVA a été religaturé définitivement. La perfusion du Bleu Evans a été effectuée de façon rétrograde par l'aorte ascendante, et colore donc en bleu tout le tissu myocardique irrigué.

Le ventricule gauche a ensuite été isolé du ventricule droit et des oreillettes, puis rincé pour éliminer le bleu excédentaire. Il a été coupé en 5 à 6 coupes transversales de 1 mm d'épaisseur de l'apex à la base du cœur. Chaque coupe a alors été incubée dans un bain de *triphenyltetrazolium chloride* (TTC ; Sigma-Aldrich Co, MO, Etats-Unis) 1% à 37°C pendant 10-15 min.

Selon le principe de la méthode du TTC, sont colorées en blanc les zones nécrosées, en rouge les zones à risque non nécrosées, et en bleu les zones non à risque.

Les deux faces de chacune des coupes ont été photographiées à l'aide d'un stéréomicroscope Leica (Microscope EZ 4D ; Leica, Allemagne). Afin d'exprimer les rapports d'aire à risque/aire du ventricule gauche et d'aire nécrosée/aire à risque, les aires de ces zones ont été quantifiées à l'aide du logiciel de planimétrie ImageJ (National Institutes of Health, MD, Etats-Unis).

Etude protéomique

Le sang prélevé a été centrifugé pendant 15 min à 1500 g et le plasma a été recueilli et séparé en fractions de 500 μ L (*Cryo Tubes Nunc*; Thermo Fisher Scientific, MA, Etats-Unis), conservées à -80°C. Les plasmas ont été manipulés dans les 2 h suivant le prélèvement et n'ont pas subi plus de 2 cycles de congélation/décongélation avant d'être analysés.

L'analyse protéomique de ces plasmas a été réalisée dans le laboratoire du Docteur Florence Pinet (INSERM, U744 ; Institut Pasteur de Lille ; Université Lille Nord de France).

Equalisation

Chaque échantillon a été traité par une technique permettant l'exploration des protéines minoritaires du plasma (*ProteoMiner® protein enrichment kit*; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis). Reposant sur l'utilisation d'une librairie de peptides complémentaires, elle permet de réduire la gamme dynamique en enrichissant l'échantillon en protéines minoritaires et en réduisant la quantité de protéines majoritaires (**Figure 27**).

Analyse protéomique

Les plasmas ont par la suite été analysés par la technique de *surface-enhanced laser desorption and ionization - time of flight - mass spectrometry* (SELDI-TOF-MS). Cette méthode repose sur la comparaison de profils protéiques et permet de mettre en évidence des variations quantitatives de l'abondance d'une protéine ou d'un fragment protéique dans un mélange comme le plasma.

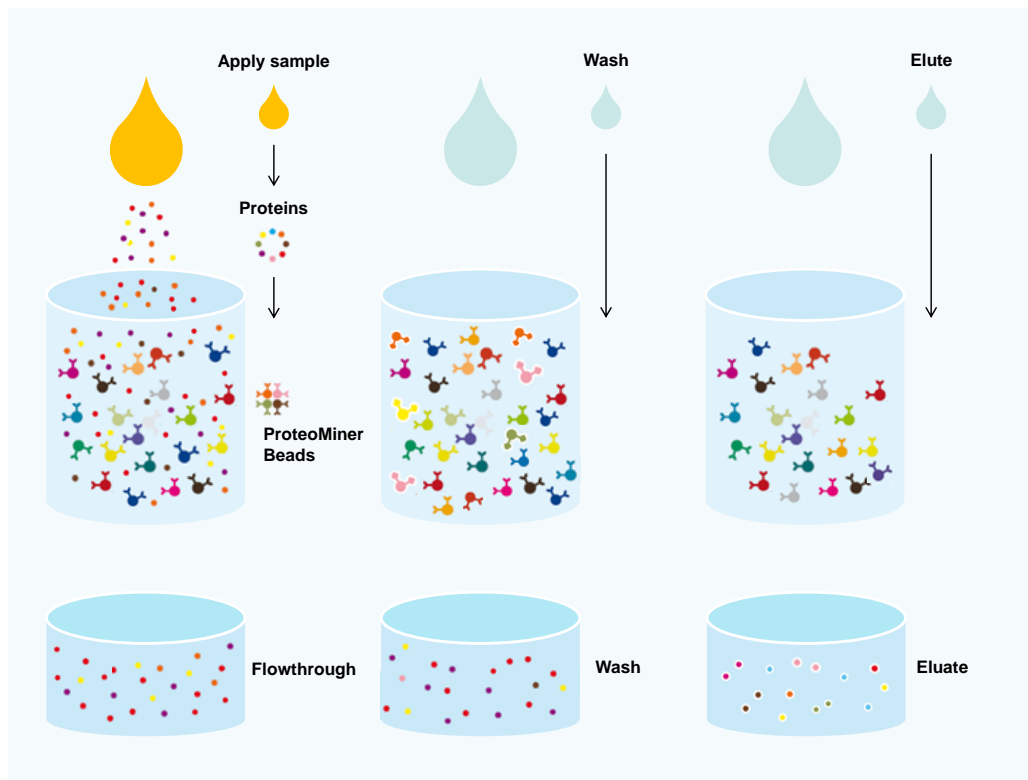


Figure 27. Principe de l'équalisation. Cette technique consiste en l'utilisation d'une librairie d'hexapeptides aléatoires, fixés à des billes de chromatographie, qui vont lier de façon équivalente toutes les protéines du plasma. Ils permettent ainsi de réduire la gamme dynamique en éliminant l'excès de protéines majoritaires non liées tout en enrichissant les protéines de faible abondance.

Les protéines sont adsorbées sur une puce protéique métallique recouverte d'une surface de chromatographie. Elle permet de retenir spécifiquement un type de protéine, en fonction de ses propriétés physicochimiques, et ainsi de simplifier la complexité de l'échantillon. Deux types de puces protéiques ont été utilisées dans cette étude, à savoir des *ProteinChip CM10 arrays* et des *ProteinChip H50 arrays* (Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis). Elles sont respectivement destinées à l'analyse des protéines hydrophiles et des protéines hydrophobes.

Les puces protéiques sont ensuite placées dans un spectromètre de masse (PBS 4000 SELDI-TOF-MS ; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis) qui va permettre de désorber et d'ioniser la préparation, à l'aide d'un faisceau laser pulsé. Une fois ionisées, les protéines de l'échantillon vont pénétrer dans un analyseur de temps de vol qui va permettre de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Les ions de petites tailles, donc de faible rapport m/z , parviendront en premier au détecteur. Ce détecteur enregistre alors l'arrivée des groupes d'ions et les

transforme en signal électrique. Plus il y a d'ions de même rapport m/z plus l'intensité du signal sera forte, signe d'une plus grande abondance de la protéine en question. L'acquisition et le traitement des données se fait grâce à un logiciel informatique (*ProteinChip® Data Manager software* ; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis) (**Figure 28**).

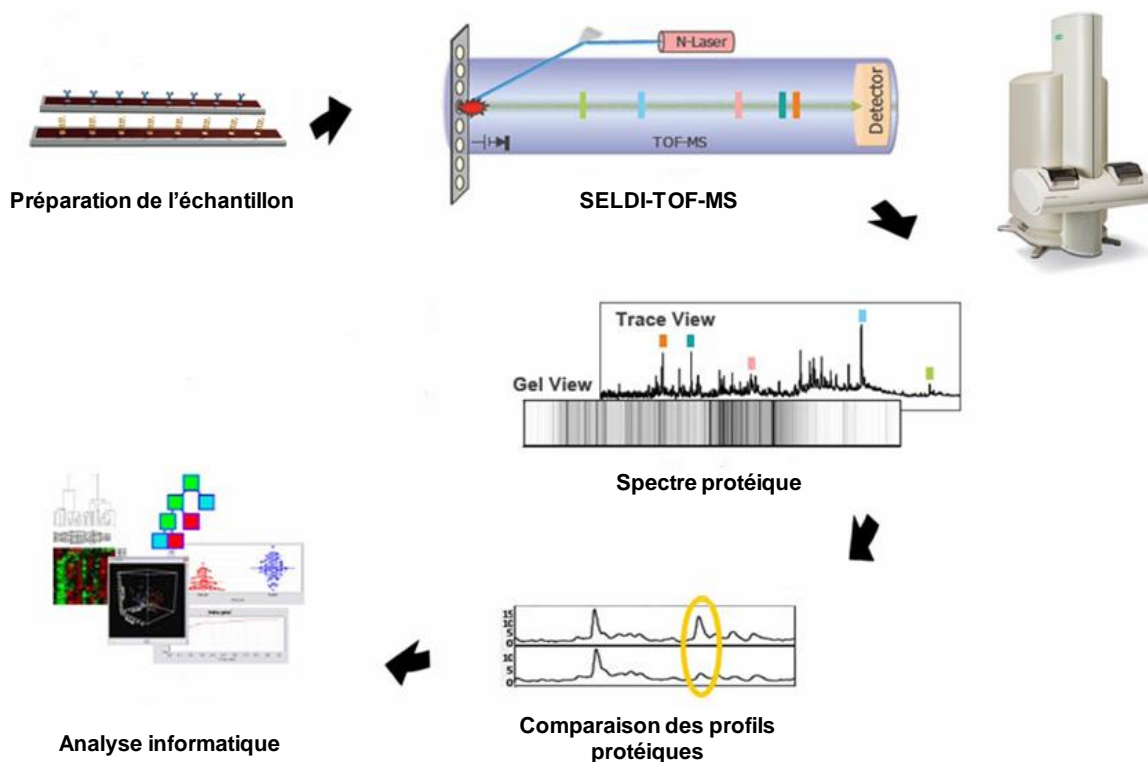


Figure 28. Utilisation de la technologie SELDI-TOF-MS pour l'analyse du protéome plasmatique. Cette technique combine la chromatographie de surface à la spectrométrie de masse. Les plasmas sont d'abord adsorbés sur des puces protéiques et recouverts d'une matrice pour être ensuite ionisés et analysés en spectrométrie de masse en temps de vol. On obtient un spectre protéique représentant les différentes protéines de l'échantillon en fonction de leur rapport m/z . Les profils sont ensuite normalisés et calibrés puis comparés par une analyse informatique afin d'identifier des variations significatives d'intensité entre les groupes. *Adaptée de Fan et al. 2005 [427].*

Nous avons analysé par cette technique l'ensemble des 30 échantillons, à la fois sous leur forme native et sous leur forme égalisée. Chaque plasma a été analysé en double sur chaque condition et à deux intensités laser différentes, afin d'analyser soit les protéines de petites masses soit les protéines de grandes masses.

Nous avons ainsi obtenu un ensemble de spectres protéiques, c'est-à-dire l'ensemble des m/z des protéines et fragments protéiques présents dans l'échantillon. C'est ce qu'on appelle les pics protéiques, ou clusters.

Une fois l'ensemble de profils protéiques obtenus, ils ont ensuite été normalisés et calibrés, puis l'intensité des clusters a été comparée groupe à groupe par une analyse statistique uni-variée avec un test non-paramétrique (Mann-Whitney).

Nous avons ainsi obtenu une liste de 30 pics protéiques sous ou surexprimés dans un des 3 groupes. Chacun de ces pics était caractérisé par sa masse, son intensité moyenne dans chaque groupe, la déviation standard ainsi que par 2 plasmas d'intérêt : celui avec la plus forte intensité, et celui avec la plus faible intensité (**Figure 29**).

N° du cluster	m/z (Da)	Echantillon	Intensité	Intensité moyenne	Déviati on standard
33	13035	Rat 22 – Control	0.642	1.135	0.307
	13034	Rat 37 – RIPreC 10'	2.193	1.599	0.355

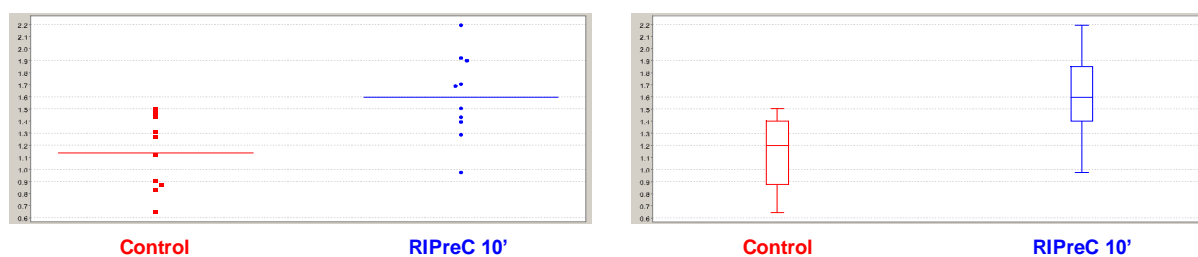


Figure 29. Exemple de caractérisation d'un pic protéique. Le tableau présente les données essentielles concernant le cluster identifié comme significativement modulé. Est représentée graphiquement la différence significative d'intensité du cluster n° 33 entre les plasmas du groupe Control et ceux du groupe RIPreC 10'. La ligne continue représente la moyenne et chaque point représente un échantillon.

Purification des pics protéiques

L'étape suivante consistait à purifier chacun de ces 30 pics afin de les identifier. Cette purification est cruciale et consiste à choisir une stratégie adaptée permettant d'enrichir et de purifier les pics sélectionnés en SELDI-TOF-MS, afin de pouvoir les identifier ensuite par MALDI-TOF-MS/MS.

Pour cela on a utilisé prioritairement le plasma identifié à l'étape précédente comme étant le plus intense pour le pic d'intérêt. Si la mise en évidence du pic a été faite dans les conditions du plasma natif il était nécessaire de réaliser une déplétion en albumine et en IgG avant de purifier le pic protéique (*ProteoPrep® Blue Albumin Depletion Kit* ; Sigma-Aldrich Co, MO, Etats-Unis).

On a ensuite utilisé un ensemble de techniques de purification pour purifier le pic à partir du plasma d'intérêt. Ces techniques ont été utilisées en cascade afin d'obtenir une purification optimale (**Figure 30**) :

- Chromatographie sur colonne : il s'agit d'une résine échangeuse d'ions (*ProteinChip® CM spin columns* ; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis) qui a les mêmes propriétés de liaison et d'élution que les puces CM10 utilisées lors de l'identification par SELDI-MS-TOF. Les échantillons ont donc été déposés sur ces colonnes, élués et fractionnés en augmentant progressivement le pH du tampon d'élution.
- Focalisation isoélectrique en phase liquide : les protéines sont isolées et purifiées en fonction de leur point isoélectrique, grâce à la technique de MicroRotofor (*MicroRotofor™ cell* ; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis).
- Elution hydrophobique : des billes de chromatographie phase inverse (Agilent Technologies, Inc, CA, Etats-Unis) ont été utilisées pour lier les protéines plasmatiques qui ont ensuite été éluées et fractionnées en augmentant le pourcentage d'acétonitrile dans le tampon d'élution de 10% à 70%.

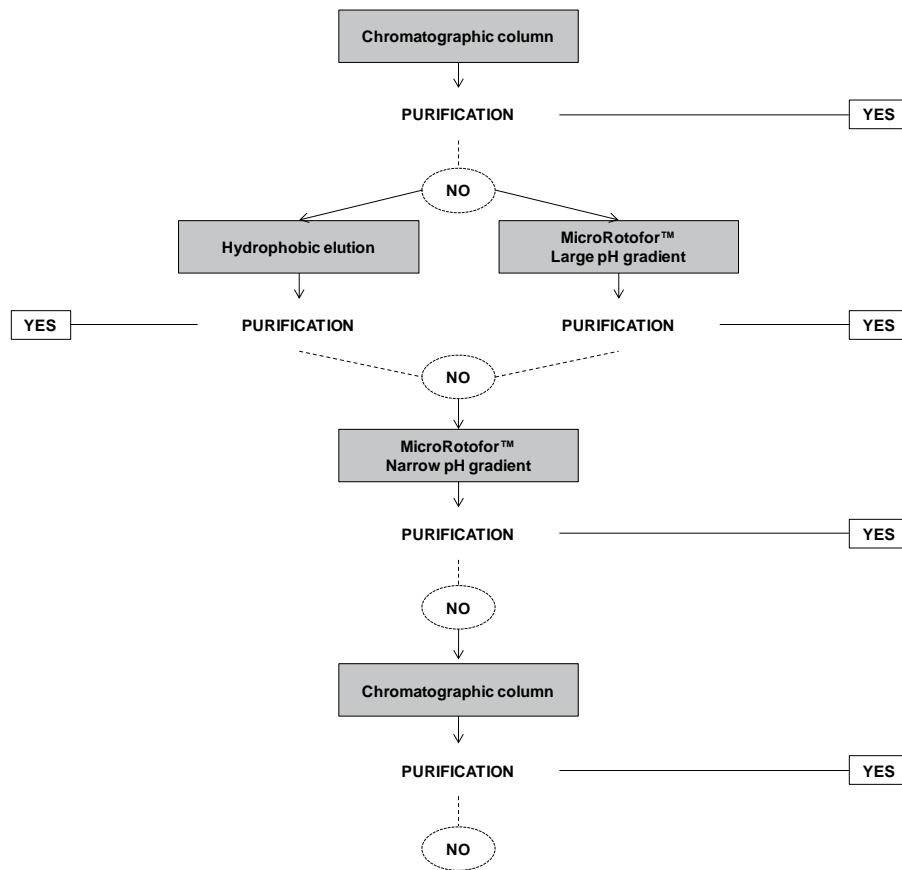


Figure 30. Représentation schématique des étapes de purification. Cet arbre décisionnel consiste en une succession de techniques aboutissant à l'enrichissement et à la purification optimale du pic d'intérêt. *Adaptée de Fertin et al. 2011 [428].*

Une purification optimale se caractérise par la disparition des pics protéiques environnants du pic d'intérêt. Une fois ce résultat atteint, l'échantillon purifié a été mis à migrer sur un gel d'électrophorèse *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) 15% (Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis) coloré au Bleu de Coomassie. Le gel a ensuite été découpé au niveau de la bande protéique, puis celle-ci a été extraite et digérée avec de la trypsine.

Identification par spectrométrie de masse

La digestion tryptique a ensuite été analysée par MALDI-TOF-MS, ce qui a permis d'obtenir l'empreinte peptidique de la protéine, c'est-à-dire la liste des fragments peptidiques après digestion. Cette liste est spécifique d'une protéine. La protéine purifiée a donc pu être identifiée en interrogeant les bases de données bioinformatiques.

Il était ensuite nécessaire de confirmer l'identification de la protéine par la technique de MALDI-TOF-MS/MS. Elle consiste à réanalyser l'échantillon purifié mais cette fois ci chacun des fragments tryptiques est sélectionné par une première spectrométrie de masse, puis fragmenté de nouveau par une deuxième spectrométrie de masse. On obtient ainsi la séquence peptidique exacte de la protéine et on peut confirmer l'identification (**Figure 31**).

Validation par immunodéplétion

Une fois l'identification certifiée, il était nécessaire de s'assurer que les protéines identifiées étaient bien celles correspondant aux pics d'intérêt. On a donc réalisé des immunodéplétions contre ces protéines avec des anticorps spécifiques (**Tableau 2**).

Cette technique repose sur la liaison du fragment Fc des anticorps à des billes de protéine A (*protein A Sepharose 4 Fast Flow beads* ; GE Healthcare, Royaume-Uni). Les anticorps préalablement mis au contact du plasma, et donc ayant lié leur protéine spécifique, vont être éliminés par centrifugation et ainsi dépléter l'échantillon de la protéine d'intérêt. On visualise ensuite la disparition du pic protéique par SELDI-TOF-MS. On valide ainsi l'identification.

Tableau 2. Anticorps utilisés en immunodéplétion.

Désignation	Fournisseur	Référence
Anti-ApoA-I	Bioss Inc	bs-0849R
Anti-ApoA-IV	Santa Cruz Biotechnology	sc-19036
Anti-ApoC-III		sc-50378
Anti-Fibrinogène-β		sc-335581
Anti-Haptoglobine-α		sc-134466
Anti-Hémoglobine-β		sc-31116
Anti-Transthyréline	Abcam	ab-9015

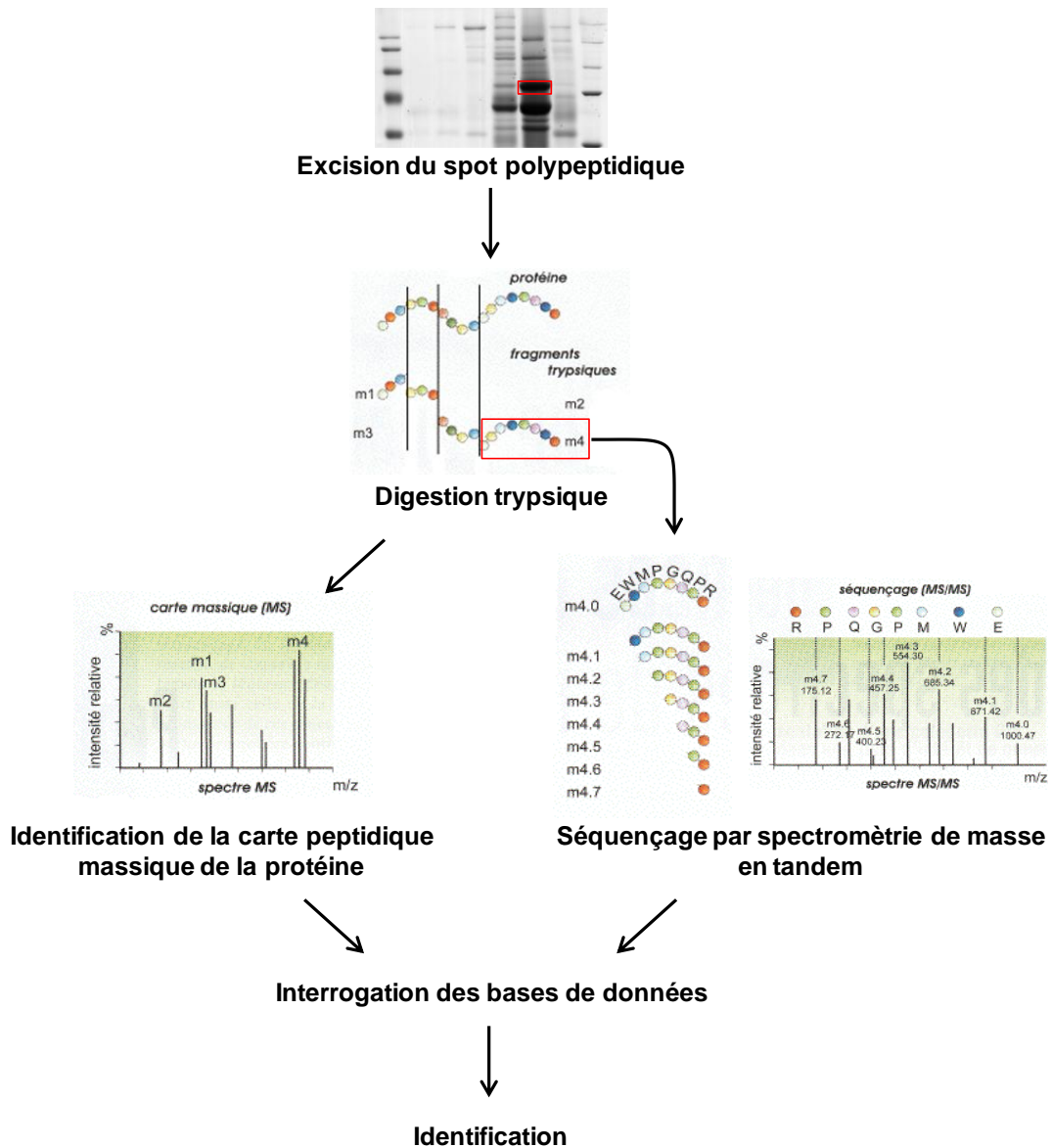


Figure 31. Processus d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Après purification, le pic d'intérêt est isolé par électrophorèse sur gel SDS-PAGE, découpé puis digéré par de la trypsine. Une première analyse est réalisée par MALDI-TOF-MS et permet une identification grâce à l'obtention d'une carte protéique massique. Un séquençage du pic protéique est ensuite réalisé par MALDI-TOF-MS/MS et permet de valider l'identification. *Adaptée de Vandembrouck et al. 2005 [429].*

Dosages plasmatiques de l'ApoA-I

Les concentrations plasmatiques en ApoA-I ont été déterminées dans les plasmas des animaux ayant servi à l'analyse protéomique et à la réalisation du RIPreC 4*5'. La méthode utilisée est un dosage par *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (*Kit for rat apolipoprotein A-I* ; USCN, Life Science Inc., Chine).

100 µL de plasma ont été incubés 2 heures à 37°C sur une plaque préchargée avec des anticorps spécifiques anti-ApoA-I. 100µL d'un anticorps couplé à une biotine ont ensuite été ajoutés aux échantillons.

Après 1 heure à 37°C et plusieurs lavages successifs, de l'avidine couplée à une *horseradish peroxidase* (HRP) a été ajoutée. La plaque a été incubée 30 min à 37°C. De nouveaux lavages ont précédé l'ajout de 90 µL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, permettant la réaction colorée.

Celle-ci a été stoppée par l'ajout d'acide sulfurique, et la densité optique a été mesurée immédiatement par spectrophotométrie à 450 nm (SAFAS, Monaco).

Analyse des protéines par Western Blot

Extraction protéique

Après 15 minutes de reperfusion, les zones à risque des cœurs soumis à l'infarctus ont été collectées et congelées immédiatement dans l'azote liquide. L'extraction protéique a été réalisée après avoir réduit les échantillons en poudre manuellement. Pour cela 100 mg de poudre ont été mis en présence de 400 µL de tampon de lyse (**Tableau 3**) puis homogénéisés mécaniquement (POLYTRON® PT 2100 ; Thermo Fisher Scientific, MA, Etats-Unis). Après 1 heure de centrifugation à 13000 rotations par minute, le surnageant a été récupéré et dosé selon la méthode de Lowry (Bio-Rad DC protein assay kit ; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis) contre une gamme étalon de *bovine serum albumin* (BSA ; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis) allant de 0 à 1450 µg/mL. La densité optique a été lue à 570 nm (*Multiskan Ascent* ; Thermo Fisher Scientific, MA, Etats-Unis).

Tableau 3. Composition du tampon de lyse.

Composé	Concentration
Hepes	30 mM
EGTA	2.5 mM
EDTA	2.5 mM
KCl	20 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
NaF	40 mM
NaPPi	4 mM
Glycerol	10%
Nonidet P40	1%
Inhibiteur de phosphatase	1%
Inhibiteur de protéase	1 pastille/10 mL

La technique du Western Blot

Les extraits protéiques ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (gel SDS-PAGE). Nous avons pour cela utilisé des gels 4-15% (*Mini-PROTEAN[®] TGX[™]* ; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis), placés dans une cuve contenant du tampon de migration (10x *tris/glycine/SDS buffer* ; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis (**Tableau 4**). 50 µg de protéines ont été chargés dans les puits de ces gels, et la migration des protéines a été réalisée à température ambiante pendant 40 min à voltage constant de 200 V.

Tableau 4. Composition du tampon de migration.

Composé	Concentration
Tris Base	25 mM
Glycine	192 mM
SDS	0.1%
	pH 8.3

Une fois la migration terminée, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec grâce à une tension électrique de 25 V pendant 7 min (*Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System* ; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis). La membrane a ensuite été saturée pendant 1 heure à température

ambiante dans du tampon *tris-buffered saline*-Tween (TBS-Tween) contenant 5% de lait écrémé (Régilait, France) (**Tableau 5**).

Tableau 5. Composition du TBS-Tween.

Composé	Concentration
Tris Base	20 mM
NaCl	137 mM
HCL 2 M	0.38%
Tween 20	0.1%
	pH 7.6

Les anticorps primaires spécifiques des protéines recherchées ont alors été incubés durant une nuit à 4°C, après les avoir dilués à leur concentration optimale d'utilisation dans du TBS-Tween contenant 5% de lait écrémé. Après plusieurs lavages au TBS-Tween, la membrane a été mise en présence de l'anticorps secondaire spécifique de l'espèce utilisée pour l'anticorps primaire. Ces anticorps secondaires étaient dilués dans du TBS-Tween contenant 5% de lait, à leur concentration optimale d'utilisation. Ils étaient couplés à une HRP, et l'incubation a eu lieu pendant 1 h à température ambiante (**Tableau 6**).

La révélation des membranes a été faite au sein du laboratoire du Docteur Daniel Henrion : Laboratoire BNMI – UMR INSERM 1083 – UMR CNRS 6214 de l'Université d'Angers. Nous avons utilisé un kit de révélation (*Western Blotting Luminol Reagent* ; Santa Cruz Biotechnology, CA, Etats-Unis) couplé à l'utilisation d'un imageur à détection de chimiluminescence (LAS-3000 mini ; Fujifilm, Japon).

Tableau 6. Récapitulatif des anticorps et des dilutions utilisés en WB.

Anticorps primaires				
Désignation	Fournisseur	Espèce	Référence	Dilution
Anti-p-Akt	Cell Signalling	Lapin	#9271	1/1500
Anti-Akt			#9272	1/1000
Anti-p-ERK1/2			#4370	1/2000
Anti-ERK1/2			#4695	1/1000
Anti-p-GSK-3 β			#9323	1/1000
Anti-GSK-3 β			#9315	1/1000
Anti-p-STAT-3			#9145	1/2000
Anti-STAT-3			#4904	1/1000
Anti-GAPDH	Sigma-Aldrich	Souris	#G8795	1/20000
Anticorps secondaires				
Désignation	Fournisseur	Espèce	Référence	Dilution
Anti-Lapin	Santa Cruz Biotechnology	Chèvre	sc-2004	1/2000
Anti-Souris			sc-2005	1/5000

Les anticorps ont ensuite été décrochés de la membrane à l'aide de 2 bains de 3 min dans un tampon de déshybridation (**Tableau 7**). La membrane a été rincée plusieurs fois au TBS Tween avant d'être de nouveau saturée avec du TBS-Tween contenant 5% de lait. Nous avons ainsi pu effectuer un autre cycle d'hybridation, avec un nouvel anticorps.

Tableau 7. Composition du tampon de déshybridation.

Composé	Concentration
Tris HCL	62.5 mM
β -Mercaptoéthanol	100 mM
SDS	2%
	pH 6.8

L'intensité des bandes obtenues avec le logiciel d'acquisition a été quantifiée grâce au logiciel ImageJ (National Institutes of Health, MD, Etats-Unis).

Analyses histochimiques

Coupes de cœur

Les cœurs de rats ont été prélevés à la fin des 2 heures de reperfusion et congelés rapidement dans du milieu d'enrobage (*Freeze Gel*; Labonord SAS, France). Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées à l'aide d'un Cryostat CM3050 S (Leica Biosystems, Allemagne), au sein du laboratoire du Docteur Joël Eyer (Laboratoire LNBT - UPRES EA. 3143 de l'Université d'Angers).

Marquages

Des sections médio-ventriculaires ont été marquées afin d'étudier l'architecture histologique et l'infiltration leucocytaire, en réponse à l'infarctus.

1. Hématoxyline-Eosine

La coloration hématoxyline-éosine (HE) se décompose en plusieurs étapes successives. Les coupes de tissus ont tout d'abord été colorées 10 min à l'hématoxyline (Sigma-Aldrich Co, MO, Etats-Unis) afin de marquer les noyaux en bleu-violet. Après rinçage pour évacuer l'excédent de colorant, les coupes ont été colorées à l'éosine (Sigma-Aldrich Co, MO, Etats-Unis), également pendant 10 min. Les cytoplasmes des cellules sont ainsi colorés en rose-rouge. Après rinçage, les coupes ont été déshydratées par des bains successifs dans différents solvants : des bains d'alcool à 70°, 95° puis 100°, puis deux bains de xylène.

Les lames ont ensuite été montées à l'aide d'un milieu de montage (Eukitt®; O. Kindler GmbH & Co, Allemagne).

2. Marquage immunohistochimique CD45

Pour confirmer de façon spécifique l'infiltration leucocytaire dans les tissus infarcis, un marquage immunohistochimique CD45 a été réalisé. Pour cela les coupes médio-ventriculaires ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes, puis lavées 30 minutes dans du PBS. Une saturation de 30 minutes

dans de la BSA a été réalisée puis les coupes ont été incubées sur la nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-CD45 diluée au 1:100 (F10-89-4, Souris, Merck Millipore, Allemagne). Après plusieurs lavages les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire 1 heure à température ambiante (1:300, chèvre anti-souris Alexa-Fluor 488, Invitrogen, CA, Etats-Unis). Les noyaux ont été marqués avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (1:300, Sigma-Aldrich Co, MO, Etats-Unis) pendant 10 minutes à température ambiante. Après plusieurs lavages, les coupes ont été recouvertes d'une lamelle en verre avec du milieu de montage (*Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium* ; Sigma-Aldrich Co, MO, Etats-Unis).

3. Lecture des marquages

Les images des marquages HE et CD45 ont été obtenues à l'aide d'un microscope Leica (Microscope DMR; Leica, Allemagne - ImageJ software ; National Institutes of Health, MD, Etats-Unis).

Le nombre de cellules leucocytaires CD45⁺ a été évalué de façon semi-quantitative selon la procédure suivante :

- Un marquage positif de l'anticorps était caractérisé par une fluorescence verte circulaire au niveau de la membrane.
- Le nombre de cellules positives par champs au grossissement x400 a été compté.
- Les champs étaient choisis aléatoirement sur les échantillons, sans jamais analyser deux fois le même champ.
- 10 champs par rat ont été analysés dans la zone infarctée.
- Le nombre moyen de cellules positives par champs a été calculé et exprimé par rapport à une unité de surface (mm²).

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS 17.0 (SPSS Inc, IL, Etats-Unis). Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm erreur standard de la moyenne et le seuil de significativité est fixé à 0.05.

Les clusters des spectres protéiques ont été analysés par une analyse uni-variée avec un test non paramétrique pour calculer le p de chaque cluster. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les groupes deux à deux et un test de Kruskal-Wallis pour comparer les trois groupes ensemble.

D'une façon similaire, nous avons appliqué les tests Kruskal-Wallis et Mann-Whitney pour l'analyse des dosages de l'ApoA-I par ELISA.

Les données concernant les tailles d'infarctus ont été traitées par un test d'analyse de la variance à 1 facteur (*analysis of variance*, ANOVA) suivi par un test *post-hoc* de Bonferroni.

L'analyse de la mortalité entre les groupes expérimentaux a été réalisée grâce à un χ^2 de Pearson.

TRAVAUX ET RÉSULTATS

Identification de facteurs circulants du préconditionnement ischémique à distance par une approche protéomique

Introduction

La cardioprotection induite par le conditionnement ischémique à distance est aujourd'hui une réalité à la fois au niveau préclinique sur l'animal, mais également dans certaines applications en clinique humaine [103,110]. De multiples études ont depuis deux décennies cherché à identifier les facteurs pouvant être à l'origine du transfert de cette cardioprotection de l'organe à distance jusqu'au cœur.

Comme décrit plus tôt, trois voies de signalisation sont envisagées, notamment la voie humorale et la voie neuronale, pour expliquer la transmission du signal protecteur de l'organe conditionné vers le cœur. Bien que la voie neuronale présente des arguments solides démontrant l'implication du système nerveux dans la capacité protectrice du RIC [111], c'est la voie humorale qui a fait l'objet de cette étude.

Plusieurs familles de molécules ont été décrites comme impliquées dans cette voie humorale du RIC, tels que les opioïdes [84] ou les endocannabinoïdes [154], mais aucune étude n'avait pour le moment réussi à identifier des facteurs humoraux de cette cardioprotection à distance. Elles ont cependant, et ce malgré des limites évidentes dans la conception et dans l'interprétation des expériences, « ciblé » la nature et la taille du ou des facteurs circulants de ce RIC. Ils sont décrits comme des protéines hydrophobes avec une taille comprise entre 3.5 et 30 kDa [94].

Le développement et l'amélioration récente des techniques d'analyse du protéome plasmatique [430,431] ont permis d'envisager une autre approche du RIC et de ses facteurs circulants. Ils ont notamment permis de s'affranchir des anciennes méthodes de filtration et de séparation par dialyse et chromatographie. Il est maintenant possible de travailler sur plasma entier, avec une large gamme dynamique de protéines pouvant être analysée, à la fois en terme de taille et de

nature chimique. Ces nouvelles méthodes permettent donc une analyse sans a priori des facteurs circulants pouvant être impliqués dans le RIC.

Dans ce travail, nous avons donc mis à profit une technique protéomique, le SELDI-TOF-MS, afin d'analyser le protéome plasmatique de rats contrôles et de rats ayant subi un RIPreC.

Nous avons ainsi pu comparer le profil protéique des rats de ces deux conditions, et identifier des protéines dont l'expression était significativement modulée suite au conditionnement à distance. Ces protéines, au nombre de 8, sont donc des facteurs circulants potentiels du RIPreC.

Parmi ces facteurs, une protéine en particulier a fait l'objet de travaux complémentaires. Il s'agit de l'apolipoprotéine A-I, dont la littérature très riche sur ses propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques, laissait supposer d'un effet cardioprotecteur possible. Nous avons donc cherché à mettre en évidence si cette ApoA-I était capable *in vivo* d'induire une cardioprotection similaire à celle induite par le RIPreC, et ainsi d'être décrite comme un facteur circulant identifié dans la réponse humorale au RIPreC.

Publication n°1

Apolipoprotein A-I Is a Potential Mediator of Remote Ischemic Preconditioning

Pierre Hibert^{1,2}, Delphine Prunier-Mirebeau^{1,3}, Olivia Beseme^{4,5,6}, Maggy Chwastyniak^{4,5,6}, Sophie Tamareille^{1,2}, Delphine Lamon², Alain Furber^{1,2,7}, Florence Pinet^{4,5,6,8}, Fabrice Prunier^{1,2,7*}

1 L'UNAM Université, Angers, France, **2** Laboratoire Cardioprotection, Remodelage et Thrombose, Université d'Angers, Angers, France, **3** INSERM U771, CNRS UMR 6214, Département de Biochimie et Génétique, Université d'Angers, CHU Angers, Angers, France, **4** INSERM, U744, Lille, France, **5** Institut Pasteur de Lille, Lille, France, **6** Université Lille Nord de France, IFR142, Lille, France, **7** Service de Cardiologie, CHU Angers, Angers, France, **8** Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Lille, France

Abstract

Background: Remote ischemic preconditioning (RIPC) has emerged as an attractive strategy in clinical settings. Despite convincing evidence of the critical role played by circulating humoral mediators, their actual identities remain unknown. In this study, we aimed to identify RIPC-induced humoral mediators using a proteomic approach.

Methods: and Results Rats were exposed to 10-min limb ischemia followed by 5- (RIPC 5') or 10-min (RIPC 10') reperfusion prior to blood sampling. The control group only underwent blood sampling. Plasma samples were analyzed using surface-enhanced laser desorption and ionization - time of flight - mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). Three protein peaks were selected for their significant increase in RIPC 10'. They were identified and confirmed as apolipoprotein A-I (ApoA-I). Additional rats were exposed to myocardial ischemia-reperfusion (I/R) and assigned to one of the following groups RIPC+myocardial infarction (MI) (10-min limb ischemia followed by 10-min reperfusion initiated 20 minutes prior to myocardial I/R), ApoA-I+MI (10 mg/kg ApoA-I injection 10 minutes before myocardial I/R), and MI (no further intervention). In comparison with untreated MI rats, RIPC reduced infarct size ($52.2 \pm 3.7\%$ in RIPC+MI vs. $64.9 \pm 2.6\%$ in MI; $p < 0.05$). Similarly, ApoA-I injection decreased infarct size ($50.9 \pm 3.8\%$; $p < 0.05$ vs. MI).

Conclusions: RIPC was associated with a plasmatic increase in ApoA-I. Furthermore, ApoA-I injection before myocardial I/R recapitulated the cardioprotection offered by RIPC in rats. This data suggests that ApoA-I may be a protective blood-borne factor involved in the RIPC mechanism.

Citation: Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Beseme O, Chwastyniak M, Tamareille S, et al. (2013) Apolipoprotein A-I Is a Potential Mediator of Remote Ischemic Preconditioning. PLoS ONE 8(10): e77211. doi:10.1371/journal.pone.0077211

Editor: Philippe Rouet, I2MC INSERM UMR U1048, France

Received: July 4, 2013; **Accepted:** September 4, 2013; **Published:** October 14, 2013

Copyright: © 2013 Hibert et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Delphine Lamon and Pierre Hibert were supported by fellowships from Servier and Conseil Général du Maine et Loire, respectively. This work was supported in part by grants from ANR (ANR-11-EMMA-029-01) and the Fondation Coeur & Recherche. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: faprunier@chu-angers.fr

Introduction

Local ischemic preconditioning, which consists of transient non-lethal episodes of myocardial ischemia before a prolonged ischemia-reperfusion (I/R) cardiac injury, is well recognized as one of the most potent innate cardioprotective mechanisms. However, it necessitates direct application of invasive procedures to the myocardium in order to attain cardioprotection, which could be harmful in clinical settings. An alternative strategy is to apply the cardioprotective stimulus to an organ or tissue far from the heart, an approach entitled remote ischemic preconditioning (RIPC) [1,2]. Short periods of I/R of various remote tissues, including the intestine [3], kidney [3,4], and skeletal muscle [5], were reported to protect the myocardium and other tissues from I/R injury [6]. With no need for invasive procedures, RIPC using transient limb ischemia as a stimulus has emerged as an attractive strategy in clinical settings [2,7]. This strategy was shown to attenuate myocardial injury in patients undergoing corrective cardiac surgery for congenital heart disease [8], coronary bypass surgery [9], elective surgery for abdominal aortic aneurysm [10],

and elective percutaneous coronary interventions (PCI) [11]. Recently, intermittent arm ischemia with four cycles of 5-min inflation and 5-min deflation of a blood pressure cuff, in the ambulance during transfer to primary PCI, has been shown to significantly increase myocardial salvage [12]. The protective mechanisms underlying remote ischemic conditioning are still unclear. However, there is convincing evidence for the critical role played by humoral mediators transported through the circulation [13–16]. Yet, the actual identity of the humoral mediators remains undetermined.

Proteomic analysis provides an expanded approach to the study of biomarkers selected to a non *a priori* basis. Surface-enhanced laser desorption and ionization - time of flight - mass spectrometry (SELDI-TOF-MS), which is a combination of both chromatography and mass spectrometry (MS), is a sensitive method for accessing proteolytic fragments from major plasma proteins [17]. Therefore, this study was designed to identify potential RIPC-induced humoral mediators via SELDI-TOF-MS technology.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institute of Health [NIH publication 85 (23), revised in 1996]. Protocols have been approved by our regional ethic committee: Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale-Pays de la Loire (N°CEEA.2012.50). All surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Animal Studies

Two animal studies were conducted. Study 1 was performed in order to identify RIPC-induced circulating factors by proteomic analysis. Study 2 was carried out in order to verify the potential cardioprotective effect of the circulating factor identified, notably apolipoprotein A-I (ApoA-I), in a myocardial I/R model.

For Study 1, 8- to 10-week-old male Wistar rats were anesthetized with 60 mg/kg of intraperitoneal sodium pentobarbital (Céva santé Animal, France) and orotracheally intubated with a 16-gauge tube. Animals were ventilated using a small animal ventilator at a rate of 50–60 breaths per minute (SAR-830 A/P, CWE). The body core temperature was continuously monitored during the procedure and maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ using a homeothermic blanket, connected to a temperature control unit (HB101/2 RS, Bioseb, France).

Rats were randomly assigned to one of three groups: Control (which endured no further intervention, but blood sampling only, $n = 10$); RIPC 5' (blood sampling 5 minutes after the end of limb ischemia, $n = 10$); RIPC 10' (blood sampling 10 minutes following the end of limb ischemia, $n = 10$). RIPC was achieved using a vascular clamp placed on the upper right femoral artery in order to occlude arterial blood flow for 10 minutes, followed by reperfusion. Limb ischemia was confirmed by a change in skin color and a decrease in subcutaneous limb temperature. Following limb reperfusion, the skin color turned back to a pink color, while the under-skin temperature reached the baseline temperature. Blood samples were collected from the inferior vena cava 5 or 10 minutes after limb reperfusion using glass tubes that contained the anticoagulant ethyldiamine tetraacetic acid (EDTA). Plasma samples were immediately processed, divided into aliquots of 500 μL , and stored at -80°C . These samples underwent no more than two freeze/thaw cycles prior to analysis.

For Study 2, 8- to 10-week-old male Wistar rats were used. All animals were anesthetized via intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg) (Céva santé Animal) and endotracheally intubated with a 16-gauge tube. Animals were ventilated using a small animal ventilator (SAR-830 A/P, CWE). Body core temperature was continuously monitored throughout the surgical procedure and maintained at $36\text{--}38^\circ\text{C}$ using a homeothermic blanket, connected to a temperature control unit (HB101/2 RS, Bioseb, France). The chest was opened via median sternotomy. The pericardium was removed, the heart was exposed, and a 7.0 monofilament suture (Premio 7.0, Peters Surgical) was placed around the proximal portion of the left anterior descending coronary artery (LAD) and passed through a short piece of tubing (PE50) in order to create a reversible snare. Following cardiac stabilization, coronary occlusion was initiated by clamping the snare onto the epicardial surface directly above the coronary artery. Ischemia was confirmed by epicardial cyanosis below the suture and dyskinesia of the ischemic region. Following 40 minutes of occlusion, reperfusion was achieved by loosening the snare and confirmed by a marked hyperemic response on reperfusion. Three

groups were constituted: MI (myocardial I/R alone, $n = 11$); RIPC+MI (10-min limb ischemia followed by 10-min reperfusion initiated 20 minutes before coronary artery occlusion, $n = 13$); ApoA-I+MI (ApoA-I injection 10 minutes before coronary artery occlusion, $n = 10$). RIPC was performed as described in Study 1. ApoA-I (Academy Bio-Medical Company, Inc. Houston, TX, USA) was injected intravenously as a bolus of 10 mg/kg. The dose was chosen to assess ApoA-I afforded cardioprotection in accordance with the literature that describes protective effects of ApoA-I in a range from 5 mg/kg to 25 mg/kg [18–20]. Infarct size was measured at the end of the 2-hour reperfusion period.

Area at Risk and Infarct Size Determination

The heart was removed and the LAD reoccluded using the monofilament suture kept in place. The heart was then retrogradely perfused with Evans blue (1%) in order to delineate the area at risk (AAR). The heart was then cut into five to six slices from the apex to the base followed by incubation at 37°C in a 1% solution of phosphate-buffered 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) so as to delineate the infarcted myocardium. Slices were then fixed in 10% formalin, and the infarct size was quantified by computerized planimetry using image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The area of necrosis was expressed as a percentage of AAR (INF%AAR), and AAR as a percentage of the total left ventricular area (AAR%LV).

Seldi-TOF-MS Profiling

Samples (200 μL) were pretreated with the ProteoMiner[®] protein enrichment kit, based on a combinatorial peptide ligand library (CPLL) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), as previously described [21]. Elution samples (20 μL repeated three times) were pooled and stored at -20°C .

Collected samples were profiled using SELDI-TOF-MS analysis. Native and CPLL treated forms of all samples were analyzed using CM10 (weak cation exchanger) and H50 (reverse phase) ProteinChip[®] Arrays (Bio-Rad Laboratories). Each of these samples was tested in duplicate and randomly distributed on arrays, as previously described [21]. All data was processed using ProteinChip[®] Data Manager software. Peaks were detected automatically. Groups of peaks with similar mass across the spectra were assembled into clusters, according to two-step parameter settings, as previously described [21]. The m/z range was set between 3,000 and 30,000 for low-mass proteins, and between 20,000 and 150,000 for high-mass proteins.

Proteins corresponding to the peaks found at m/z 27583–27791 and 28284 were isolated and purified by liquid-phase isoelectric focusing (IEF) via the MicroRotor cell (Bio-Rad Laboratories), as previously described [22]. A 30 μL CPLL-treated plasma sample was diluted with an IEF buffer solution (7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, CHAPS 4% [w/v], and 0.24% Triton X100), glycerol (5% v/v), and ampholytes (pH range 4–6, 1.6% v/v). Focusing was performed at room temperature, under a constant power of 1W. At the end of IEF, protein fractions from each compartment (200 μL) were harvested quickly in order to avoid the diffusion of separated proteins, and a 2-D Clean-Up kit (GE Healthcare) was used in order to precipitate proteins. Precipitation was performed to selectively discard contaminants from the proteins. Finally, the pellet was suspended in 20 μL of de-ionized water and stored at -20°C . The detection of peaks (5 μL) was performed on ProteinChip[®] NP20 array.

Fractions containing the purified peaks were separated on a 15% SDS-PAGE gel (Bio-Rad Laboratories), stained with Coomassie Brilliant Blue, as described by Neuhoff *et al.* [23].

Protein Identification by Mass Spectrometry

Proteins were then identified by an in-gel digestion procedure, as previously described [24]. Briefly, the band of interest was excised, and the gel plugs were washed with ultrapure water until the stain was completely removed. Next, gel excisions were rinsed several times and rehydrated with a solution containing 0.025% ProteasMAX™ Surfactant, Trypsin Enhancer (Promega) in 50 mM ammonium bicarbonate, and 3 μ L of 40 μ g/mL Trypsin Gold (Promega) in 50 mmol/L acetic acid. Following overnight digestion at 37°C, peptide extraction was carried out in a two-step procedure in accordance with the manufacturer's protocol for ProteasMAX™ Surfactant, Trypsin Enhancer. For acquisition of the mass spectra of the extracted and desalted peptides, 0.5 μ L of the peptide solution was mixed with 0.5 μ L of matrix solution (5 mg/mL of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid dissolved in 0.1% TFA/50% ACN) on the matrix assisted laser desorption and ionization – time of flight – mass spectroscopy (MALDI-TOF-MS) target. External calibration was performed with a peptide mixture resultant from the tryptic digest of BSA (0.5 μ g/mL). MALDI-TOF-MS was then performed with a Voyager DE STR mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) equipped with a 337.1 nm nitrogen laser and a delayed extraction facility (125 msec). All spectra were acquired in a positive ion reflector mode at the voltage of 20 kV, with grid-voltage of 61%. Typically, 300 laser shots were recorded per sample. Following this, the mass spectra were calibrated prior to protein identification by peptide mass fingerprinting, conducted by running the MASCOT web searcher (<http://www.matrixscience.com/>, Matrix Science, UK) against the Swissprot 57-15 (515203 sequences; 181334896 residues) with the following parameters: fixed modifications: carbamidomethyl (C) and variable modifications: oxidation (M); peptide mass tolerance: \pm 50 ppm; peptide charge state: 1+; max missed cleavages: 1; taxonomy: rattus.

Identification was validated by immunodepletion using a specific rabbit anti-apolipoprotein A-I antibody (Bioss Antibody: bs-0849R). A sample of 10 μ g of antibody was incubated with 5 μ L of native plasma in 500 μ L of IP buffer (Triton X-100 1%, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, sodium vanadate 0.1 mmol/L, and NP40 0.5% in Tris-HCl 10 mmol/L) at 4°C, as previously described [25]. Subsequent to overnight incubation, 50 μ L of protein A Sepharose 4 Fast Flow beads (GE Healthcare) were added, and the preparation was rotated end-to-end for 4 hours at 4°C. Antibodies were removed from the plasma using treated protein A-sepharose beads and saved. Immunodepleted and undepleted plasma were compared by SELDI analysis on ProteinChip® H50 array; a loss of the peak of interest was visualized when compared to untreated plasma.

Validation by Quantification of Plasma Apolipoprotein A-I by ELISA

Concentrations of ApoA-I were determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit for rat apolipoprotein A-I (USCN, Life Science Inc., Wuhan, China) [26,27], in the 30 plasma samples obtained from the rats used in the proteomic study. The ApoA-I ELISA test has a sensitivity of 6.2 ng/mL and is reported to exhibit no cross-reactivity with other analogues.

Statistical Analysis

All values were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Due to its nonlinear distribution, we elected to apply a non-parametric test for independent samples on ApoA-I quantification by ELISA. We performed the Kruskal-Wallis test followed by a

Mann-Whitney test. After testing their linear distribution, differences between infarct sizes were evaluated using one-way ANOVA, followed by the *post-hoc* Bonferroni test. Pearson's chi-squared test was used to compare mortality rates between groups. Clusters of all spectra obtained using SELDI-TOF-MS were subjected to univariate analysis, with a non-parametric test to calculate the *p* value of each cluster, and a Mann-Whitney test to compare groups in pairs. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Identification of Apolipoprotein A-I as an RIPC-induced Circulating Factor in Rats

Profiling of plasma samples (CPLL-treated or in native form) from Control, RIPC 5', and RIPC 10' groups was performed in duplicate using SELDI-TOF-MS technology on ProteinChip® CM10 or H50 arrays. From a total of 207 peaks detected for low-mass proteins (89 for CM10, 118 for H50) and 164 peaks for high-mass proteins (74 for CM10, 90 for H50), 30 SELDI peaks displayed significant modulation relative to their RIPC groups, with 15 being increased and 15 decreased.

We focused on three peaks, exhibiting 27583, 27791, and 28284 *m/z*, with significantly different mean levels between the RIPC 5' and RIPC 10' rats (**Table 1**). **Figure 1A** presents a detailed representative spectrum for one rat from each group, Control, RIPC 5', and RIPC 10'. **Figure 1B** demonstrates the individual intensity for each peak in the three groups. Interestingly, we observed an increased intensity for the three peaks at 10-min reperfusion compared to 5-min reperfusion, in favor of protein release.

Purification of the three peaks by liquid-phase IEF and gel electrophoresis (**Figure 2A**) combined with mass spectrometry successfully identified the peaks as being apolipoprotein A-I (ApoA-I) (**Figure 2B, Table 2**). We verified the identification of ApoA-I peaks using a specific polyclonal antibody. Immunodepletion significantly reduced the three peaks (**Figure 2B**), thereby confirming the identification of 27583, 27791, and 28284 *m/z* peaks as ApoA-I.

ELISA was used to verify the concentrations of plasma ApoA-I in the three groups of rats that were used for proteomic analysis. Plasmatic levels of ApoA-I were found to be upregulated in RIPC 10' group (**Figure 3**), as detected via SELDI profiling. Undeniably, a 30.2% increase was observed between Control and RIPC 10' groups (1.06 ± 0.04 vs. 1.38 ± 0.11 g/L, respectively; *p* = 0.01). In line with the SELDI-TOF-MS study, no significant release of ApoA-I was visualized in RIPC 5' when compared to Control (1.07 ± 0.09 vs. 1.07 ± 0.04 g/L, respectively; *p* = 0.48).

Cardioprotective Effect of ApoA-I as RIPC in MI Rats

In Study 2, rats were exposed to 40 minutes of myocardial ischemia followed by 2 hours of reperfusion. Three groups were constituted: Control (MI, myocardial I/R alone), RIPC+MI (10-min limb ischemia followed by 10-min reperfusion initiated 20 minutes prior to coronary artery occlusion), and ApoA-I+MI (ApoA-I injection 10 minutes prior to coronary artery occlusion), as illustrated in **Figure 4A**. The mortality rate was similar in all MI groups: 18% in MI, 15% in RIPC+MI, and 20% in ApoA-I+MI, with *p* = 0.96. As shown in **Figure 4B**, the ischemic area induced by LAD ligation (AAR%LV) did not differ among the three groups (MI = $29.18 \pm 2.96\%$, *n* = 9; RIPC+MI = $30.90 \pm 2.54\%$, *n* = 11; ApoA-I+MI = $24.41 \pm 1.63\%$, *n* = 8; *p* = 0.21). RIPC induced a smaller infarct size when compared to untreated MI rats (INF%AAR = $52.21 \pm 3.72\%$ in

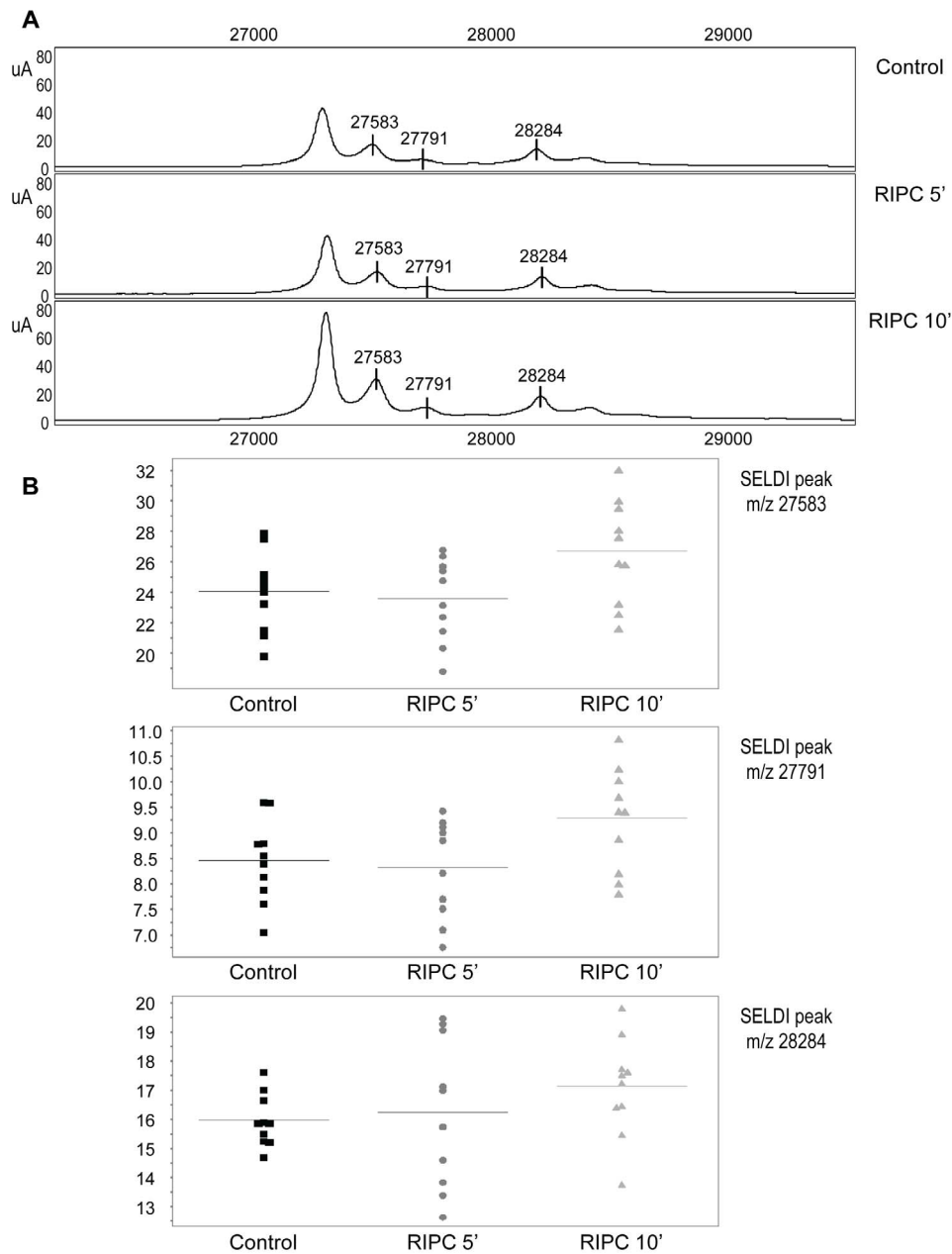


Figure 1. Illustration of protein spectra and *m/z* means of cases and controls. (A) Representative SELDI-TOF-MS protein spectra of plasma sample from one Control, one RIPC (remote ischemic preconditioning) 5', and one RIPC 10' rat. Results are presented as intensities of SELDI-TOF reading (arbitrary units). The 27583, 27791, and 28284 *m/z* peaks were found to be differentially expressed on the CM10 array as calculated by the Mann-Whitney test. (B) Scattergram showing the significant differences in intensity of 27583, 27791, and 28284 *m/z* peaks in plasma samples derived from Control, RIPC 5', and RIPC 10' rats. The continuous line represents the mean, and dots represent each individual rat ($n = 10$ in each group). Detailed *p*-value data for comparison between the three groups is indicated in Table 1. doi:10.1371/journal.pone.0077211.g001

RIPC+MI *vs.* $64.86 \pm 2.57\%$ in the MI alone group; $p < 0.05$). Similarly, ApoA-I injection decreased infarct size (INF% AAR = $50.91 \pm 3.81\%$ in ApoA-I+MI *vs.* $64.86 \pm 2.57\%$ in MI alone; $p < 0.05$), but infarct size did not significantly differ between the two treated groups ($p = ns$) (Figure 4B and 4C).

Discussion

Since the initial studies that reported the capability of protecting the heart by applying ischemic preconditioning stimuli to an organ or tissue remote from the heart [2], the successful use of non-

invasive transient upper-limb ischemia as a stimulus has greatly facilitated the translation of RIPC into a variety of clinical settings in acute I/R injury [7,28]. However, the mechanism through which RIPC exerts its protection against subsequently sustained cardiac I/R injury is still unclear. Involvement of three inter-related events is the widely accepted theory [6,29,30]. Firstly, brief sequences of ischemia to the remote tissue are believed to generate endogenous autacoids. Secondly, the protective signals need to be conveyed from the remote tissue to the myocardium. This step may involve several mechanisms, including blood-borne factors

Table 1. SELDI profiles of plasma from Control, RIPC 5' and RIPC 10' rats.

Peaks	Control	RIPC 5'	RIPC 10'
<i>m/z</i> (Da)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)
27583	24.03±2.63	23.56±2.73	26.71±3.45*
27791	8.45±0.81	8.31±0.96	9.28±1.02*
28284	15.98±0.90	16.24±2.56	17.14±1.72†

Data are mean±SEM. Da: Daltons.

**p*<0.05 vs. RIPC 5',

†*p*<0.05 vs. Control.

RIPC indicates remote ischemic preconditioning.

doi:10.1371/journal.pone.0077211.t001

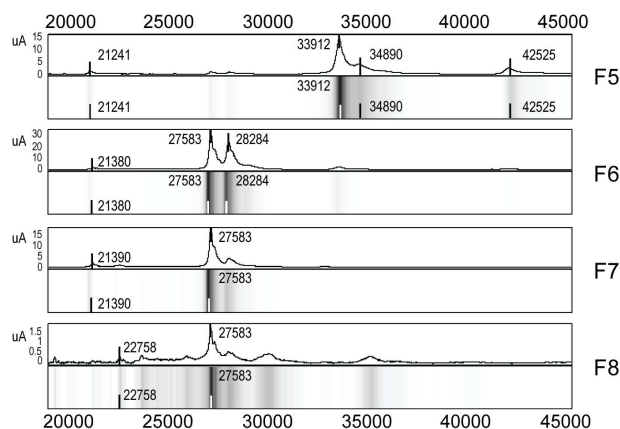
[13,15,16,31,32], neuronal pathways [3,33], and systemic response [34]. Thirdly, the protective signals may activate several intracellular survival signaling pathways in the myocardium [29,35]. A large body of evidence supports the concept of blood-

borne factor(s) conveying the cardioprotective signal from the remote tissue to the heart. Indeed, a period of reperfusion to the remote preconditioned organ is required to insure protection after RIPC, suggesting that the reperfusion period may be needed to washout humoral factors generated by RIPC [3,14,36]. Moreover, whole blood taken from a rabbit that underwent ischemic preconditioning of both the heart and kidney was shown to be able to decrease infarct size when transfused into an untreated rabbit [13]. Similarly, coronary effluent from isolated rabbit hearts preconditioned by repetitive ischemia transferred protection to another acceptor isolated rabbit heart [15]. In another study, acutely transplanted (*i.e.*, denervated) hearts were preconditioned by remote limb stimulus in pigs, suggesting that a humoral factor was responsible for protection [16]. Several studies have reported the implication of endogenous factors in cardioprotective mechanisms, including bradykinin [37], adenosine [14], opioids [38], endocannabinoids [39], and erythropoietin [40]. However, to date, the actual identity of circulating humoral factors remains unknown.

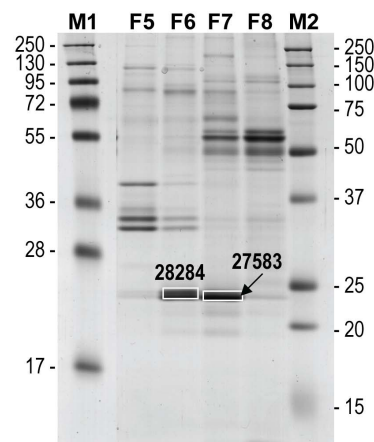
In this study, the proteomic SELDI-TOF-MS approach detected a plasmatic up-regulation of ApoA-I in rats exposed to

A Purification of 27583-27791-28284 *m/z* peaks

Liquid-phase electrofocusing (pH 4-6)



Gel electrophoresis



B Protein identification of 27583-27791-28284 *m/z* peaks

Peptides identified by MS in ApoA-I sequence

1	MKAAVLAVAL	VFLTGCQAW	FWQQDEPQS	WDRVKDFATV
41	YVDAVKDSGR	DYVSQFESST	LGKQLNLNLL	DNWDTLGSTV
81	GRLQEQLGPV	TQEFWANLEK	ETDWRNEMN	KDLENVKQKM
121	QPHLDEFQEK	WNEEVEAYRQ	KLEPLGTELH	KNAKEMQRHL
161	KVVAEEFRDR	MRVNADALRA	KFGLYSDQMR	ENLAQRLTEI
201	KNHPTLIEYH	TKASDHLKTL	GEKAKPALDD	LGQGLMPVLE
241	AWKAKIMSMI	DEAKKKLNA		

Immunoprecipitation with ApoA-I antibody

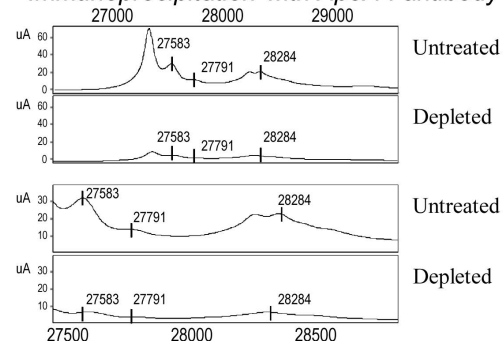


Figure 2. Purification and identification of the proteins corresponding to the 27583, 27791, and 28284 *m/z* peaks. (A) SELDI-TOF-MS protein spectrum of fractions F5, F6, F7, and F8 from MicroRotor® cell, by a pH gradient 4–6 (left panel). Each fraction (F5, F6, F7, and F8) was analyzed on NU-PAGE 10% coomassie blue stained-gel. The bands corresponding to the 27583, 27791, and 28284 *m/z* peaks were framed (right panel). (B) Peptides identified by mass spectrometry corresponding to apolipoprotein A-I. Aminoacids indicated in red corresponds to peaks 27583 and 27791, and those indicated in blue correspond to peak 28284 *m/z* (left panel). SELDI-TOF-MS protein spectra of crude (untreated) and immunodepleted plasma with ApoA-I antibody (depleted) showed the decrease in 27583, 27791, and 28284 *m/z* peaks following immunodepletion, validating the identification (right panel).

doi:10.1371/journal.pone.0077211.g002

Table 2. Peak list of mass spectra corresponding to the SELDI peaks.

Peaks	Accession	Protein	Mass of peak	%	Probability
<i>m/z</i>	number	name	(Daltons)	coverage	score
27583	P04639	Apolipoprotein	1132.5186	11	47
27791		A-I	1195.5419		
			1460.7139		
28284	P04639	Apolipoprotein	1132.5176	32	360
		A-I	1195.5486		
			1227.6107		
			1454.7744		
			1460.6777		
			1879.8834		
			2129.1015		
			2130.0910		

doi:10.1371/journal.pone.0077211.t002

10-min limb ischemia and 10-min reperfusion. In a previous study, Lang *et al.* already attempted to identify the humoral factors that convey the preconditioning signal from the remote organ to the heart using proteomic methods [41]. In the Lang *et al.* study, the RIPC stimulus was induced in rats through 10-min renal artery occlusion period followed by 20-min reperfusion. Blood samples were then analyzed using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), with 10 spots found to be differentially expressed in the control and RIPC groups. While using MALDI-TOF-MS, the authors identified only four protein spots, three of which corresponded to up-regulated albumin fragments, while one was identified as down-regulated liver regeneration-related protein in the preconditioned group. None of these proteins exhibit a known cytoprotective function. Several points may explain why ApoA-I was found not to be a potential RIPC factor in the Lang *et al.* study. Different RIPC models were used in both studies. We employed limb ischemia with femoral artery clamping, while Lang *et al.* used renal artery clamping. Additionally, the timing of blood sampling differed: 10 minutes after limb reperfusion versus 20 minutes after renal reperfusion. One could speculate that the increased plasmatic ApoA-I levels display a Gauss curve with a maximum at 10 min, as we did not detect any increase at 5 min,

whereas the Lang's samples were analyzed after 20 minutes of reperfusion. In a recent paper, Hepponstall *et al.* examined changes in the plasma proteome of five healthy human volunteers exposed to four cycles of 5-min forearm ischemia followed by 5-min reperfusion [42]. Interestingly, ApoA-I was up-regulated at 15 minutes and down-regulated 24 hours following RIPC in comparison with baseline samples.

ApoA-I is the major protein component of high-density lipoproteins (HDL). The protective effect of HDL is mainly attributed to their capacity to dislodge lipids from atherosclerotic plaques [43]. However, HDL could also acutely protect the heart against I/R injury. Intravenous injection of human HDL, 30 minutes before transient coronary ligation, reduced infarct size by 20% in mice [44]. HDL suppressed leucocyte adhesion to the endothelium and protected cardiomyocytes against apoptosis. L-nitroarginine methyl ester (L-NAME) administration before I/R completely eliminated the protection afforded by HDL, underlining the major role played by nitric oxide (NO) in the cardioprotective mechanism. Another study demonstrated that single intravenous injection of synthetic HDL prior to myocardial ischemia increased NO production and suppressed reperfusion-induced arrhythmias through an Akt/ERK/NO pathway in endothelial cells [19]. Synthetic HDL was made of phosphatidylcholine and ApoA-I. Similarly, Rossoni *et al.* showed improved functional post-ischemic recovery of isolated rat hearts through the administration of similar synthetic HDL before or after ischemia [45]. Beneficial effects were attributed to the scavenging of myocardial released TNF- α . Furthermore, ApoA-I alone, administered intravenously 30 minutes before occlusion of the renal pedicles, decreased renal I/R injury by inhibiting inflammatory cytokine release (TNF- α , IL-1 β) as well as neutrophil infiltration and activation [20]. In addition, Gu *et al.* reported that administration of ApoA-I before the onset of reperfusion of myocardial infarction decreased creatine kinase release, diminished the production of TNF- α and IL-6 in cardiac tissue, and suppressed the endothelial expression of ICAM-1 in addition to neutrophil adherence and migration [18].

This study provided further evidence that the heart can be preconditioned by single ApoA-I administration, recapitulating RIPC-induced cardioprotection. It is worthy to note that the recently reported mechanisms using HDL or ApoA-I injection in I/R models were also described in RIPC. Accordingly, RIPC was

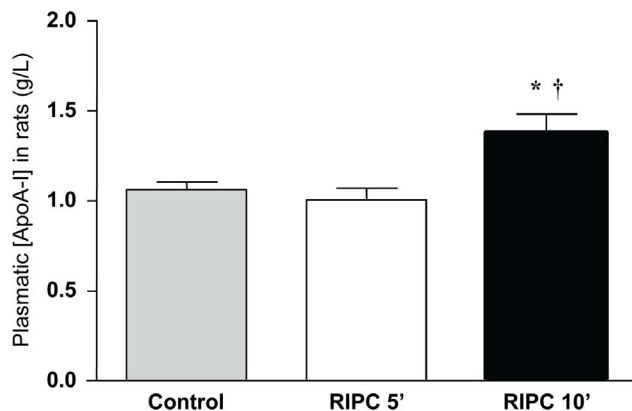


Figure 3. Validation of proteomic analysis by ELISA quantification of ApoA-I in rat plasmas. Results are expressed as mean \pm SEM. * p <0.05 vs. RIPC 5', † p <0.05 vs. Control, n = 10 in each group. doi:10.1371/journal.pone.0077211.g003

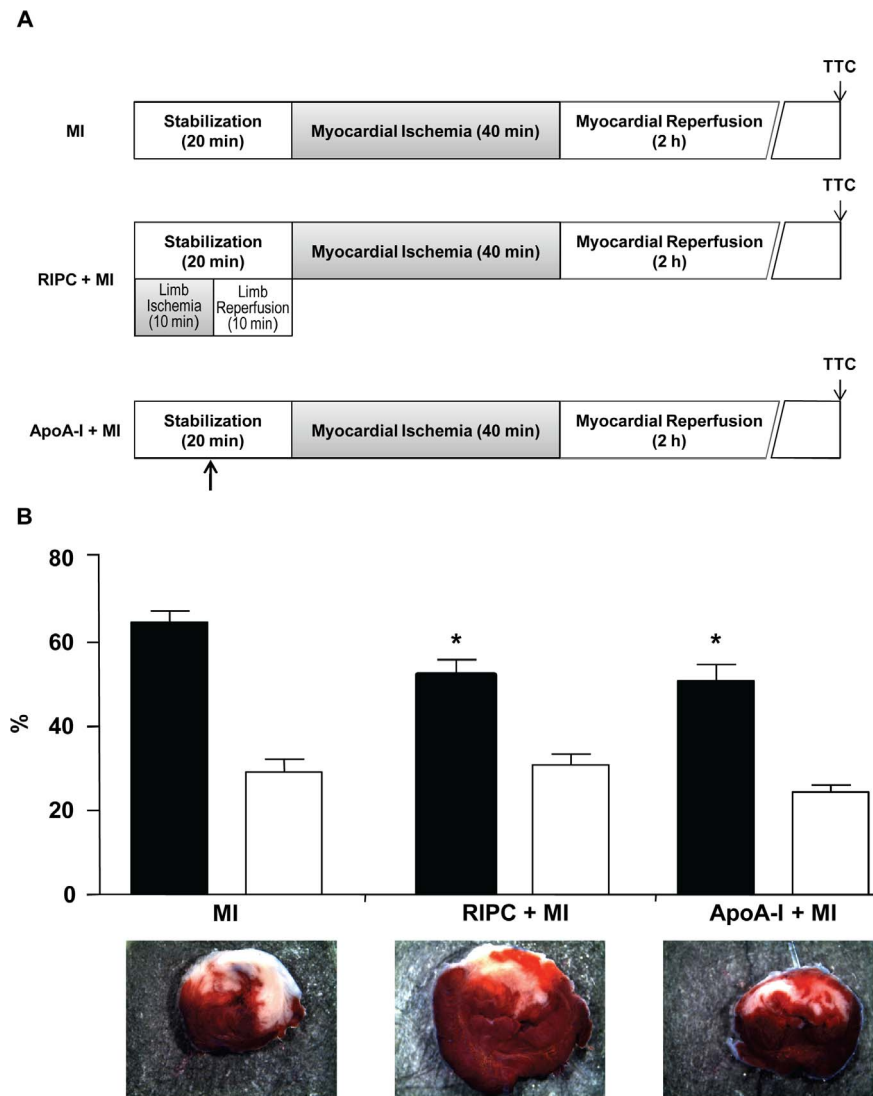


Figure 4. ApoA-I reduces infarcted area in rats submitted to ischaemia-reperfusion protocol. (A) Experimental protocol. All groups were subjected to 40-minute coronary occlusion followed by 2-hour reperfusion. RIPC was achieved by 10-minute limb ischemia followed by 10-minute reperfusion. ApoA-I (10 mg/kg) was administered 10 minutes before coronary artery occlusion (*arrow*). (B) Representative pictures of mid-ventricular 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride-stained sections and bar graph showing infarct size expressed as a percentage of area at risk (black bars), and area at risk as a percentage of total left ventricular area (white bars). Results are given as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. MI group, $n = 8-11$ in each group. doi:10.1371/journal.pone.0077211.g004

shown to be associated with NO release [46] and anti-inflammatory effects [47].

Finally, a previous study has shown that the humoral factors, induced by limb RIPC, are likely to be hydrophobic with a molecular mass < 15 kDa [31]. A recent study reported that the coronary effluent from ischemic preconditioned hearts contained hydrophobic protective factors with a molecular mass below or close to 30 kDa, with at least one of them having a molecular mass > 10 kDa [32]. The molecular mass of ApoA-I (28 kDa) [48] fits with these latest findings. Indeed, ApoA-I contains hydrophobic domains. The hydrophobicity of the C-terminal lipid-binding domain of ApoA-I is presumed to play a major role in promoting cholesterol efflux [49].

Limits

The mechanism by which ApoA-I concentrations increase in the blood as early on as 10 minutes after limb reperfusion is still

unknown, requiring further investigation. One could speculate that plasma ApoA-I level increase is not related to a new synthesis, but due to mobilization of existing ApoA-I in response to the RIPC stimulus. Our results were obtained in a rat I/R model using a single protocol of 10-min limb ischemia followed by 10-min reperfusion. This protocol was previously validated in rats by our group along with other groups [35,50]. However, our results need to be confirmed using other RIPC stimuli, and further studies are necessary in order to ascertain whether ApoA-I is involved in RIPC-induced cardioprotection in other animal species as well as in humans with comorbidities, such as diabetes or lipid disorders.

Conclusion

Our findings suggest that ApoA-I may be a protective blood-borne factor involved in the RIPC mechanism. RIPC was associated with a plasmatic increase in ApoA-I, and ApoA-I

injection prior to myocardial I/R recapitulated cardioprotection offered by RIPC. Further studies are needed to confirm this data in other experimental models and in clinical settings.

Acknowledgments

The authors would like to thank Pierre Legras and Jerome Roux from *Service Commun Animalerie Hospitalo-Universitaire* for taking care of the animals.

References

- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P (1993) Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87: 893–899.
- Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, et al. (2002) Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 106: 2881–2883.
- Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD (1996) Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 94: 2193–2200.
- Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM (1998) Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 275: H1542–1547.
- Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA (1997) Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 96: 1641–1646.
- Lim SY, Hausenloy DJ (2012) Remote ischemic conditioning: from bench to bedside. *Front Physiol* 3: 27.
- Brevoord D, Kranke P, Kuijpers M, Weber N, Hollmann M, et al. (2012) Remote ischemic conditioning to protect against ischemia-reperfusion injury: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 7: e42179.
- Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, et al. (2006) Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol* 47: 2277–2282.
- Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, et al. (2007) Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 370: 575–579.
- Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraci SA, et al. (2007) Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 116: I98–105.
- Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmk R, et al. (2009) Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial. *Circulation* 119: 820–827.
- Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bottcher M, Kaltoft AK, et al. (2010) Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 375: 727–734.
- Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP, Becker RC, Porcaro WA, et al. (1999) Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J Thromb Thrombolysis* 8: 123–129.
- Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, et al. (2005) Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol* 100: 404–412.
- Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, et al. (1999) Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol* 277: H2451–2457.
- Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, et al. (2005) Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation* 79: 1691–1695.
- Dubois E, Fertin M, Burdese J, Amouyel P, Bauters C, et al. (2011) Cardiovascular proteomics: translational studies to develop novel biomarkers in heart failure and left ventricular remodeling. *Proteomics Clin Appl* 5: 57–66.
- Gu SS, Shi N, Wu MP (2007) The protective effect of ApolipoproteinA-I on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci* 81: 702–709.
- Imazumi S, Miura S, Nakamura K, Kiya Y, Uehara Y, et al. (2008) Antiarrhythmic effect of reconstituted high-density lipoprotein against ischemia/reperfusion in rats. *J Am Coll Cardiol* 51: 1604–1612.
- Shi N, Wu MP (2008) Apolipoprotein A-I attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Biomed Sci* 15: 577–583.
- Fertin M, Beseme O, Duban S, Amouyel P, Bauters C, et al. (2010) Deep plasma proteomic analysis of patients with left ventricular remodeling after a first myocardial infarction. *Proteomics Clin Appl* 4: 654–673.
- Fertin M, Burdese J, Beseme O, Amouyel P, Bauters C, et al. (2011) Strategy for purification and mass spectrometry identification of SELDI peaks corresponding to low-abundance plasma and serum proteins. *J Proteomics* 74: 420–430.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255–262.
- Beseme O, Fertin M, Drobecq H, Amouyel P, Pinet F (2010) Combinatorial peptide ligand library plasma treatment: Advantages for accessing low-abundance proteins. *Electrophoresis* 31: 2697–2704.
- Pinet F, Beseme O, Cieniewski-Bernard C, Drobecq H, Jourdain S, et al. (2008) Predicting left ventricular remodeling after a first myocardial infarction by plasma proteome analysis. *Proteomics* 8: 1798–1808.
- Ghanbari-Niaki A, Khabazian BM, Hossaini-Kakhak SA, Rahbarzadeh F, Hedayati M (2007) Treadmill exercise enhances ABCA1 expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 841–846.
- Khabazian BM, Ghanbari-Niaki A, Safarzadeh-Golpordesari A, Ebrahimi M, Rahbarzadeh F, et al. (2009) Endurance training enhances ABCA1 expression in rat small intestine. *Eur J Appl Physiol* 107: 351–358.
- Hausenloy DJ, Yellon DM (2011) The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat Rev Cardiol* 8: 619–629.
- Hausenloy DJ, Yellon DM (2008) Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 79: 377–386.
- Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, et al. (2008) Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury—a review. *J Surg Res* 150: 304–330.
- Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, et al. (2009) Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)* 117: 191–200.
- Brevik L, Helgeland E, Aarnes EK, Mrdalj J, Jonassen AK (2011) Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion. *Basic Res Cardiol* 106: 135–145.
- Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ (2010) The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 105: 651–655.
- Shimizu M, Saxena P, Konstantinov IE, Cherepanov V, Cheung MM, et al. (2010) Remote ischemic preconditioning decreases adhesion and selectively modifies functional responses of human neutrophils. *J Surg Res* 158: 155–161.
- Tamarelle S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croue A, et al. (2011) RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol* 106: 1329–1339.
- Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sarvary L, Strasser RH (2002) Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res* 55: 590–601.
- Wolfrum S, Schneider K, Heidebreder M, Nienstedt J, Dominiak P, et al. (2002) Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKC ϵ -isoform. *Cardiovasc Res* 55: 583–589.
- Weinbrenner C, Schulze F, Sarvary L, Strasser RH (2004) Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via delta1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart. *Cardiovasc Res* 61: 591–599.
- Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, Jabehdar-Maralani P, Sadeghipour H, et al. (2008) Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 579: 246–252.
- Diwan V, Jaggi AS, Singh M, Singh N, Singh D (2008) Possible involvement of erythropoietin in remote renal preconditioning-induced cardioprotection in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 51: 126–130.
- Lang SC, Elsasser A, Scheler C, Vetter S, Tiefenbacher CP, et al. (2006) Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning—identifying a protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol* 101: 149–158.
- Hepponstall M, Ignjatovic V, Binos S, Monagle P, Jones B, et al. (2012) Remote Ischemic Preconditioning (RIPC) Modifies Plasma Proteome in Humans. *PLoS One* 7: e48284.
- Linsel-Nitschke P, Tall AR (2005) HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 4: 193–205.
- Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schafers M, et al. (2006) High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation* 114: 1403–1409.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AF F.Pinet F.Prunier. Performed the experiments: PH DPM OB MC ST DL. Analyzed the data: PH F.Pinet F.Prunier. Contributed reagents/materials/analysis tools: DPM. Wrote the paper: PH DPM ST F.Pinet F.Prunier.

45. Rossoni G, Gomaschi M, Berti F, Sirtori CR, Franceschini G, et al. (2004) Synthetic high-density lipoproteins exert cardioprotective effects in myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 79–84.
46. Xiao L, Lu R, Hu CP, Deng HW, Li YJ (2001) Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol* 427: 131–135.
47. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, et al. (2001) Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 33: 100–113.
48. Puppione DL, Della Donna L, Laganowsky AD, Bassilian S, Souda P, et al. (2009) Mass spectral analyses of the two major apolipoproteins of great ape high density lipoproteins. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 4: 305–309.
49. Lyssenko NN, Hata M, Dhanasekaran P, Nickel M, Nguyen D, et al. (2012) Influence of C-terminal alpha-helix hydrophobicity and aromatic amino acid content on apolipoprotein A-I functionality. *Biochim Biophys Acta* 1821: 456–463.
50. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B (1997) Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol* 273: H1707–1712.

Résultats complémentaires à la publication n°1

Sont présentées ici les données complémentaires du travail sur l'identification de l'ApoA-I comme agent circulant du RIPreC. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de réponses aux reviewers, mais ne font pas partie de la publication.

1. Effet de l'ApoA-I sur l'inflammation liée à l'infarctus

Au-delà de l'effet cardioprotecteur de l'ApoA-I, observé sur la taille de l'infarctus, les données bibliographiques sur cette protéine lui attribuent de nombreuses propriétés anti-inflammatoires. Elle peut notamment réduire l'inflammation au niveau des cellules endothéliales vasculaires et bloquer l'activation des leucocytes [332,376,378]. Elle participe ainsi à la cardioprotection d'une façon complémentaire aux voies classiquement décrites, mettant en jeu les kinases de survie cellulaire ou encore l'inhibition de l'ouverture du mPTP.

Un bon témoin de l'inflammation tissulaire lors de l'infarctus est le recrutement et l'infiltration de leucocytes au niveau de la zone infarctée. Ceux-ci vont alors participer aux lésions de reperfusion et à la nécrose du tissu myocardique.

Nous avons donc étudié en microscopie les cœurs de rats soumis à un infarctus, avec ou sans injection d'ApoA-I, afin d'investiguer si elle pouvait empêcher le recrutement des leucocytes dans le tissu.

Pour cela nous avons réalisé un marquage en hématoxyline-éosine. Il a permis de mettre en évidence que la cardioprotection induite par l'ApoA-I, et visualisée macroscopiquement par la diminution de la taille de l'infarctus, était également corrélée au niveau microscopique avec la réduction de la formation d'œdèmes interstitiels ainsi qu'avec une meilleure préservation de l'intégrité des fibres musculaires. Une diminution de l'infiltration leucocytaire était également observée (**Figure supplémentaire 1A**).

Nous avons ensuite confirmé cette observation par la réalisation d'un marquage spécifique du CD45, antigène pan-leucocytaire. Un marquage circulaire fluorescent vert à la membrane était caractéristique d'une cellule CD45⁺ (**Figure supplémentaire 1B**). Nous avons ainsi pu quantifier l'infiltration leucocytaire et

constater que l'administration d'ApoA-I en préconditionnement permettait de réduire de façon significative le nombre de cellules CD45⁺ dans le tissu soumis à l'ischémie (508 ± 53 cellules/mm² dans le groupe contrôle vs. 316 ± 25 cellules/mm² dans le groupe infarctus + ApoA-I; $p < 0.05$) (**Figure Supplémentaire 1C**).

Une partie de l'effet cardioprotecteur observé dans nos conditions avec l'ApoA-I est donc dépendant de son rôle anti-inflammatoire, et en particulier de l'inhibition de l'infiltration des leucocytes dans le tissu infarcté. Ces résultats sont en accord avec la littérature décrivant l'ApoA-I comme une protéine essentiellement anti-inflammatoire *in vivo*.

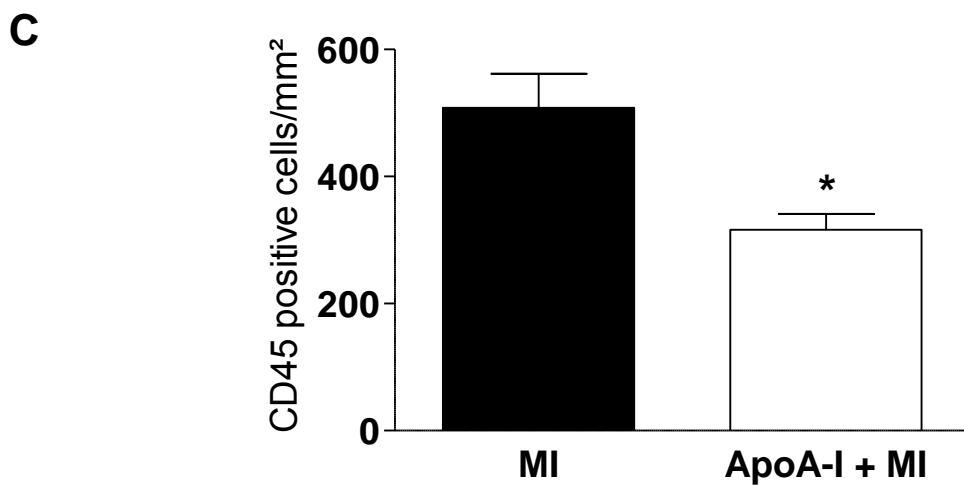
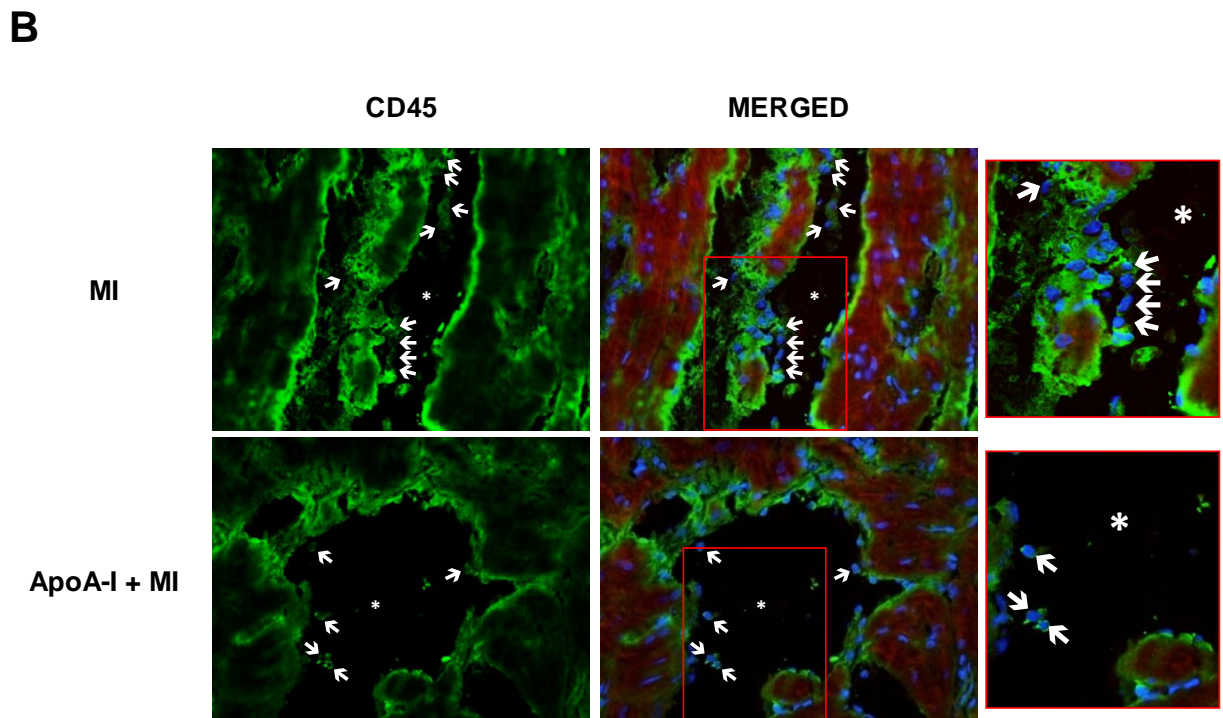
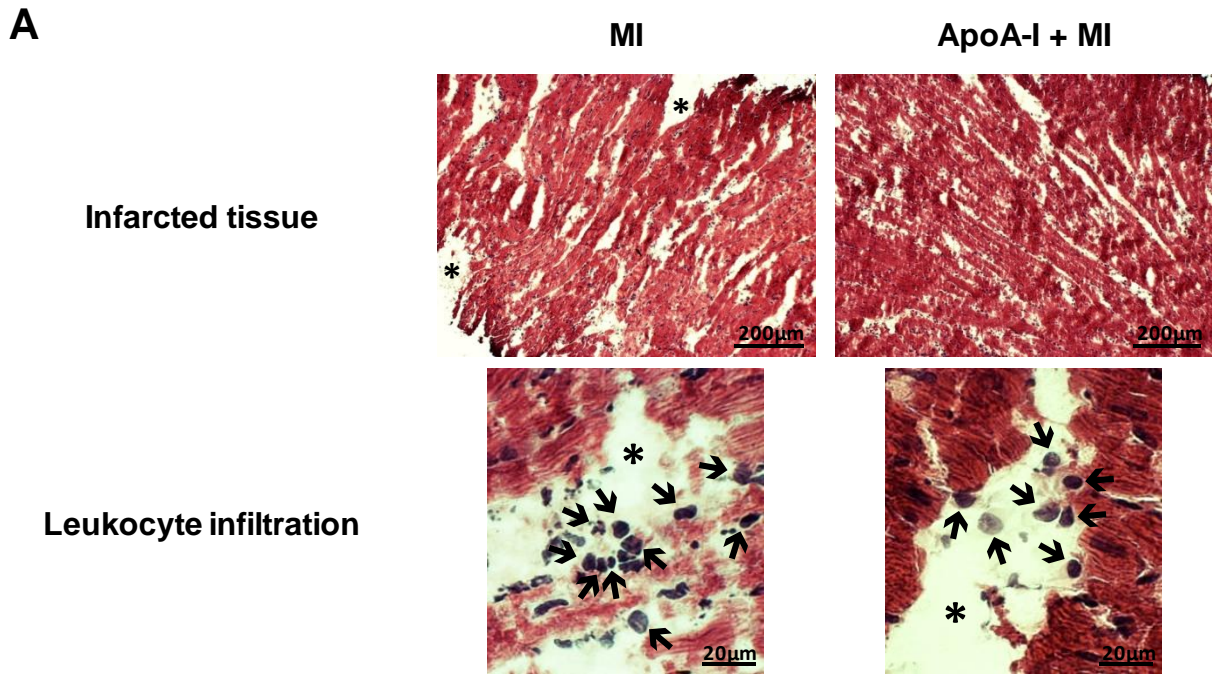


Figure supplémentaire 1. Effet anti-inflammatoire de l'ApoA-I *in vivo*. A. Images représentatives du marquage Hématoxyline-Eosine (grossissement x400). Dans le tissu avec infarctus seul (MI) on observe de nombreuses déchirures myofibrillaires et de nombreux œdèmes interstitiels (*). Il y a également moins d'infiltration leucocytaire (flèches noires). Le groupe traité par l'ApoA-I (ApoA-I + MI) présente une réduction de la dégénérescence du tissu infarci, associée avec moins d'œdèmes et moins d'infiltration leucocytaire. **B.** Marquages CD45 (vert) représentatifs au niveau du tissu infarci (grossissement x400). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Les astérisques indiquent des plages d'œdèmes interstitiels, et les flèches blanches indiquent des cellules infiltrées CD45⁺. L'ApoA-I (10mg/kg) réduit le recrutement des cellules inflammatoires dans la zone infarctée en comparaison au groupe contrôle. **C.** Quantification du nombre de cellules CD45⁺ par champs microscopique. Le nombre de cellules positives est rapporté à une mesure de surface en mm². Dix champs par cœur ont été quantifiés (n=2 cœurs par groupe). Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart à la moyenne. * $p < 0.05$ vs groupe MI.

2. Rôle des voies RISK et SAFE dans la cardioprotection induite par l'ApoA-I

Les cascades de signalisation intracellulaires sont habituellement des acteurs essentiels de la protection contre les lésions d'ischémie-reperfusion, en activant des réponses de survie et en inhibant les signaux pro-apoptotiques [47,191].

Décrites comme efficaces dans plusieurs études *in vitro* sur des cardiomyocytes en culture, notamment *via* l'activation d'Akt et ERK1/2 [419,420], les HDL n'ont à l'heure actuelle jamais été démontrées comme agissant sur l'activation de ces voies de survie *in vivo*. En revanche, *ex vivo* sur cœur isolé-perfusé, l'ApoA-I et les HDL permettent de réduire la taille de l'infarctus mais pas sur des cœurs de souris STAT-3 KO [421]. Il y a donc certaines évidences laissant supposer que la cardioprotection induite par l'ApoA-I pourrait dépendre en partie des cascades RISK et SAFE.

Nous avons donc cherché à estimer la contribution de ces voies de survie RISK et SAFE dans la cardioprotection induite par l'ApoA-I *in vivo*. Pour cela nous avons évalué par WB l'état d'activation des protéines Akt, ERK1/2, GSK-3 β (RISK) et STAT-3 (SAFE) en réponse ou non à l'injection d'ApoA-I en préconditionnement à distance. Des rats ont donc été soumis à 40 minutes d'infarctus suivies de 15 minutes de reperfusion, précédées ou non par l'injection de 10mg/kg d'ApoA-I en intraveineuse.

De façon surprenante, l'analyse WB ne révèle pas à 15 min d'activation des voies RISK et SAFE en réponse à la présence d'ApoA-I (**Figure supplémentaire 2**).

Plusieurs raisons peuvent expliquer ce manque d'effet de l'ApoA-I. Il est d'abord possible que le temps de prélèvement, de 15 min de reperfusion, utilisé pour prélever les cœurs, ne soit pas le moment adéquat. Basé sur nos travaux précédents au laboratoire [47,432], ce temps de 15 minutes est relativement long par rapport au début de la reperfusion. Il est possible qu'à des temps plus précoces, comme 5 ou 10 minutes de reperfusion, la tendance à l'augmentation observée puisse devenir significative.

On ne peut également pas exclure la possibilité que le rôle cardioprotecteur de l'ApoA-I et des HDL ne soit médié qu'accessoirement par l'activation des voies RISK et SAFE. Aujourd'hui largement documentée, la littérature sur les nombreuses propriétés de l'ApoA-I laisse en effet supposer que l'essentiel de son mode d'action pourrait être lié non pas à l'activation des voies de survie, mais à ses capacités anti-inflammatoires.

De plus, les quelques données sur l'activation des voies de survie par l'ApoA-I et les HDL, bien que laissant supposer d'un rôle de RISK et SAFE, sont encore discordantes. Imaizumi *et al.* ont démontré que l'activation d'Akt et ERK1/2 est possible avec des HDL recombinantes, mais pas avec l'ApoA-I seule [403]. A l'inverse, Liu *et al.* ont décrit une activation de p38 MAPK, de ERK1/2 et de JAK à la fois avec des HDL entières, mais également avec de l'ApoA-I seule [310].

A l'heure actuelle il existe donc une absence totale de démonstration de l'effet de l'ApoA-I et des HDL *in vivo*, dépendant des voies de survie cardioprotectrices. Entre l'*in vivo* et l'*in vitro* les mécanismes mis en jeu peuvent différer, et il est possible que l'absence d'activation observée dans notre modèle ne soit pas liée à nos conditions expérimentales mais à des modes d'action différents de l'ApoA-I en fonction du modèle.

L'ensemble de cette analyse concernant l'implication des cascades de signalisation RISK et SAFE dans l'action cardioprotectrice de l'ApoA-I *in vivo* reste donc à approfondir.

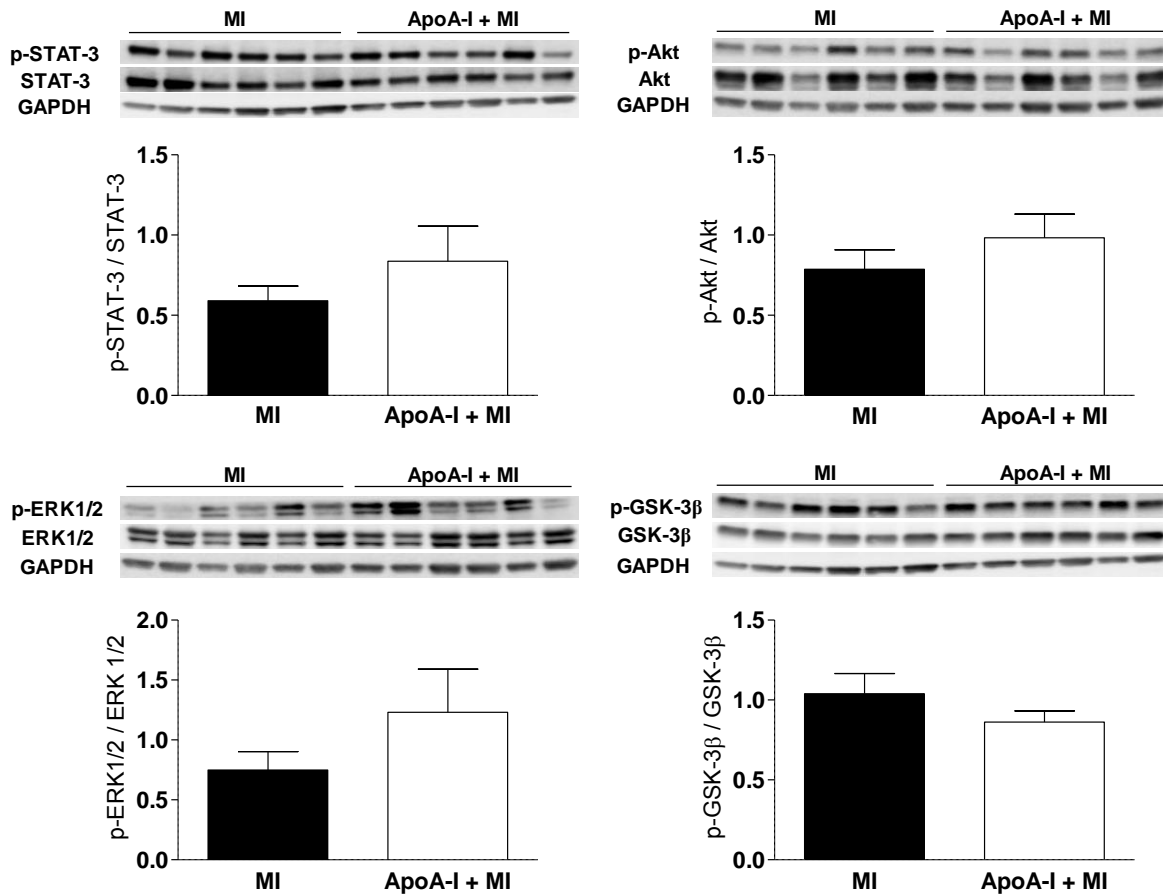


Figure supplémentaire 2. Analyse Western Blot de l'expression de STAT-3 et des kinases Akt, ERK1/2 et GSK-3β. Immunoblots représentatifs des formes phosphorylées (p-STAT-3, p-Akt, p-ERK1/2, p-GSK-3β) et totales (STAT-3, Akt, ERK1/2, GSK-3β) des protéines de signalisation des voies RISK et SAFE. Réalisés à partir d'extraits protéiques de zones à risques soumises à une ischémie-reperfusion en présence (MI + ApoA-I) ou en absence (MI) d'ApoA-I. Les histogrammes représentent le ratio forme phosphorylée sur forme totale. Il n'y a pas de différence significative à 15 min de reperfusion. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart à la moyenne. Le marquage GAPDH sert de contrôle de charge.

3. Etude d'un autre cycle de préconditionnement à distance

Le cycle de RIPreC utilisé lors de l'étude protéomique pour mettre en évidence l'ApoA-I comme facteur circulant était un cycle de 10 min d'ischémie de patte suivi de 10 min de reperfusion.

Cet algorithme, bien que démontré comme efficace dans plusieurs études [47,72,125], n'est pas l'algorithme le plus couramment utilisé *in vivo*. Plus classiquement, ce sont de brèves périodes de 5 min d'ischémie-5 min de reperfusion, répétées 3-4 fois, qui présentent le plus d'effet [83,84,179].

Nous avons donc soumis des rats à un RIPreC de 4 fois 5 min d'ischémie-5 min de reperfusion à la patte pour explorer l'effet de cet autre cycle de conditionnement sur la libération de l'ApoA-I. Pour cela nous avons dosé par ELISA l'ApoA-I plasmatique à la suite de ce conditionnement.

En comparaison avec des rats contrôles, le cycle de RIPreC 4*5' augmente de façon significative l'ApoA-I plasmatique (1.06 ± 0.04 vs. 1.36 ± 0.09 g/L, respectivement; $p < 0.05$). Il n'y a cependant pas de différence d'augmentation entre les 2 algorithmes de préconditionnement à distance (1.36 ± 0.09 vs 1.38 ± 0.11 g/L, NS) (**Figure supplémentaire 3**).

Ces résultats indiquent donc que l'augmentation de la concentration plasmatique en ApoA-I n'est pas liée à un épiphénomène dépendant d'un cycle de conditionnement à distance unique. Un cycle de plusieurs séquences d'ischémie-reperfusion, ayant été démontré comme cardioprotecteur dans de nombreuses études, est capable d'induire une augmentation similaire de l'ApoA-I.

Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas d'augmentation plus importante de la quantité d'ApoA-I en réponse au RIPreC 4*5' par rapport au RIPreC 10'. Il n'y a donc a priori pas d'effet additionnel du nombre de cycles sur la libération d'ApoA-I.

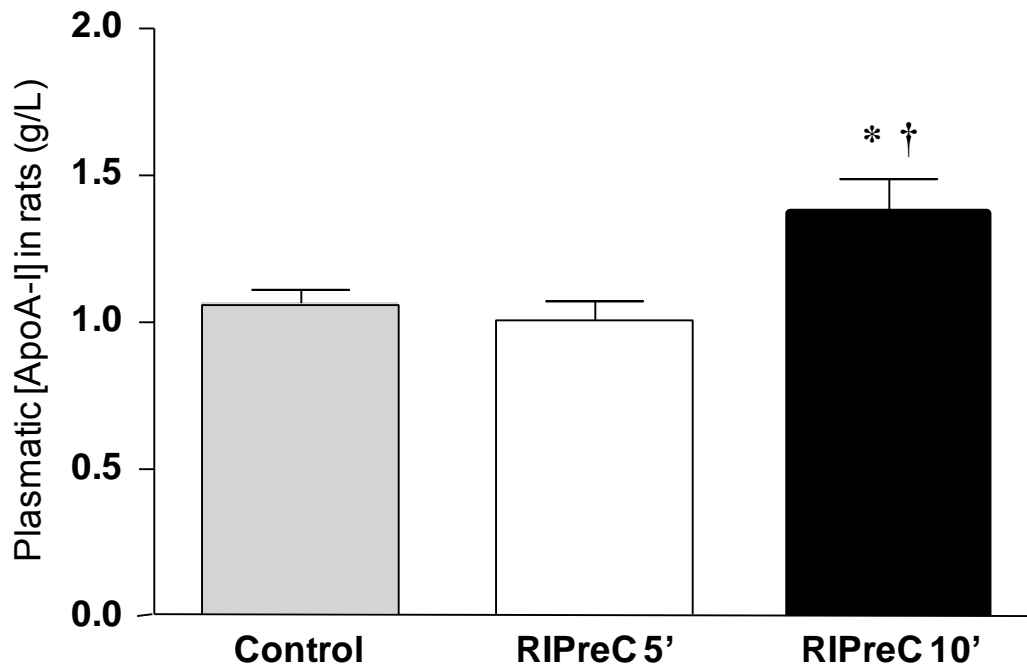


Figure supplémentaire 3. Comparaison de deux algorithmes de RIPreC sur la libération d'ApoA-I. Quantification par ELISA des taux plasmatiques en ApoA-I. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart à la moyenne. # $p < 0.05$ vs Control, $n = 10$ dans les groupes Control et RIPreC 10', $n = 6$ dans le groupe RIPreC 4*5'.

Discussion n°1

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que l'ApoA-I était un facteur circulant potentiel du RIPreC. Augmentée dans le plasma suite à un conditionnement à distance à la patte, cette protéine est capable de mimer la cardioprotection induite par le RIPreC *in vivo*. Son identification a été réalisée à l'aide d'une technique protéomique d'analyse du plasma, le SELDI-TOF-MS. L'étude a été divisée en trois parties.

Pour commencer, nous avons eu recours à cette technique protéomique de SELDI-TOF-MS. Il s'agit d'une technique déjà validée dans plusieurs modèles pour avoir permis l'identification de biomarqueurs circulants [430,431]. Associée à une méthode d'exploration des protéines minoritaires du plasma [433], l'analyse protéomique des plasmas de rats a donc identifié l'ApoA-I comme étant significativement augmentée dans le groupe avec conditionnement à distance par 10 min d'ischémie de patte-10 min de reperfusion, en comparaison aux deux autres groupes de l'étude, le groupe contrôle et le groupe RIPreC 5 min d'ischémie de patte-5 min de reperfusion.

Cette identification par spectrométrie de masse a ensuite été validée par deux techniques de biologie moléculaire. Une première technique d'immunodéplétion, mettant en évidence une diminution de l'intensité du pic d'ApoA-I, confirmée ensuite par des dosages ELISA de l'ApoA-I dans les plasmas de rats.

La deuxième partie de l'étude a été réalisée *in vivo* dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat, afin de valider l'effet cardioprotecteur de l'ApoA-I, et donc sa capacité à être un facteur circulant du RIPreC.

Injectée 10 min avant la ligature de l'IVA, cette protéine a permis de réduire de près de 22% la taille de l'infarctus, induite par 40 min d'ischémie myocardique-2 heures de reperfusion. Cette réduction était similaire à celle induite par l'algorithme de RIPreC ayant permis l'identification de l'ApoA-I par protéomique, à savoir le RIPreC 10'.

Dans un dernier temps, des données complémentaires ont été collectées à propos de la cardioprotection induite par l'ApoA-I et de son induction par le RIPreC.

Nous avons donc pu démontrer sur des coupes histologiques que la réduction de l'infarctus liée à l'injection d'ApoA-I pouvait être en partie médiée par son effet anti-inflammatoire, concrétisé par la réduction de l'infiltration leucocytaire CD45⁺ dans le tissu infarci.

L'exploration des voies de survie du RIPreC, à savoir les voies RISK et SAFE, n'a en revanche pas pu mettre en évidence d'activation de ces kinases en réponse à l'injection d'ApoA-I. L'analyse par Western Blot ne montre en effet que des tendances à l'augmentation de la phosphorylation de ces protéines mais sans significativité dans nos conditions expérimentales.

Enfin, la dernière analyse réalisée dans cette étude consistait à étudier l'effet d'un cycle différent de conditionnement à distance sur l'augmentation de l'ApoA-I circulante. Nous avons donc utilisé un protocole bien démontré *in vivo*, le RIPreC 4*5', sur des rats, et nous avons dosé par ELISA le taux plasmatique en ApoA-I après la dernière reperfusion de la patte. Nous avons pu constater que l'augmentation du taux d'ApoA-I circulante était de nouveau présente suite à cet autre cycle de RIPreC, et que cette augmentation était similaire à celle obtenue avec le RIPreC 10'. Il n'y avait donc pas d'effet d'amplification suite à la répétition de plusieurs cycles d'occlusion-désocclusion de l'artère fémorale.

Il est intéressant de mettre en parallèle ce travail avec une étude récente réalisée chez l'homme, et décrivant une analyse protéomique de plasmas de volontaires sains, après un RIPreC [147]. Les techniques protéomiques utilisées dans cette étude, bien que différentes de notre technique SELDI-TOF-MS, ont-elles aussi permis d'identifier des protéines dont l'expression était modulée suite au RIPreC, et en particulier l'ApoA-I. Détectée comme augmentée dès 15 min après le RIPreC, l'ApoA-I est ensuite régulée négativement à 24 h après le RIPreC, suggérant ainsi un cycle de libération/action/recapture compatible avec un effet cardioprotecteur associé au RIPreC.

Cette étude confirme donc notre identification de l'ApoA-I comme un facteur circulant potentiel de la cardioprotection à distance, sans pour autant que les auteurs aient investigué son effet protecteur *in vivo* chez l'homme.

Chez le rat, nous avons mis en évidence que l'augmentation du taux plasmatique de cette ApoA-I circulante, 10 min avant une ischémie myocardique, était capable d'avoir un effet significatif sur la réduction de la taille de l'infarctus, et ce grâce à la réduction de l'inflammation. Au niveau des voies de survie du RIPreC, nous n'avons pas pu mettre en évidence leur activation en réponse à l'injection d'ApoA-I. Il existe cependant dans la littérature des travaux qui laissent supposer qu'une médiation de l'effet de l'ApoA-I par ces cascades de signalisation intracellulaires est possible [310,419].

Il pourrait donc être envisagé d'étudier, à d'autres temps de reperfusion, l'activation des voies RISK et SAFE par l'ApoA-I. Cela semble être une perspective intéressante dans l'optique d'approfondir les connaissances sur ses mécanismes d'action *in vivo*.

De la même façon, l'utilisation d'inhibiteurs des molécules probablement impliquées dans cette signalisation, comme Akt, ERK1/2 ou STAT-3, pourrait être envisagée afin d'inhiber ou non la cardioprotection induite par l'ApoA-I.

Toujours dans l'idée de bloquer l'effet protecteur de l'ApoA-I, des inhibiteurs pharmacologiques de cette protéine pourraient être utilisés. Malheureusement, le mécanisme de libération de l'ApoA-I par le RIPreC étant inconnu, il est difficile de bloquer sa libération aigue juste avant l'infarctus. Les inhibiteurs de l'expression génique de l'ApoA-I pourraient donc être envisagés, mais il serait nécessaire de les utiliser plusieurs jours avant l'induction de l'ischémie-reperfusion, et donc de s'éloigner du modèle initial de cardioprotection en phase aiguë d'infarctus. De plus, les molécules existantes, à savoir l'anandamide [434] ou la ciclosporine [435], sont connus pour activer les MAPK et la cardioprotection [210,436].

Cette étude est donc une approche innovante dans la recherche de facteurs circulants impliqués dans la cardioprotection ischémique à distance. L'utilisation d'une technique protéomique puissante a conduit à l'identification de l'ApoA-I comme augmentée en réponse au RIPreC. C'est donc une avancée majeure dans le domaine de la cardioprotection puisqu'elle fait suite à l'étude infructueuse ayant tenté d'utiliser la protéomique pour identifier des facteurs circulants du RIPreC [144].

Alors que des études complémentaires sur les mécanismes d'action mis en jeu sont encore à prévoir, il serait envisageable de tester rapidement l'effet cardioprotecteur de cette molécule lors de la prise en charge de l'infarctus du myocarde chez l'homme.

Publication n°2

1 **Modifications in rat plasma proteome after remote ischemic preconditioning (RIPC):**
2 **Identification by a SELDI-TOF-MS approach**

3

4 Pierre Hibert^{1, 2}, Delphine Prunier-Mirebeau^{1, 3}, Olivia Beseme^{4, 5, 6}, Maggy Chwastyniak^{4, 5, 6}, Sophie
5 Tamarelle^{1, 2}, Florence Pinet^{4, 5, 6, 7 *}, and Fabrice Prunier^{1, 2, 8 *}

6

7

8 ¹ L'UNAM Université, Angers, France

9 ² Université d'Angers, Laboratoire Cardioprotection Remodelage et Thrombose, Angers, France

10 ³ Université d'Angers, INSERM U771, CNRS UMR 6214, CHU Angers, Département de Biochimie et
11 Génétique, Angers, France

12 ⁴ INSERM, U744, F-59000, Lille, France

13 ⁵ Institut Pasteur de Lille, F-59000, Lille, France

14 ⁶ Université Lille Nord de France, IFR142, F-59000, Lille, France

15 ⁷ Centre Hospitalier régional et Universitaire de Lille, F-59037, Lille, France

16 ⁸ CHU Angers, Service de Cardiologie, Angers, France

17

18 *** co-last-authors**

19 **Corresponding author:**

20 Fabrice Prunier, MD, PhD

21 Cardioprotection, Remodelage et Thrombose EA 3860, Faculté de Médecine, Rue Haute de Reculée

22 FR-49045 Angers Cedex 1, France

23 Tel.: +33 241 355 147

24 Fax: +33 241 354 004

25 E-mail address: faprunier@chu-angers.fr

26

27 **ABSTRACT**

28 Remote ischemic preconditioning's (RIPC) ability to render the myocardium resistant to subsequent
29 prolonged ischemia is now clearly established in different species, including humans. Strong evidence
30 suggests that circulating humoral mediators play a key role in signal transduction, but their identities
31 still need to be established. Our study sought to identify potential circulating RIPC mediators using a
32 proteomic approach. Rats were exposed to 10-min limb ischemia followed by 5- (RIPC 5') or 10-min
33 (RIPC 10') reperfusion prior to blood sampling. The control group only underwent blood sampling.
34 Plasma samples were isolated for proteomic analysis using surface-enhanced laser desorption and
35 ionization - time of flight - mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). A total of seven proteins were
36 detected as up- or down-regulated in response to RIPC. These proteins had previously been identified
37 as associated with organ protection, anti-inflammation, and various cellular and molecular responses
38 to ischemia. In conclusion, this study indicates that RIPC results in significant modulations of plasma
39 proteome.

40

41 INTRODUCTION

42 First described in 1986 by Murry *et al.* [1], ischemic preconditioning (IPC) is a powerful
43 technique, consisting of short periods of coronary artery ischemia-reperfusion (I/R), that attenuate I/R
44 injuries caused by subsequent prolonged coronary occlusion. IPC can be effective in humans but
45 requires invasive procedure, which could be harmful in clinical settings [2,3]. Many experimental
46 studies have therefore explored another preconditioning method, easily applicable to most patients:
47 remote ischemic preconditioning (RIPC). This is a phenomenon whereby transient ischemia of a tissue
48 or an organ at a distance from the heart affords cardioprotection when applied before myocardial I/R
49 [4]. In this way, many remote tissues, such as the small intestine [5], kidney [6], or skeletal muscle [7],
50 have shown potential to reduce subsequent myocardial infarct size. Furthermore, RIPC, which uses a
51 standard blood pressure cuff placed around the arm, has emerged as an attractive non-invasive
52 strategy in clinical settings [8,9]. This approach has been taken in several clinical trials, and has been
53 shown to be effective in patients undergoing corrective cardiac surgery for congenital heart disease
54 [10], coronary bypass surgery [11,12], elective surgery for abdominal aortic aneurysm [13], or elective
55 percutaneous coronary intervention (PCI) [14]. More recently, RIPC was also demonstrated to
56 significantly decrease myocardial injury when applied in the ambulance during transfer to primary PCI
57 [15]. While the protective effects of RIPC are well-established, the underlying mechanisms involved
58 remain unknown. Dickson *et al.* [16] were the first to demonstrate that a blood transfer from a remote
59 preconditioned rabbit to a naive one exhibits protective benefits. This humoral cardioprotective
60 phenomenon has since been observed in other animal models, and includes coronary effluent transfer
61 [17] or RIPC cardioprotection of the recipient following brain-dead donor heart transplantation [18].
62 Shimizu *et al.* [19] have even shown that cross-species protection via RIPC is possible by protecting
63 rabbit cardiomyocytes with human blood. Although these experiments are clear evidence that
64 circulating humoral mediators play a major role in signal transduction [20], the identities of these
65 effectors remain undetermined. In the past, many proteomic techniques were used to seek out novel
66 biomarkers associated with cardiovascular diseases, such as left ventricular remodelling after a first
67 myocardial infarction [21,22] or abdominal aortic aneurysm [23]. In cardioprotection, a study using two-
68 dimensional gel electrophoresis (2-DE), matrix assisted laser desorption and ionization – time of flight
69 – mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), and liquid chromatography – electrospray ionization – tandem
70 mass spectrometry (nanoLC-ESI-MS/MS), was conducted to identify humoral factors involved in RIPC,

71 but without success [24]. Surface-enhanced laser desorption and ionization - time of flight - mass
72 spectrometry (SELDI-TOF-MS), is another proteomic method that combines both chromatography on
73 ProteinChip arrays and mass spectrometry (MS), providing a proteomic high-throughput strategy for
74 profiling potential humoral factors of RIPC [25]. Therefore, our research was designed to identify
75 potential RIPC-induced humoral mediators using SELDI-TOF-MS technology.
76

77 **MATERIALS AND METHODS**

78 *Ethics statement*

79 All experiments were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of*
80 *Laboratory Animals* published by the US National Institute of Health [NIH publication 85 (23), revised
81 in 1996]. Protocols have been approved by our regional ethic committee: Comité Régional d’Ethique
82 pour l’Expérimentation Animale-Pays de la Loire (CEEA.2012.50). All surgery was performed under
83 sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

84

85 *Animal studies*

86 Wild type male Wistar rats, 8- to 10-week-old, were anesthetized with an intraperitoneal
87 injection of sodium pentobarbital at a dose of 60 mg/kg (Ceva santé Animal, France). Animals were
88 orotracheally intubated with a 16-gauge tube and ventilated using a small animal ventilator at a rate of
89 50-60 breaths per minute (SAR-830 A/P, CWE). Body core temperature was continuously monitored
90 during the procedure and maintained at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ using a homeothermic blanket, connected to a
91 temperature control unit (HB101/2 RS, Bioseb, France). RPC was achieved by occlusion arterial
92 blood flow for 10 minutes, using a vascular clamp placed on the upper right femoral artery, followed by
93 reperfusion. Limb ischemia was confirmed by a change in skin color and a decrease in subcutaneous
94 limb temperature. Following limb reperfusion, the skin color turned back to a pink color, while the
95 under-skin temperature reached the baseline temperature. Rats were randomly assigned to one of
96 three groups: RPC 5', with blood sampling 5 minutes after the end of limb ischemia (n=10); RPC 10,
97 with blood sampling 10 minutes following the end of limb ischemia (n=10); Control (no intervention),
98 with blood sampling only (n=10). Vena cava blood samples were collected at 5 or 10 minutes after
99 limb reperfusion in glass tubes containing ethyldiamine tetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant.
100 Samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 min and plasma was taken and immediately processed,
101 divided into aliquots of 500 μL , and stored at -80°C . These samples underwent no more than two
102 freeze/thaw cycles prior to analysis.

103

104 *Sample treatment*

105 Combinatorial peptide ligand library (CPLL) with ProteoMiner protein enrichment kit (Bio-Rad
106 Laboratories, Hercules, CA) was used to pre-treat plasma samples as previously described [25].

107 These hexapeptides beads bind all the plasma proteins equally and allow to eliminate the excess of
108 unbound majority proteins. The low-abundance plasma proteins are enriched compared to the high-
109 abundance proteins which are in smaller quantities. The dynamic range is thus reduced. Columns
110 containing these beads were previously washed and 200 μ L of samples was then added and rotated
111 end to end for 2 h at room temperature. Unbound proteins were then eliminated and beads were
112 washed. Sample was then eluted by adding 20 μ L elution reagent, repeated three times. Elution
113 samples obtained from all 3 centrifugations were pooled and stored at -20°C .

114

115 *SELDI-TOF-MS profiling*

116 SELDI-TOF-MS analysis was used to profile samples collected for the selection of potential
117 biomarkers of remote conditioning. Samples were profiled with eight spot format ProteinChip Arrays
118 CM10 (Weak Cation Exchanger) or H50 (Reverse Phase) (Bio-Rad Laboratories). Arrays were
119 prepared with 5 μ L samples diluted 10-fold in binding buffer, which was sodium acetate 100 mmol/L
120 pH4 for CM10 and ACN10%, TFA 0.1% and NaCl 150 mmol/L for H50 array. Native and CPLL treated
121 forms of all samples were analyzed using the two types of ProteinChip and each of them was tested in
122 duplicate and randomly distributed on arrays, as previously described [25]. All data were processed
123 with the ProteinChip Data Manager software. For the peak selection of potential biomarkers, peaks
124 were detected automatically: groups of peaks of similar mass across spectra were assembled into
125 clusters, according to two-step parameter settings as previously described [25]. For the first step,
126 peaks were automatically detected according to the specified S/N (4 or 5) and the minimum valley
127 depth (3 or 4), if they were found in at least 10% of all spectra, with an m/z error of less than 0.2%.
128 Settings for the second step were a S/N of 2 and a minimum valley depth of 2. The m/z range was set
129 between 3000 and 30,000 for low-mass and between 20,000 and 150,000 for high-mass proteins.
130 Clusters of all spectra were then submitted to a univariate analysis with a non-parametric test to
131 calculate the p-value of each cluster. A Mann-Whitney test was used to compare groups in pairs and a
132 Kruskal-Wallis to compare the three groups. Duplicates were averaged before any statistical analysis.

133

134 *Protein sample purification*

135 Albumin and IgG were depleted, from samples not pre-treated by CPLL, with the ProteoPrep
136 Blue Albumin Depletion Kit (Sigma-Aldrich) before protein separation by MicroRotor cell or spin

137 columns. After equilibration of the column, 25 μ L of plasma was added; the sample was bound and
138 then washed with equilibration buffer. The flow-through obtained from centrifugations of the depleted
139 sample (125 μ L) was then pooled and stored at -20°C.

140 In accordance with a previous study [26], we chose an adapted strategy for enrichment and
141 purification of peaks selected by SELDI-TOF-MS, in order to identify them by MALDI-MS/MS. A set of
142 techniques was used.

143 Liquid-phase isoelectric focusing

144 Proteins were isolated and purified by liquid-phase isoelectrofocusing (IEF) with the
145 MicroRotofor cell (Bio-Rad Laboratories), according to their isoelectric points. 1-2 mg of protein samples
146 were diluted in IEF buffer (7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, CHAPS 4% [w/v] and 0.24% Triton X100),
147 glycerol 5% [v/v] and ampholytes (appropriate pH gradient, 1.6% [v/v]). The MicroRotofor cell's
148 focusing chamber was loaded with 2.5 mL of samples and the electrode assemblies were filled with 6
149 mL of appropriate electrolytes (depending of the pH range investigated). Focusing was performed at
150 room temperature, under a constant power of 1 W. At the end of the IEF, protein fractions from each
151 compartment (200 μ L) were harvested quickly to avoid the diffusion of separated proteins and stored
152 at -20°C. Detection of peaks was performed on a ProteinChip NP20 array.

153 Protein treatment

154 Before SELDI-TOF-MS analysis of fractioned proteins, the 2-D Clean-Up kit (GE Healthcare)
155 was used to precipitate proteins, and precipitation was performed to selectively discard contaminant
156 from proteins. 300 μ L of precipitant and co-precipitant were added to samples (1–100 μ g protein),
157 which were then centrifuged. The supernatant was removed and the protein pellet was washed by 40
158 μ L of co-precipitant to remove more non-protein contaminants. After a second centrifugation, the pellet
159 was finally suspended in 25 μ L of deionized water, 1 mL of wash buffer and 5 μ L of wash additive.
160 Proteins from samples were too diluted for separation on spin columns. A precipitation was thus
161 realized for 30 min at -20°C to concentrate proteins from samples. The mixture was then centrifuged
162 and the pellet was finally dissolved in 20 μ L of deionized water and stored at -20°C.

163 Gel electrophoresis

164 Fractions (or pooled fractions) containing the purified peak of interest were separated with
165 SDS-PAGE gels with an appropriate percentage of acrylamide depending on the mass of the peak of

166 interest (Bio-Rad Laboratories). Gels were then stained with Coomassie Brilliant Blue, as described by
167 Neuhoff *et al.* [27].

168

169 *Protein Identification*

170 Trypsic digestion

171 Proteins were then identified by an in-gel digestion method, as previously described [28].
172 Briefly, the band of interest was excised and the gel plugs were washed with ultrapure water until
173 totally destained. Gel pieces were then rinsed several times with 50 mM ammonium bicarbonate and
174 acetonitrile (ACN), before addition of 3 μ L of 40 μ g/mL trypsin (Trypsin Gold, Promega, Madison, WI)
175 in 50 mmol/L acetic acid and 0.025% ProteasMAX™ Surfactant (Trypsine Enhancer, Promega,
176 Madison, WI). After digestion overnight at 37°C, the supernatant was removed, and the gel pieces
177 were washed with CAN [v/v]/0.1% TFA. Supernatants were desalted and eluted with ZipTip C18 in
178 accordance with the manufacturer's protocol (Millipore, Bedford, MA). 0.5 μ L of this solution was then
179 mixed with 0.5 μ L of matrix solution (5 mg/mL of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid dissolved in 10%
180 TFA / 50% ACN) and spotted onto the MALDI-TOF-MS target.

181 MALDI-TOF profiling

182 External calibration was performed with a peptide mixture resultant from the tryptic digest of
183 BSA (0.5 μ g/mL). MALDI-TOF-MS was then performed with a Voyager DE STR mass spectrometer
184 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) equipped with a 337.1 nm nitrogen laser and a
185 delayed extraction facility (125 msec). All spectra were acquired in a positive ion reflector mode at the
186 voltage of 20 kV, with grid-voltage of 61%. Typically, 300 laser shots were recorded per sample.
187 Following this, the mass spectra were calibrated prior to protein identification by peptide mass
188 fingerprinting, conducted by running the MASCOT web searcher (<http://www.matrixscience.com/>,
189 Matrix Science, UK) against the Swissprot 57-15 (515203 sequences; 181334896 residues) with the
190 following parameters: fixed modifications: carbamidomethyl (C) and variable modifications: oxidation
191 (M); peptide mass tolerance: \pm 50 ppm; peptide charge state: 1+; max missed cleavages: 1;
192 taxonomy: rattus.

193

194 *Verification of identification by immunodepletion*

195 After identification by MALDI-TOF-MS, validation was performed by immunodepletion using
196 specific antibodies against the protein identified. 500 μ L of RIPA buffer (Triton X-100 1%, NaCl 150
197 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, sodium vanadate 0.1 mmol/L, and NP40 0.5% in Tris-HCl
198 10 mmol/L) was added by 1 μ L of native plasma sample and 5 or 10 μ g of antibodies, as previously
199 described [22]. The antibodies used were for haptoglobin (SantaCruz sc-134466), hemoglobin
200 (SantaCruz sc-31116), apolipoprotein C-III (Tebu-bio, 036sc-50378), transthyretin (Abcam, ab905),
201 apolipoprotein A-IV (SantaCruz sc-19036) and fibrinogen (sc-335581). After overnight incubation at
202 4°C, 50 μ L of protein A Sepharose 4 Fast Flow beads (GE Healthcare) were added and the
203 preparation was rotated end-to-end 4 h at 4°C. Supernatant was next obtained after centrifugation,
204 and was precipitated in cold acetone overnight. Supernatant was removed after centrifugation 20 min
205 at 12,000 g and pellet was dried 5 min at room temperature and added by 5 μ L of SELDI binding
206 buffer (depending on the array). Immunodepleted and undepleted plasma were compared by SELDI-
207 TOF-MS on ProteinChip CM10 or H50 arrays and disappearance of the peak of interest was
208 visualized, compare to untreated plasma.

209

210 *Statistical analysis*

211 All values were expressed as mean \pm SEM. Clusters of all spectra obtained using SELDI-TOF-
212 MS were subjected to univariate analysis, with a non-parametric test to calculate the *p* value of each
213 cluster. A Mann-Whitney test was used to compare groups in pairs and a Kruskal-Wallis test to
214 compare the three groups. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

215

216 RESULTS

217 SELDI-TOF-MS profiling of plasma in RIPC-induced circulating factors in rats

218 Plasmas from three groups of rats were analysed for differential proteomic analysis. The three
219 groups are: Control (CRTL), which endured no intervention (except blood sampling), RIPC 5' and
220 RIPC 10' groups, which endured blood sampling respectively 5 and 10 minutes after the end of limb
221 ischemia.

222 All plasmas (n=10 per group) were treated by CPLL as previously described [25]. The protein
223 profiling of CPLL-treated and untreated plasma from the different groups was performed in duplicate
224 with SELDI-TOF-MS technology on CM10 and H50 arrays.

225 Using the clustering parameters described in Materials and methods section, we detected in
226 the three groups of rats, a total of 130 peaks for CM10 arrays and 166 peaks for H50 arrays.
227 Interestingly, we observed with the two arrays an increased number of peaks detected after CPLL
228 treatment with 60 additional peaks in CM10 and 55 additional peaks in H50 arrays (**Figure 1A**)
229 representing respectively 46% in CM10 arrays and 33% in H50 arrays of the total peaks detected.

230 SELDI-TOF analysis revealed 42 significant ($p < 0.05$) modulations of peak intensity between
231 two groups of rats with 18 down-regulated, 21 up-regulated and 3 down- or up-regulated (7192, 21120
232 and 140846 m/z) depending on the groups (**Table 1**). Only 3 peaks were found to be significantly
233 expressed between CRTL and RIPC 5' groups, 25 peaks between CRTL and RIPC 10' groups and 24
234 peaks between RIPC 5' and RIPC 10' groups (**Figure 1B**). Interestingly, no peaks differentially
235 expressed were in common between the three groups and only few between comparisons by two
236 groups (**Figure 1B**).

237

238 Protein identification of the peaks differentially expressed between the three groups of rats

239 We followed the same strategy for purification and mass spectrometry identification of SELDI
240 peaks corresponding to low-abundance proteins that has been described previously [26]. The first step
241 was the choice of the appropriate sample containing the selected peaks. From our databank recording
242 all the m/z peaks detected from samples in different conditions, we excluded 12 peaks of our
243 proteomic profiling to be purified (**Table 1**) due to low abundance in the sample or too much high
244 intensity of peaks surrounded the peak to be purified. For the 6560, 7017, 7227, 8405, 8527, 9566,
245 13038, 13156, 13794, 21120, 21182, 21354, 21390 and 26026 m/z peaks, we used the strategy

246 described previously [26] but we were unsuccessful to purify them and identify the corresponding
247 protein.

248 Three SELDI peaks, 27583/27791/28284 have already been identified and validated to be
249 apolipoprotein A-I [29].

250 For the other peaks (8317, 13720, 27340, 42427-42463, 42610 and 54700 *m/z*), the strategy
251 already published was used and successful [26]. Detailed information on these peaks with significant
252 mean intensity levels between the CRTL, RIPC 5' and RIPC 10' groups are provided on **Table 2**.
253 Complete purification and protein identification process of the 8317 *m/z* peak is detailed below and is
254 representative of the strategy used.

255 **Figure 2A** presents a detailed representative spectrum of 8317 *m/z* peak for one rat from
256 each group (left panel) and the mean intensity level in each group (right panel). Interestingly, we
257 observed a decreased intensity for the peak at 10-min reperfusion compared to Control. Purification of
258 the 8317 *m/z* peak by liquid-phase IEF (fraction F1) and gel electrophoresis (**Figure 2B**) combined
259 with mass spectrometry successfully identified the 8317 *m/z* peak as being apolipoprotein C-III (ApoC-
260 III) (**Figure 2C**). We verified the identification of 8317 peak using a specific polyclonal antibody.
261 Immunodepletion significantly reduced the peak, thereby confirming the identification of the 8317 *m/z*
262 peak as ApoC-III (**Figure 2C**).

263 Data concerning the others peaks are presented in supplemental section (Figures S1-S7).

264

265 **DISCUSSION**

266 Our study's major finding is that RIPC induced significant modulations in blood's protein
267 composition. We used the SELDI-TOF-MS method on ProteinChip Arrays, well known for its potential
268 to identify circulating biomarkers of cardiovascular diseases [22,25]. The CPLL was also employed
269 with the goal of reducing high-abundance proteins and increasing the concentration of rare species.
270 These low- and very low-abundance proteins, called deep proteomes, constitute the vast majority of
271 human proteomes, and their analysis is an undeniable asset in the quest to identify the circulating
272 factors of RIPC [26,28]. The SELDI-TOF-MS analysis revealed a significant modification in plasma
273 proteome following RIPC stimulus, with 296 peaks differentially expressed. Of these peaks, 100 were
274 detected in native plasma, 115 in CPLL-treated plasma, and 81 in both forms of plasma. These results
275 confirmed the relevance of plasma proteome analysis for the identification of circulating factors of
276 RIPC. Finally, we found several proteins significantly modulated in response to RIPC.

277

278 These findings accord with numerous studies suggesting the key role of humoral mediators in
279 RIPC signalling [18,20]. Indeed, the mechanism for conveying cardioprotective information to the heart
280 is still unknown, though many authors suggest that circulating factors could be released from the
281 remote organ [16,17,19]. One proteomic study sought to identify the circulating factors of RIPC, but
282 the results were inconclusive [24]. Having failed to successfully identify a cardioprotective protein,
283 biochemical studies were then performed to characterize the chemical nature and molecular size of
284 the circulating factors. The consensus is that the humoral factor is hydrophobic, and sized between 3.5
285 and 30 kDa [19,24,30,31]. Over the last few years, proteomic and genomic techniques have been
286 used to better define gene and protein expression modulations in response to RIPC stimulus [32].
287 Hepponstall *et al.* recently demonstrated that the transient I/R of an arm modifies plasma protein
288 content in healthy volunteers. They identified 51 proteins significantly modulated after RIPC,
289 strengthening the hypothesis of cardioprotective circulating RIPC factors [33]. In the same way, our
290 study sought to identify plasma proteome modifications in rats following RIPC stimulus. We identified
291 seven proteins that were significantly modulated after RIPC and involved in hemostasis, lipid transport,
292 iron regulation, and the anti-inflammatory process. Our group recently published the identification of
293 apolipoprotein A-I (ApoA-I) as a potential RIPC-induced circulating factor [29]. ApoA-I, shown to be
294 significantly increased in rat plasma following RIPC stimulus, was able to recapitulate the

295 cardioprotection offered by RIPC when injected before myocardial I/R. Interestingly, some of the
296 proteins identified in the present study are linked to this protein's homeostasis. Notably, most of the
297 proteins identified have a molecular size below 30 kDa, in accordance with the humoral RIPC factors'
298 hypothesized size.

299

300 Haptoglobin (Hp) is a protein, synthesized in the liver, that scavenges hemoglobin (Hb) during
301 hemolysis [34]. It is also known to exhibit strong anti-oxidant and anti-inflammatory properties, among
302 them lymphocyte T helper-2 cytokine release and inhibition of cyclooxygenase [34], along with some
303 tissular effects, like facilitating cell migration, angiogenesis, and tissue repair, and arterial restructuring
304 by inhibition of gelatin degradation [35]. The involvement of Hp in I/R is not clearly described, but liver
305 protection against I/R by pharmacological RIPC was related to a preservation of Hp expression, while
306 I/R alone decreased Hp expression by 50% [36]. Furthermore, Hp was shown to bind to ApoA-I in
307 order to protect its structure and function against hydroxyl radical-induced damages [37].

308

309 Transthyretin (TTR), or prealbumin, is a plasmatic protein synthesized in the liver and choroid
310 plexus that is involved in the plasma and cerebrospinal fluid, carrying of thyroid hormones (T3, T4),
311 retinol, and vitamin A [38]. In brain I/R models, TTR has neuroprotective effects, as TTR^{-/-} mice exhibit
312 larger infarcts, increased edema formation, and delayed nerve regeneration [39]. TTR protective
313 effects are mediated by the thyroid hormones carried, including reverse intracellular H⁺ accumulation
314 after I/R, via stimulation of its efflux through a Na⁺/H⁺ exchanger. These events, occurring in the brain,
315 are classically described in myocardial I/R injuries and could be extrapolated to cardioprotection of
316 TTR through thyroid hormones. In addition to these cellular homeostatic effects, TTR seems to display
317 anti-inflammatory properties via inhibition of monocyte and endothelial cells' interleukine-1 production
318 [40]. Furthermore, in humans, TTR levels are significantly lower in patients with acute myocardial
319 infarction [38], suggesting increase in TTR levels may have a cardioprotective effect in RIPC. TTR is a
320 14 kDa protein present in different homomeric forms, such as dimeric (dTTR; 28 kDa) and monomeric
321 (mTTR; 14 kDa) forms, in human plasma. Levels of mTTR have been shown to be significantly
322 decreased in plasma from patients with familiar hypercholesterolemia in conjunction with episodes of
323 cardiovascular disease, pointing to a protective effect of mTTR [38]. Interestingly, these two forms
324 were significantly modulated in the different groups of rats in our study, with an up-regulation of mTTR

325 and a down-regulation of dTTR in RIPC. Our data is consistent with a previous study of Suzuyama *et*
326 *al.* [41]. The authors also used a SELDI-TOF-MS approach in order to identify changes in the rat
327 cerebrospinal fluid proteome after transient focal cerebral ischemia, and demonstrated the monomeric
328 form of TTR to be significantly increased during the acute phase of reperfusion. Hepponstall *et al.* also
329 described TTR as over-expressed following RIPC in humans [33]. Interestingly, TTR is associated to
330 ApoA-I in high-density lipoproteins (HDL) [42], and the only form carried by HDL is mTTR [38]. TTR,
331 thus, has protective properties on its own through its carrying of thyroid hormones.

332

333 Fibrinogen β (Fg β) is a hemostatic protein promoting platelet adhesion during I/R that was
334 found to be down-regulated in the RIPC group. Platelet recruitment is induced by ICAM-1 expression
335 on ischemic endothelial cells and leads to coronary reocclusion and an inflammatory response via
336 ROS and cytokine release [43]. Its reduction could be related to protective effects of RIPC. Fg β is
337 transformed into fibrin β (F β) by thrombin, and then into the fibrin-derived peptide B β ₁₅₋₄₂ (B β ₁₅₋₄₂).
338 B β ₁₅₋₄₂ corresponds to amino acids situated on the β -chain of F β , binding to VE-cadherin. In
339 myocardial and kidney I/R, this peptide prevents interaction with leukocytes and their infiltration into
340 the infarcted tissue [44]. B β ₁₅₋₄₂ has also been shown to reduce infarct size and production of IL-1 β ,
341 TNF- α , and IL-6 [44-47]. These results evince the role of Fg β in cardioprotection. The decrease in Fg β
342 in the RIPC group that our study observed suggests a degradation of F β in B β ₁₅₋₄₂ by RIPC. As the
343 *m/z* detectable range limit in the SELDI-TOF-MS analysis was 3000 Da, we can speculate that the
344 B β ₁₅₋₄₂ peptide was too small to be detected.

345

346 Apolipoprotein C-III (ApoC-III) is a small plasma protein of 8 kDa, synthesized in the liver, that
347 presents mainly in very low density lipoproteins (VLDL) but also in low density lipoproteins (LDL) and
348 HDL. Involved in triglyceride-rich lipoprotein clearance and catabolism, ApoC-III is associated with
349 hypertriglyceridemia, type-I diabetes, and coronary heart diseases [48-50]. ApoC-III also induces
350 inflammation, via ICAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells, leading to
351 atherosclerosis [51].

352

353 Overall, most of the proteins identified in our study are in accordance with a protective role of
354 RIPC. Some proteins play a role in anti-inflammation, oxidative stress inhibition, hemostasis, and

355 tissue repair, and others have cardioprotective properties documented in the literature. ApoA-I has
356 recently been described as a potential circulating factor of RIPC [29]. Our study presents clear
357 evidence that RIPC can induce rapid modulation in different plasma proteins. We have only studied
358 the early response to RIPC (5- and 10-min limb reperfusion), which explains why the majority of the
359 identified proteins were up-regulated. Nevertheless, these results are consistent with Hepponstall *et al.*
360 [33] who described a strong tendency toward protein up-regulation following RIPC, followed by a
361 down-regulation at 15-min and 24 h reperfusion.

362 The use of the SELDI-TOF-MS, for its ability to identify circulating biomarkers in plasma,
363 combined with CPLL treatment, for studying deep-proteome, was successful. We have identified
364 potential mediators of RIPC, having taken their size into consideration. Some of these proteins may be
365 able to mimic RIPC cardioprotection *in vivo*, which could be a major step in the use of cardioprotection
366 in clinical practice. These proteins' capacity to mimic cardioprotection induced by RIPC must still be
367 validated.

368

369 **CONCLUSION**

370 Our data shows that RIPC by a short episode of limb I/R *in vivo* was highly related to
371 proteomic modulation, with up- and down-regulation of plasma protein expression. We identified seven
372 significantly modulated proteins as potential blood-borne RIPC factors. This data supports the
373 involvement of circulating mediators in signal transduction from remote organs to the heart.

374

375 **ACKNOWLEDGEMENTS**

376 The authors would like to thank Pierre Legras and Jerome Roux from *Service Commun*
377 *Animalerie Hospitalo-Universitaire* for taking care of the animals.

378

379 **References**

- 380 1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell
381 injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136.
- 382 2. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, et al. (1997) Ischaemic preconditioning
383 reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 77:
384 314-318.
- 385 3. Walsh SR, Tang TY, Kullar P, Jenkins DP, Dutka DP, et al. (2008) Ischaemic preconditioning during
386 cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in
387 randomised clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg* 34: 985-994.
- 388 4. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P (1993) Regional ischemic 'preconditioning'
389 protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*
390 87: 893-899.
- 391 5. Schoemaker RG, van Heijningen CL (2000) Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a
392 distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1571-1576.
- 393 6. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM (1998) Renal ischemia preconditions myocardium: role of
394 adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 275: H1542-1547.
- 395 7. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA (1997) Ischemic preconditioning at a distance: reduction of
396 myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of
397 the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 96: 1641-1646.
- 398 8. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, et al. (2002) Transient limb
399 ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 106: 2881-2883.
- 400 9. Brevoord D, Kranke P, Kuijpers M, Weber N, Hollmann M, et al. (2012) Remote ischemic
401 conditioning to protect against ischemia-reperfusion injury: a systematic review and meta-
402 analysis. *PLoS One* 7: e42179.
- 403 10. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, et al. (2006) Randomized
404 controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing
405 cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol* 47: 2277-2282.
- 406 11. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, et al. (2007) Effect of remote
407 ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass
408 graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 370: 575-579.

- 409 12. Thielmann M, Kottenberg E, Boengler K, Raffelsieper C, Neuhaeuser M, et al. (2010) Remote
410 ischemic preconditioning reduces myocardial injury after coronary artery bypass surgery with
411 crystalloid cardioplegic arrest. *Basic Res Cardiol* 105: 657-664.
- 412 13. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, et al. (2007) Remote ischemic preconditioning
413 reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a
414 randomized controlled trial. *Circulation* 116: I98-105.
- 415 14. Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmke R, et al. (2009) Cardiac Remote Ischemic
416 Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control
417 trial. *Circulation* 119: 820-827.
- 418 15. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bottcher M, Kaltoft AK, et al. (2010) Remote ischaemic
419 conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on
420 myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet*
421 375: 727-734.
- 422 16. Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP, Becker RC, Porcaro WA, et al. (1999) Ischemic
423 preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J*
424 *Thromb Thrombolysis* 8: 123-129.
- 425 17. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, et al. (1999) Rabbit heart can be
426 "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol* 277: H2451-2457.
- 427 18. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, et al. (2005) Remote ischemic
428 preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the
429 denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation* 79: 1691-
430 1695.
- 431 19. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, et al. (2009) Transient limb ischaemia
432 remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium:
433 evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)* 117: 191-200.
- 434 20. Breivik L, Helgeland E, Aarnes EK, Mrdalj J, Jonassen AK (2011) Remote postconditioning by
435 humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-
436 dependent cell-survival signaling at reperfusion. *Basic Res Cardiol* 106: 135-145.

- 437 21. Dubois E, Richard V, Mulder P, Lamblin N, Drobecq H, et al. (2011) Decreased serine207
438 phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial
439 infarction. *Eur Heart J* 32: 115-123.
- 440 22. Pinet F, Beseme O, Cieniewski-Bernard C, Drobecq H, Jourdain S, et al. (2008) Predicting left
441 ventricular remodeling after a first myocardial infarction by plasma proteome analysis.
442 *Proteomics* 8: 1798-1808.
- 443 23. Acosta-Martin AE, Panchaud A, Chwastyniak M, Dupont A, Juthier F, et al. (2011) Quantitative
444 mass spectrometry analysis using PAcFIC for the identification of plasma diagnostic
445 biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *PLoS One* 6: e28698.
- 446 24. Lang SC, Elsasser A, Scheler C, Vetter S, Tiefenbacher CP, et al. (2006) Myocardial
447 preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a protective factor using
448 proteomic methods? *Basic Res Cardiol* 101: 149-158.
- 449 25. Fertin M, Beseme O, Duban S, Amouyel P, Bauters C, et al. (2010) Deep plasma proteomic
450 analysis of patients with left ventricular remodeling after a first myocardial infarction.
451 *Proteomics Clin Appl* 4: 654-673.
- 452 26. Fertin M, Burdese J, Beseme O, Amouyel P, Bauters C, et al. (2011) Strategy for purification and
453 mass spectrometry identification of SELDI peaks corresponding to low-abundance plasma and
454 serum proteins. *J Proteomics* 74: 420-430.
- 455 27. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide
456 gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using
457 Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262.
- 458 28. Beseme O, Fertin M, Drobecq H, Amouyel P, Pinet F (2010) Combinatorial peptide ligand library
459 plasma treatment: Advantages for accessing low-abundance proteins. *Electrophoresis* 31:
460 2697-2704.
- 461 29. Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Beseme O, Chwastyniak M, Tamarelle S, et al. (2013)
462 Apolipoprotein A-I Is a Potential Mediator of Remote Ischemic Preconditioning. *PLoS One* 8:
463 e77211.
- 464 30. Dickson EW, Blehar DJ, Carraway RE, Heard SO, Steinberg G, et al. (2001) Naloxone blocks
465 transferred preconditioning in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1751-1756.

- 466 31. Serejo FC, Rodrigues LF, Jr., da Silva Tavares KC, de Carvalho AC, Nascimento JH (2007)
467 Cardioprotective properties of humoral factors released from rat hearts subject to ischemic
468 preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol* 49: 214-220.
- 469 32. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, et al. (2004) The remote ischemic
470 preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol*
471 *Genomics* 19: 143-150.
- 472 33. Hepponstall M, Ignjatovic V, Binos S, Monagle P, Jones B, et al. (2012) Remote Ischemic
473 Preconditioning (RIPC) Modifies Plasma Proteome in Humans. *PLoS One* 7: e48284.
- 474 34. Quaye IK (2008) Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 735-
475 742.
- 476 35. de Kleijn DP, Smeets MB, Kemmeren PP, Lim SK, Van Middelaar BJ, et al. (2002) Acute-phase
477 protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring. *FASEB J* 16:
478 1123-1125.
- 479 36. Fernandez V, Castillo I, Tapia G, Romanque P, Uribe-Echevarria S, et al. (2007) Thyroid hormone
480 preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology* 45:
481 170-177.
- 482 37. Salvatore A, Cigliano L, Bucci EM, Corpillo D, Velasco S, et al. (2007) Haptoglobin binding to
483 apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the
484 enzyme lecithin-cholesterol acyl-transferase. *Biochemistry* 46: 11158-11168.
- 485 38. Cubedo J, Padro T, Alonso R, Cinca J, Mata P, et al. (2012) Differential proteomic distribution of
486 TTR (pre-albumin) forms in serum and HDL of patients with high cardiovascular risk.
487 *Atherosclerosis* 222: 263-269.
- 488 39. Santos SD, Lambertsen KL, Clausen BH, Akinc A, Alvarez R, et al. (2010) CSF transthyretin
489 neuroprotection in a mouse model of brain ischemia. *J Neurochem* 115: 1434-1444.
- 490 40. Borish L, King MS, Mascali JJ, Johnson S, Coll B, et al. (1992) Transthyretin is an inhibitor of
491 monocyte and endothelial cell interleukin-1 production. *Inflammation* 16: 471-484.
- 492 41. Suzuyama K, Shiraishi T, Oishi T, Ueda S, Okamoto H, et al. (2004) Combined proteomic
493 approach with SELDI-TOF-MS and peptide mass fingerprinting identified the rapid increase of
494 monomeric transthyretin in rat cerebrospinal fluid after transient focal cerebral ischemia. *Brain*
495 *Res Mol Brain Res* 129: 44-53.

- 496 42. Sousa MM, Berglund L, Saraiva MJ (2000) Transthyretin in high density lipoproteins: association
497 with apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 41: 58-65.
- 498 43. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, et al. (1999) Fibrinogen deposition at the
499 postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo.
500 *Blood* 94: 3829-3838.
- 501 44. Petzelbauer P, Zacharowski PA, Miyazaki Y, Friedl P, Wickenhauser G, et al. (2005) The fibrin-
502 derived peptide Bbeta15-42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. *Nat*
503 *Med* 11: 298-304.
- 504 45. Krishnamoorthy A, Ajay AK, Hoffmann D, Kim TM, Ramirez V, et al. (2011) Fibrinogen beta-
505 derived Bbeta(15-42) peptide protects against kidney ischemia/reperfusion injury. *Blood* 118:
506 1934-1942.
- 507 46. Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Mersmann J, Zacharowski PA, et al. (2007) The fibrin-derived
508 peptide Bbeta15-42 is cardioprotective in a pig model of myocardial ischemia-reperfusion
509 injury. *Crit Care Med* 35: 1730-1735.
- 510 47. Zacharowski K, Zacharowski PA, Friedl P, Mastan P, Koch A, et al. (2007) The effects of the fibrin-
511 derived peptide Bbeta(15-42) in acute and chronic rodent models of myocardial ischemia-
512 reperfusion. *Shock* 27: 631-637.
- 513 48. Gerber Y, Goldbourt U, Segev S, Harats D (2003) Indices related to apo CII and CIII serum
514 concentrations and coronary heart disease: a case-control study. *Prev Med* 37: 18-22.
- 515 49. Ooi EM, Barrett PH, Chan DC, Watts GF (2008) Apolipoprotein C-III: understanding an emerging
516 cardiovascular risk factor. *Clin Sci (Lond)* 114: 611-624.
- 517 50. Yao Z, Wang Y (2012) Apolipoprotein C-III and hepatic triglyceride-rich lipoprotein production. *Curr*
518 *Opin Lipidol* 23: 206-212.
- 519 51. Kawakami A, Yoshida M (2009) Apolipoprotein CIII links dyslipidemia with atherosclerosis. *J*
520 *Atheroscler Thromb* 16: 6-11.
- 521

522 **FIGURE LEGENDS**

523 **Figure 1. Venn diagram demonstrating the number of SELDI peaks detected and analysed for**
524 **the comparison between the CRTL, RIPC 5' and RIPC 10' groups. A:** Comparison of the number
525 of peaks detected before or after CPLL treatment of plasma samples in CM10 and H50 arrays. **B:**
526 Comparison of the number of peaks with significant modulations of intensity in the CRTL, RIPC 5' and
527 RIPC 10'. All the samples were analyzed in duplicate.

528

529 **Figure 2. Profiling, purification and identification of the protein corresponding to the 8317 *m/z***
530 **peak. A:** Representative SELDI-TOF-MS protein spectra of plasma sample from one Control, one
531 RIPC 5', and one RIPC 10' rat. Results are presented as intensities of SELDI-TOF reading (arbitrary
532 units). The 8317 *m/z* peak was found to be differentially expressed on the CM10 array as calculated
533 by the Mann-Whitney test (left panel). Scattergram showing the significant differences in intensity of
534 8317 *m/z* peak in plasma samples derived from Control, RIPC 5', and RIPC 10' rats. The continuous
535 line represents the mean, and dots represent each individual rat (n=10 in each group) (right panel).
536 Detailed *p*-value data for comparison between the three groups is indicated in Table 2. **B:** Purification
537 of the protein corresponding to the 8317 *m/z* peak. SELDI-TOF-MS protein spectrum of fractions F1,
538 F2, F3, F4, F5 and F6 from MicroRotor® cell, by a pH gradient 7-9 (left panel). Each fraction (F1, F2,
539 F3, F4, F5 and F6) was analyzed on NU-PAGE 10% coomassie blue stained-gel. The band
540 corresponding to the 8317 *m/z* peak was framed (right panel). **C:** Identification of the 8317 *m/z* peak
541 by mass spectrometry. Aminoacids indicated in red corresponds to the peptides identified in
542 Apolipoprotein C-III (ApoC-III) (left panel). SELDI-TOF-MS protein spectra of crude (untreated) and
543 immunodepleted plasma (20 μ L) with 10 μ g ApoC-III antibody (depleted) showed the decrease in 8317
544 *m/z* peak following immunodepletion, validating the identification (right panel).

545

Table 1. SELDI peaks selected to be differentially expressed

CRTL/RIPC 5'		CRTL/RIPC 10'		RIPC 5'/RIPC 10'	
Down-	Up-regulated	Down-	Up-regulated	Down-	Up-regulated
		<u>4386</u>			
		6560			
			7017		
			<u>7140</u>		<u>7140</u>
7192					<u>7192</u>
			7227		
			8224		
			8317		
			8405		
			8527		
		9420			
			9566		9566
13038		<u>13038</u>			
		13156			
		<u>13341</u>			
				13720	
				13794	
				<u>13902</u>	
					15870
					15980
		21120			21120
		21182			
				21354	
		21390			
				26026	
			27340		
					27583
				27791	
		28284			
			<u>29133</u>		
			42427		42427
			42463		42463
					42610
					<u>43655</u>
					54700
			<u>76060</u>		<u>76060</u>
				<u>87765</u>	
					<u>102847</u>
		<u>109310</u>		<u>109310</u>	
				<u>115169</u>	
			<u>138820</u>		
140846					<u>140846</u>

547 Only peaks with statistical difference expression ($p < 0.05$) between two groups are indicated and
 548 expressed in m/z.

549 Peaks outlined are common between two groups.

550 Peaks underlined are impossible to purify for protein identification

551

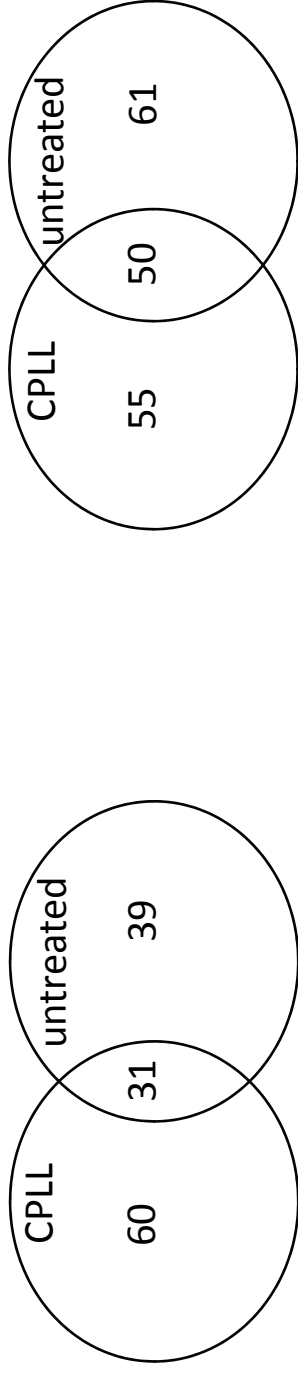
Table 2. SELDI profiles of plasma from CTRL, RIPC 5' and RIPC 10' rats

Peaks* m/z (Da)	Accession number	Protein name	CTRL (n=10)	RIPC 5' (n=10)	RIPC 10' (n=10)	Statistical analysis [#]
8317	P06759	Apolipoprotein C-III	4.98 ± 2.41	3.43 ± 1.40	2.89 ± 0.79	CRTL vs RIPC 10' (p=0.02) CRTL vs RIPC 5' vs RIPC 10' (p=0.056)
9420	P00738	Haptoglobine alpha chain	8.53 ± 1.28	9.38 ± 1.68	9.50 ± 0.66	CRTL vs RIPC 10' (p=0.059)
13720	P02767	Transthyretin (<i>monomeric form</i>)	1.77 ± 0.37	1.59 ± 0.27	1.87 ± 0.31	RIPC 5' vs RIPC 10' (p = 0.059)
15870	P02091	Hemoglobin beta chain	0.55 ± 0.31	0.64 ± 0.35	0.40 ± 0.17	RIPC 5' vs RIPC 10' (p = 0.059)
15980	P02091	Hemoglobin beta chain	0.87 ± 0.52	0.93 ± 0.46	0.62 ± 0.27	RIPC 5' vs RIPC 10' (p = 0.059)
27340	P02767	Transthyretin (<i>dimeric form</i>)	70.09 ± 4.67	66.36 ± 4.81	66.12 ± 5.81	CRTL vs RIPC 10' (p=0.028) CRTL vs RIPC 5' vs RIPC 10' (p=0.066)
42427			1.61 ± 0.24	1.69 ± 0.29	1.41 ± 0.21	RIPC 5' vs RIPC 10' (p = 0.049)
42463	P02651	Apolipoprotein A-IV	0.39 ± 0.12	0.33 ± 0.06	0.30 ± 0.08	CRTL vs RIPC 10' (p=0.059)
42610			1.02 ± 0.14	1.06 ± 0.17	0.89 ± 0.13	RIPC 5' vs RIPC 10' (p = 0.059)
54700	P14480	Fibrinogen beta chain	6.46 ± 0.86	7.09 ± 1.47	6.23 ± 1.07	RIPC 5' vs RIPC 10' (p = 0.028) CRTL vs RIPC 5' vs RIPC 10' (p=0.071)

*only the peaks with protein identification validated are listed.

[#] Mann-whitney test was used to compare 2 groups and Kruskal-Wallis test for the 3 groups

A



CM10 profiling

H50 profiling

B

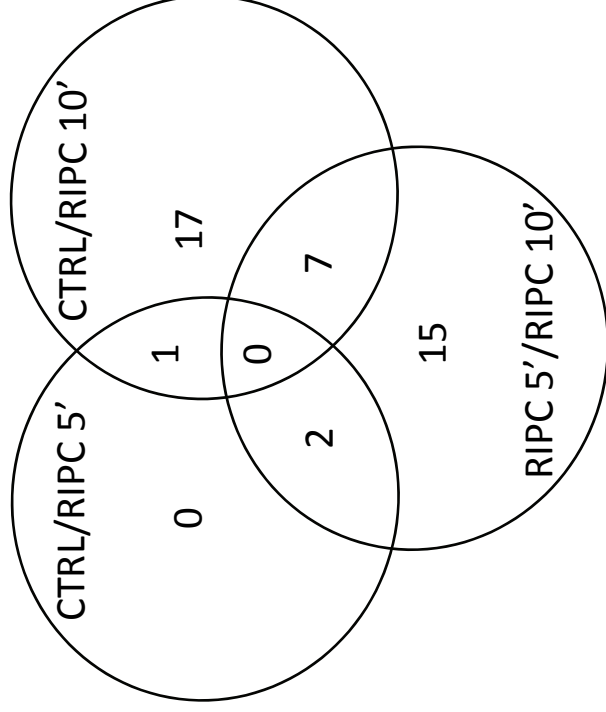
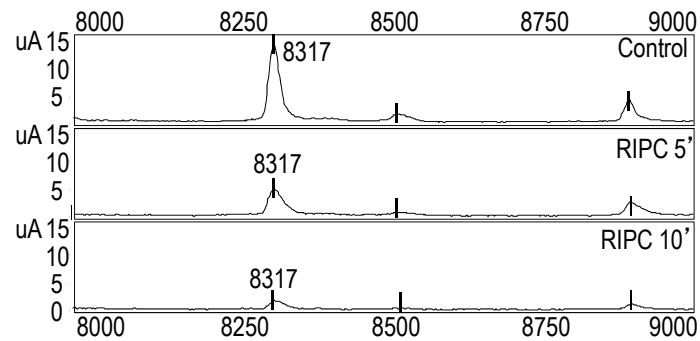


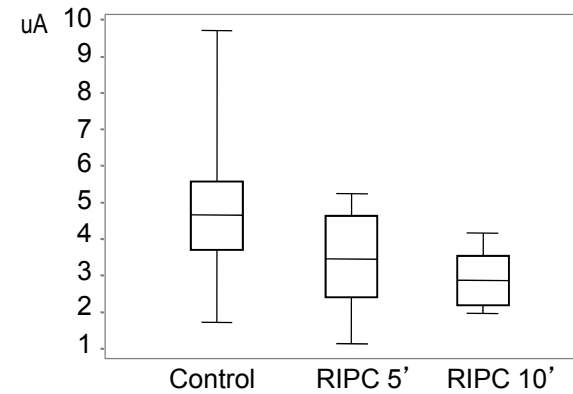
Figure 1

A**Profiling**

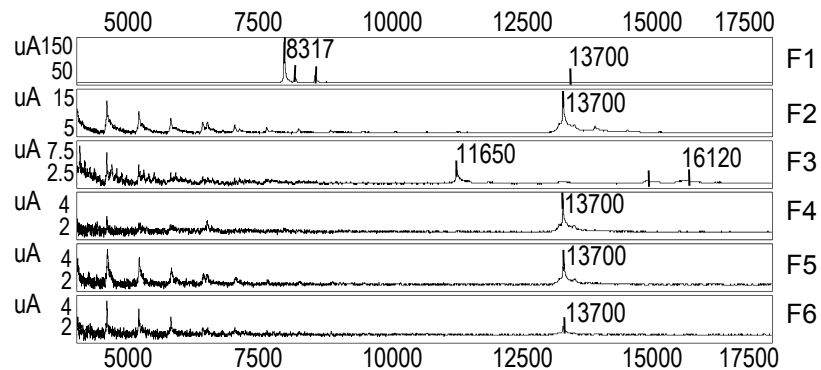
8317 m/z peak

**Quantification**

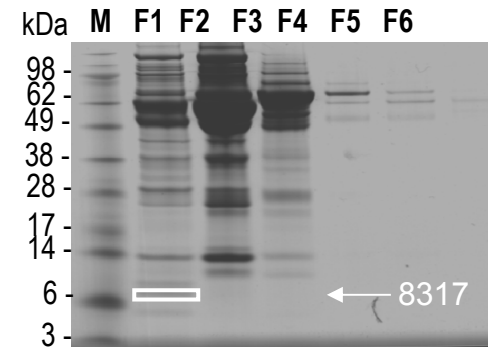
8317 m/z peak

**B****Purification by liquid-phase electrofocusing**

8317 m/z peak (pH 7-9)

**Purification by gel electrophoresis**

8317 m/z peak

**C****Peptides identified by MS**

In ApoC-III sequence corresponding to 8317m/z peak

1 MQPRMLLIVA LVALLASARA DEEGSLLLG
 31 SMQGYMEQAS KTVQDALSSM QESDIAVVAS
 61 RGWMDNRFKS **LKGYWSKFTD KFTGLWESGP**
 91 **EDQLTTPPLE P**

Immunoprecipitation

with ApoC-III antibody corresponding to 8317m/z peak

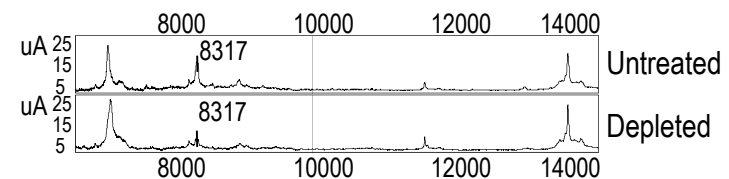


Figure 2

1 **SUPPORTING INFORMATION**

2 **Protein identification of the peaks differentially expressed between the three groups of rats**

3 **Figure S1** presents a detailed representative spectrum of all the 13720, 27340, 42463, 42427-
4 42610 and 54700 *m/z* peaks for one rat from each group and **Figure S2** the mean intensity level in
5 each group. Liquid-phase IEF (**Figure S3**) and gel electrophoresis (**Figure S4**) successfully purified
6 the *m/z* peaks and combination with mass spectrometry (**Figure S5**) identified the *m/z* peak as being
7 transthyretin (13720 and 27340 *m/z*), apolipoprotein A-IV (42463-42427 and 42610 *m/z*) and
8 fibrinogen beta chain (54700 *m/z*). We verified the identification using specific antibodies.
9 Immunodepletion significantly reduced the peaks, thereby confirming the identifications (**Figure S6**).

10 We also checked from a recent publication in which a systematic identification of SELDI peaks
11 was performed by MALDI-TOF {Albrethsen, 2011 #2888} whether some of the peaks selected to be
12 differentially expressed have already been identified. And in that case confirmation of the identity of
13 protein needs to be tested by immunoprecipitation with a specific antibody against the protein.

14 The 9420 *m/z* peak has been identified to be apolipoprotein C-III (ApoC-III) {Albrethsen, 2011
15 #2888}. This peak is up-regulated between RIPC rats and controls but the difference is only
16 statistically different between CTRL and RIPC 10' groups (**Figure S7A-B, Table 2**). We used a
17 specific antibody against ApoC-III to confirm the identity, but immunodepletion of plasma sample did
18 not deplete the peak, excluding ApoC-III to be the corresponding protein (data not shown).
19 By immunodepletion performed with an antibody against haptoglobin, we confirmed the identification
20 of 9420 *m/z* peak to be haptoglobin alpha chain (**Figure S7 C (left panel)**).

21 The 15870-15980 *m/z* peaks have been previously identified by us in another study to be
22 hemoglobin {Pinet, 2008 #717}. These peaks are up-regulated between controls and RIPC 5' rats and
23 down regulated in RIPC 10' rats compared to the other groups but the difference is only statistically
24 different between RIPC 5' and RIPC 10' groups (**Figure S7 A-B, Table 2**). By immunodepletion
25 performed with a specific antibody against hemoglobin, we confirmed the identification of 15870-
26 15980 *m/z* peaks to be hemoglobin beta chain (**Figure S7C, right panel**).

27

28 **SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS**

29 **Figure S1. Profiling of the proteins corresponding to the *m/z* peaks.** Representative SELDI-TOF-
30 MS protein spectra of plasma sample from one Control, one RIPC 5', and one RIPC 10' rat for the
31 13720, 27340, 42463-42427, 42610 and 54700 *m/z* peaks. Results are presented as intensities of
32 SELDI-TOF reading (arbitrary units). The 27340, 42427 and 42610 *m/z* peaks were found to be
33 differentially expressed on the H50 array and the 13720, 42463 and 54700 *m/z* peaks on the CM10
34 array. The statistical significance was calculated by the Mann-Whitney test.

35

36 **Figure S2. Quantification of the proteins corresponding to the *m/z* peaks.** Scattergrams showing
37 the significant differences in intensity of each peaks in plasma samples derived from Control, RIPC 5',
38 and RIPC 10' rats. The continuous line represents the mean, and dots represent each individual rat
39 (n=10 in each group). Detailed *p*-value data for comparison between the three groups is indicated in
40 Table 2.

41

42 **Figure S3. Purification by liquid-phase electrofocusing.** Protein corresponding to the *m/z* peaks
43 indicated were purified using the MicroRotofor® cell. SELDI-TOF-MS protein spectra analysis of
44 fractions from pH gradient 7-9 for 13720, 42463-42427 and 42610 *m/z* peaks, pH gradient 3-10 for
45 27340 *m/z* peak and 5-7 for 54700 *m/z* peak.

46

47 **Figure S4. Purification by gel electrophoresis.** Each fraction obtained by liquid-phase
48 electrofocusing was analyzed on NU-PAGE 10% coomassie blue stained-gel. The band corresponding
49 to the peak of interest was framed.

50

51 **Figure S5. Identification of the proteins corresponding to the *m/z* peaks.** Identification of the *m/z*
52 peaks purified by gel electrophoresis by mass spectrometry. Aminoacids indicated in red corresponds
53 to the peptides identified in the protein sequence.

54

55 **Figure S6. Identification of the proteins corresponding to the m/z peaks.** SELDI-TOF-MS protein
56 spectra of crude (untreated) and immunodepleted plasmas with antibodies (depleted) showed the
57 decrease in the corresponding m/z peak following immunodepletion, validating the identification.

58

59 **Figure S7. Profiling and verification of identified proteins corresponding to the 9420 and 15870-**
60 **15980 m/z peaks. A:** Representative SELDI-TOF-MS protein spectra of plasma sample from one
61 Control, one RIPC 5', and one RIPC 10' rat. Results are presented as intensities of SELDI-TOF
62 reading (arbitrary units). **B:** The 9420 and 15870-15980 m/z peak were respectively found to be
63 differentially expressed on the H50 and CM10 arrays as calculated by the Mann-Whitney test.
64 Scattergram showing the significant differences in intensity of 9420 (left panel), 15870 (middle panel)
65 and 15980 (right panel) m/z peaks in plasma samples derived from Control, RIPC 5', and RIPC 10'
66 rats. The continuous line represents the mean, and dots represent each individual rat (n=10 in each
67 group). Detailed p -value data for comparison between the three groups is indicated in Table 2. **C:**
68 SELDI-TOF-MS protein spectra of crude (untreated) and immunodepleted plasma (10 μ L) with 10 μ g
69 of haptoglobin or 5 μ g of hemoglobin antibody (depleted) showed the decrease in 9420 and 15870-
70 15980 m/z peak following immunodepletion, validating the identifications.

71

Profiling

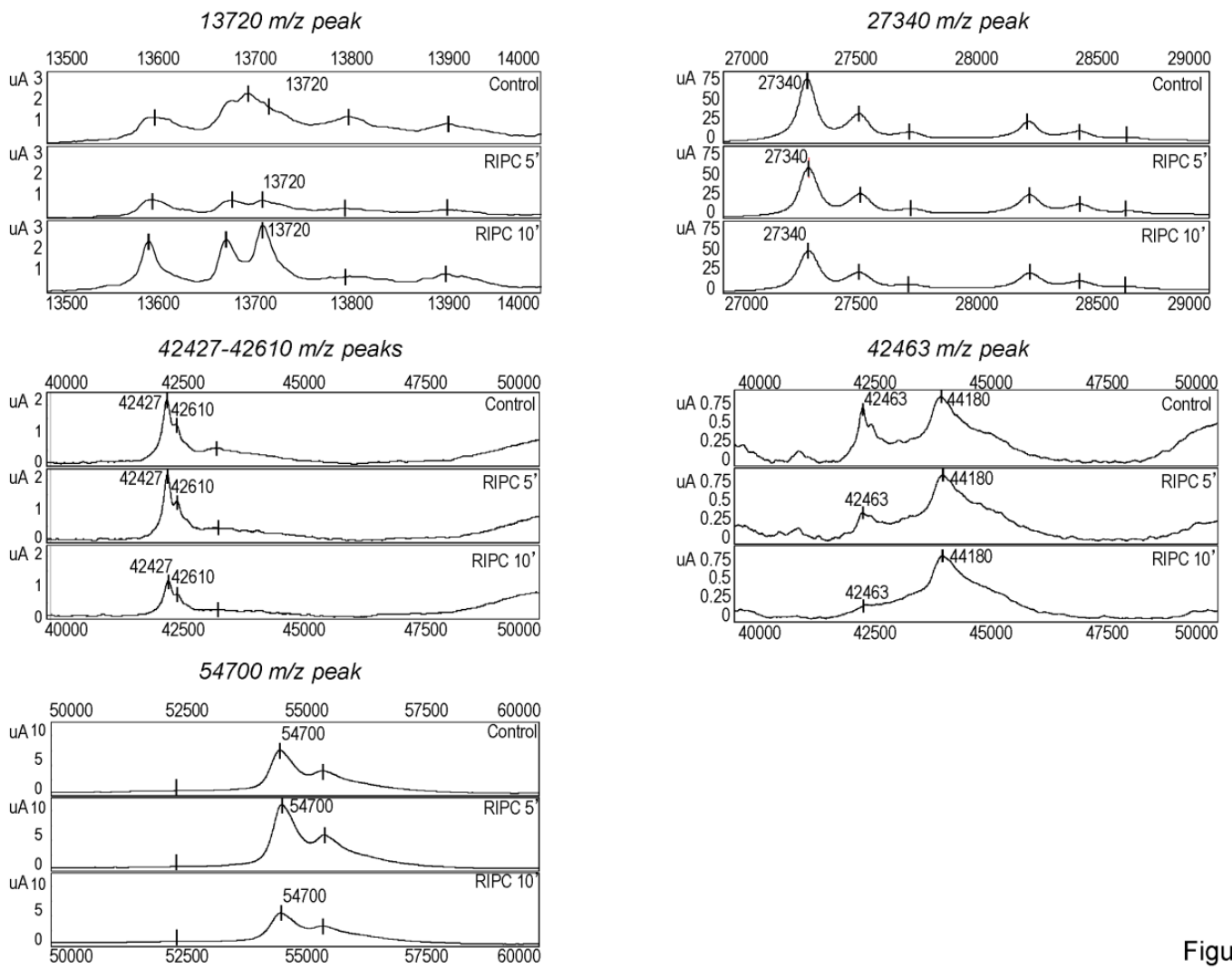


Figure S1

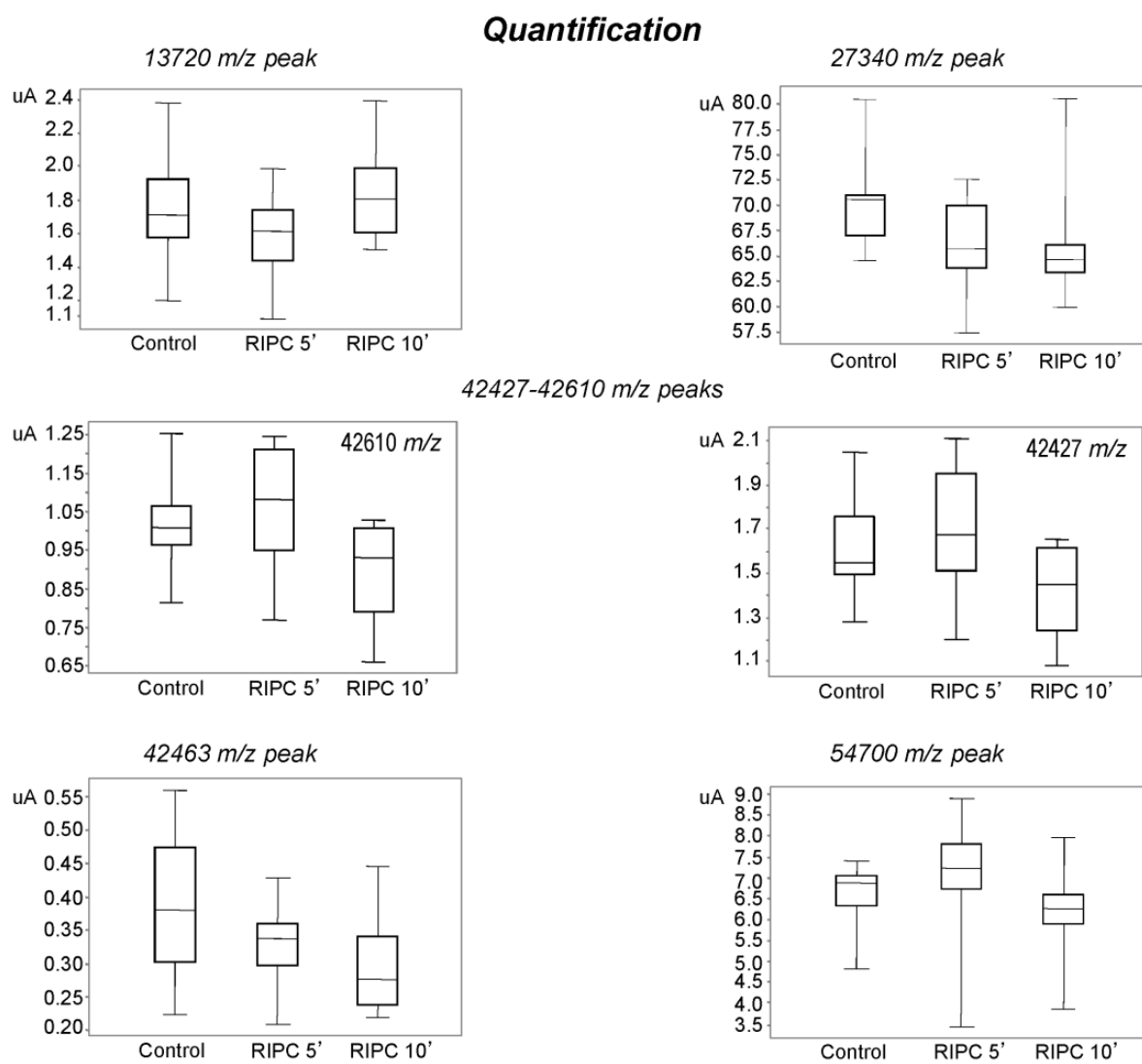


Figure S2

Purification by liquid-phase electrofocusing

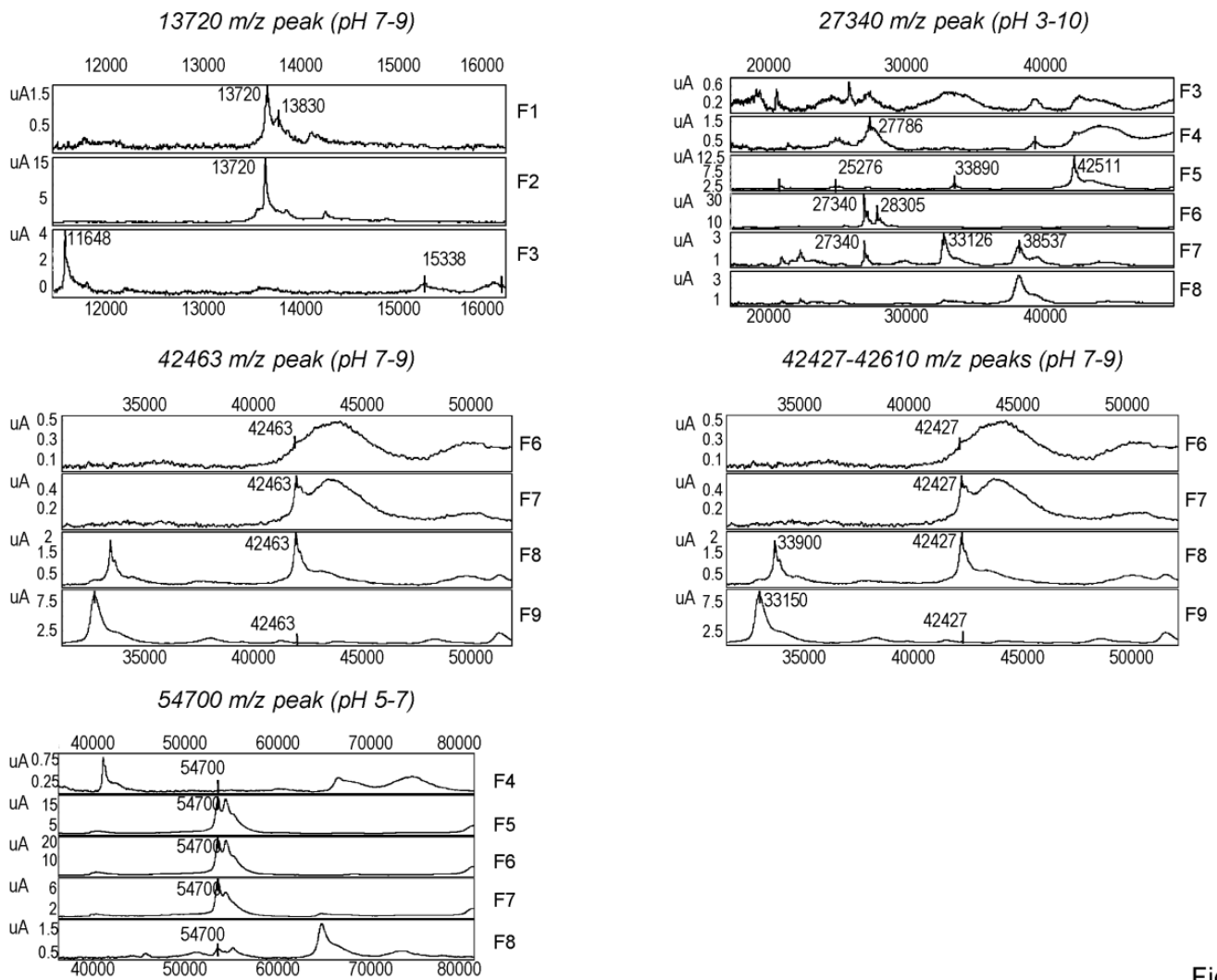


Figure S3

Purification by gel electrophoresis

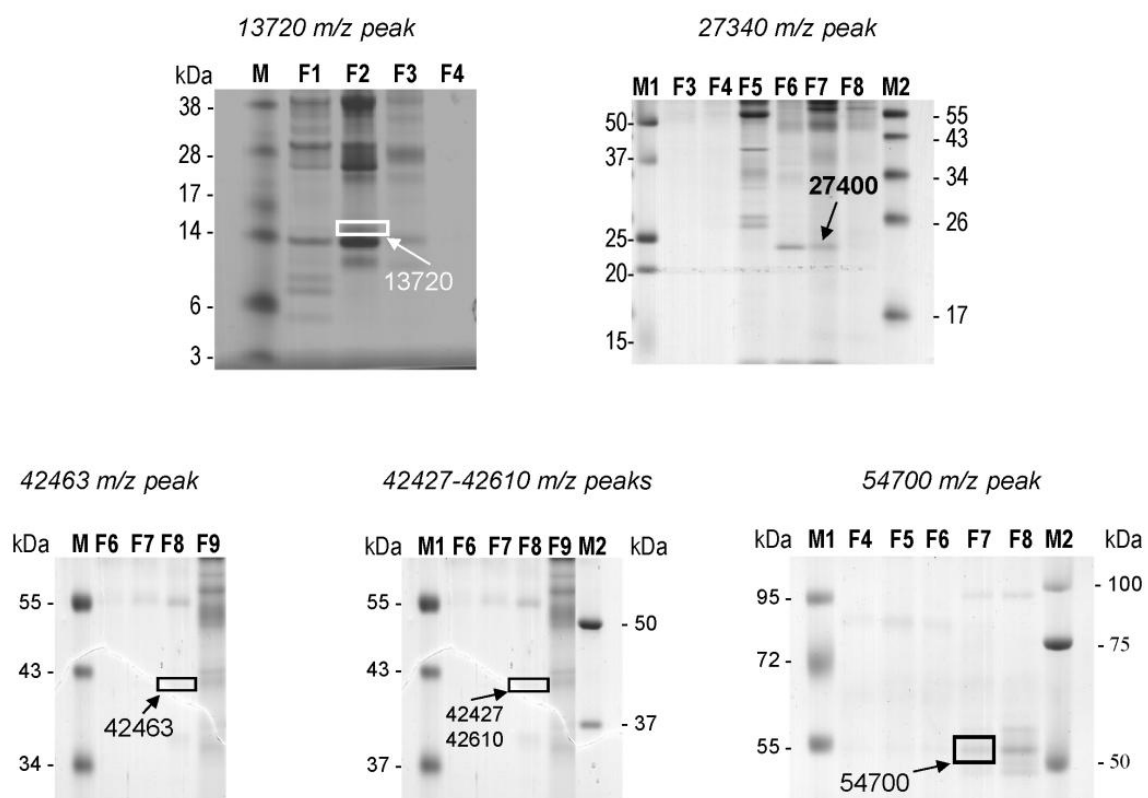


Figure S4

Peptides identified by MS

*In transthyretin sequence
corresponding to 13720 m/z peak*

1 MASLRLFLLC LAGLIFASEA GPGGAGESKC PLMVKVLDAV
41 RGSPAVDVAV KVFKK**TADGS WEPFASGKTA ESGELHGLTT**
81 **DEKFTEGVYR** VELDTKSYWK ALGISPFHEY AEVVFTANDS
121 GHR**HYTIAAL LSPYSYSTTA VVSNPQN**

*In transthyretin sequence
corresponding to 27340 m/z peak*

1 MASLRLFLLC LAGLIFASEA GPGGAGESKC PLMVKVLDAV
41 RGSPAVDVAV KVFKK**TADGS WEPFASGKTA ESGELHGLTT**
81 **DEKFTEGVYR** VELDTKSYWK ALGISPFHEY AEVVFTANDS
121 GHR**HYTIAAL LSPYSYSTTA VVSNPQN**

*In ApoA-IV sequence
corresponding to 42463 m/z peak*

1 MFLKAVVLTV ALVAITGTQA EVTSDQVANV MWDYFTQLSN
41 NAKEAVEQLQ KTDVTQQLNT LFDQKLGNI TYADDLQNKL
81 VFFAVQLSGH LTKETERVRE EIQKELEDLR ANMMPHANKV
121 SQMFGDNVQK LQEHLRPYAT DLQAQINAQT QDMKRQLTPY
161 IQRMQTTIQD NVENLQSSMV PFANELKEKF NQNMEGLKGQ
201 LTPRANELKA TIDQNLLEDL SRLAPLAEGV QEKLNHQMEG
241 LAFQMKKNAE ELQTKVSTNI DQLQKNLAPL VEDVQSKLKG
281 NTEGLQKSLE DLNK**QLDQQV EVFR**RAVEPL GDKFNMALVQ
321 QMEKFRQQLG SDSGDVESH SFLEKNLREK VSSFMSTLQK
361 KGSPDQPLAL PLPEQVQEQV QEQVQPKPLE S

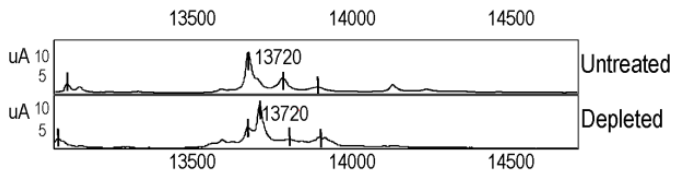
*In Fibrinogen sequence
corresponding to 54700 m/z peak*

1 MRHLWLLLLS VSLVQTQAAT TDSKVDLSI ARGHRPVDRR
41 **KEEPPSLRPA PPIISGGGYR** ARPAKVDAGQ KKVERKPPDA
81 GGCVHGDGDM GVLCPGCEL RQTLNHERP IKNSIAELNS
121 NINSVSETSS VTFQYLTLK DMWKKQAQV **KDNENVINEY**
161 **SSILEDQKLY IDETVNDNIP LNLRVLR SIL EDLR**SKIQKL
201 ESDISAQTEY CHTPCTVNCN IPVVSIGKECE EIIRKGGETS
241 EMYLIQPDTS SKPYRVYCDM KTENGGWTVI QNRQDGSVDF
281 GRKWDPYKKG FGNIATNEDT KKYCGLPGEY WLGNDKISQL
321 TRIGPTELLI EMEDWKGDKV KAHYGGFTVQ TEANKYQVSV
361 NKYKGTAGNA LMEGASQLVG ENRTMTIHNG MFFSTYDRDN
401 DGWVTDPK QCSK**EDGGW WYNR**CHAANP NGRYYGGGLY
441 SWDMSKHGTD DGVVMMNWKG SWYSMRMSM **KIRPVFPQQ**

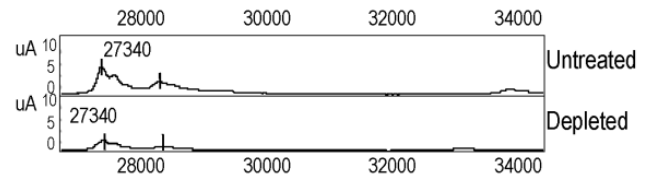
Figure S5

Immunoprecipitation

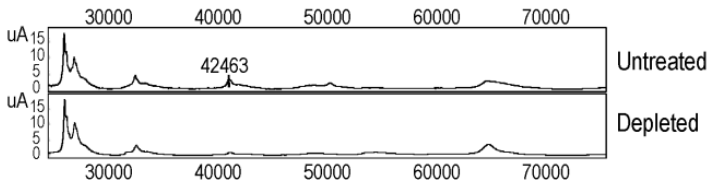
With transthyretin antibody
corresponding to 13720 m/z peak



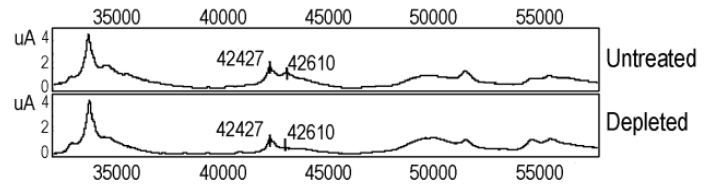
With transthyretin antibody
corresponding to 27340 m/z peak



With ApoA-IV antibody
corresponding to 42463 m/z peak



With ApoA-IV antibody
corresponding to 42427-42610 m/z peaks



With Fibrinogen antibody
corresponding to 54700 m/z peak

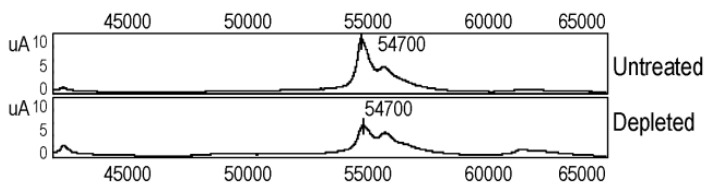


Figure S6

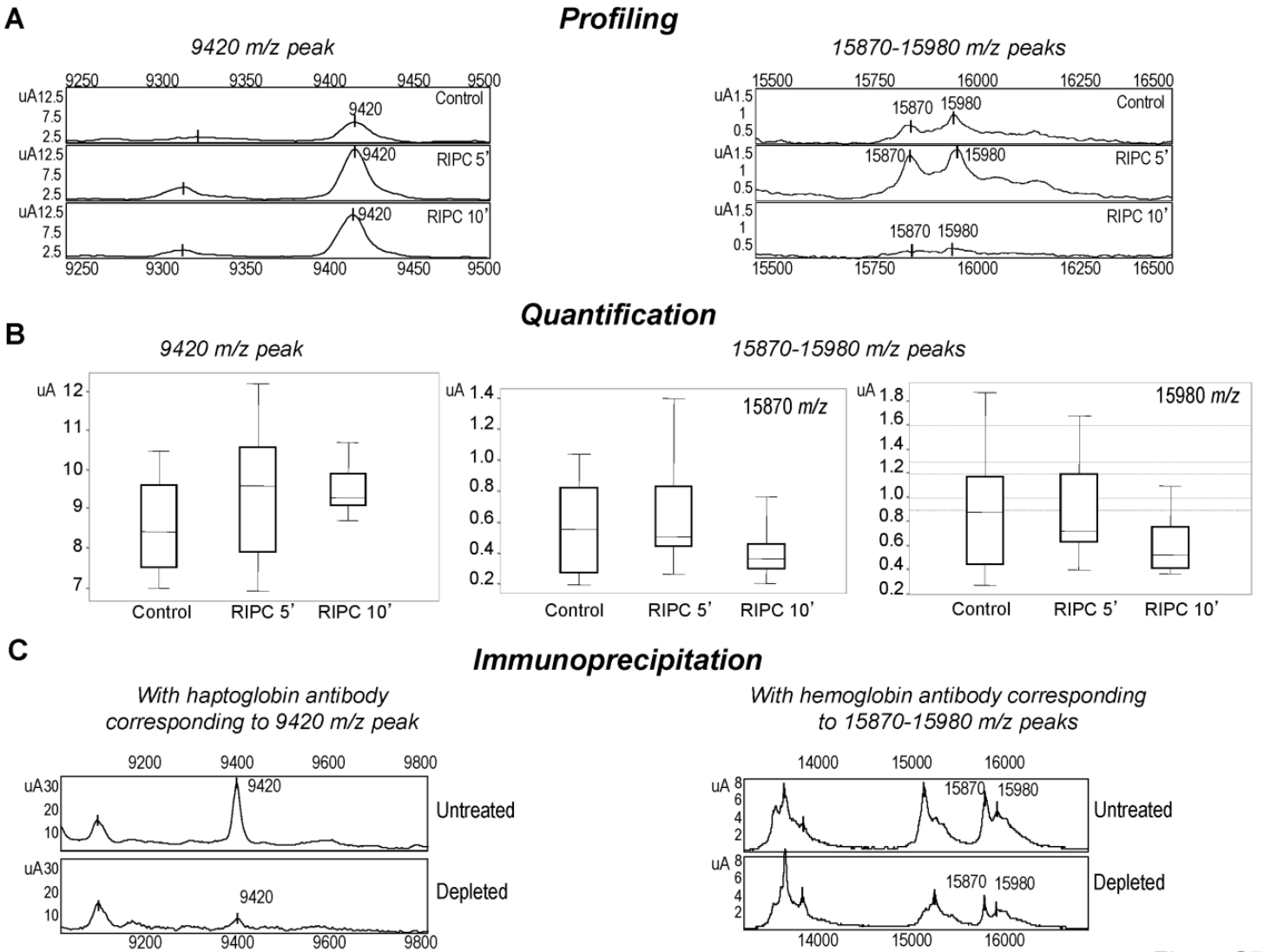


Figure S7

Discussion n°2

L'exploration du plasma en réponse au RIC a fait l'objet de nombreuses études depuis la démonstration de l'implication d'une voie humorale par les études de Dickson *et al.* [140,143].

Les recherches se sont d'abord intéressées à définir la nature physicochimique et la taille du ou des facteurs circulants pouvant médier cette cardioprotection à distance. Plusieurs articles ont donc utilisé des techniques de dialyse et de filtration par chromatographie, permettant de fractionner le plasma d'animaux traités, et ainsi d'identifier la fraction toujours capable d'induire une cardioprotection [94,146].

Bien que parfois différents, les résultats de ces études s'accordent cependant pour dire que le ou les facteurs circulants du RIC sont des protéines de nature hydrophobe. La taille de ces molécules fait encore débat et le cadre de 3.5-30 kDa qui est actuellement fixé est sûrement trop étroit pour contenir la multitude de facteurs circulants pouvant potentiellement jouer un rôle dans le RIC.

L'avènement de techniques d'analyse plus puissantes, et en particulier des techniques protéomiques, a permis d'aborder différemment l'exploration de la cardioprotection à distance et de ses mécanismes. Un premier essai d'analyse protéomique plasmatique a donc été réalisé en 2006 mais n'avait pas permis d'identifier des candidats au rôle de facteurs circulants du RIPreC [144]. Grâce aux progrès de ces techniques depuis plusieurs années, l'analyse du protéome plasmatique est aujourd'hui possible et efficace.

Notre étude a donc cherché, au travers de l'analyse SELDI-TOF-MS, à identifier un ou des facteurs circulants modulés en réponse au RIPreC.

L'analyse protéomique que nous avons utilisée nous a permis d'étudier le protéome plasmatique sans aprioris, c'est-à-dire sans tenir compte des données de la littérature limitant les facteurs circulants à des molécules hydrophobes de taille <30 kDa.

Pour cela nous avons traité l'ensemble des plasmas sur deux types de puces protéiques : une puce CM10 permettant d'étudier les protéines hydrophiles, et une puce H50 destinée aux protéines hydrophobes. De la même façon, nous avons

analysé les plasmas à deux intensités laser différentes. Une première, plus faible, permettant de détecter les petites protéines comprises entre 3000 Da et 30 kDa, et une deuxième plus élevée, destinée aux protéines de 20 kDa à 150 kDa.

Les protéines minoritaires du plasma étant de bons candidats pour être des facteurs circulants du RIC, nous avons également utilisé une méthode à notre disposition, qui s'appelle l'égalisation, et qui permet d'étudier plus facilement ces protéines minoritaires [433].

L'ensemble de ces techniques nous a permis de mettre en évidence de nombreux changements dans le protéome plasmatique, puisque 296 pics protéiques étaient significativement modulés en réponse au RIPreC. Il est intéressant de noter que la détection de ces 296 pics était assez équitablement répartie entre les différentes méthodes d'analyse puisque 100 pics ont été identifiés sur des plasmas natifs, 115 sur des plasmas égalisés, et 81 par les deux méthodes. Cela démontre la complémentarité de ces deux modes d'analyse dans l'exploration du protéome.

Au-delà de ces 296 pics, leur identification nous a ensuite permis d'identifier 8 protéines. Parmi elles, l'ApoA-I a été celle que nous avons étudiée *in vivo*, compte tenu de l'abondante littérature sur ses effets protecteurs.

Les autres protéines se sont elles aussi avérées intéressantes dans l'idée d'un rôle dans la cardioprotection, et donc dans leur capacité à être des facteurs circulants potentiels du RIPreC. La présentation des étapes d'identification de ces autres protéines a fait l'objet de cette deuxième publication.

A l'heure actuelle nous n'avons pas investigué leurs effets *in vivo* dans le cadre de l'IDM. L'étude de la bibliographie les concernant laisse cependant supposer qu'elles pourraient, comme l'ApoA-I, avoir des effets protecteurs.

En effet, ces protéines sont décrites comme impliquées dans de nombreux processus protecteurs, comme l'anti-inflammation, l'hémostase ou encore le transport des lipides. Certaines sont même des partenaires moléculaires de l'ApoA-I, ou jouent un rôle dans son homéostasie.

Parmi ces molécules on peut citer l'haptoglobine, augmentée suite au RIPreC, qui est capable de se lier à l'ApoA-I et de la protéger de l'oxydation induite par les ROS [437].

Il y a également la transthyréline, coprécipitée avec l'ApoA-I à partir d'HDL, qui possède des propriétés anti-inflammatoires [438,439].

Une autre protéine intéressante que nous avons identifiée est le fibrinogène- β (Fg β). Ce composé, lorsqu'il est dégradé, libère un peptide nommé B β ₁₅₋₄₂, qui possède de très puissantes propriétés cardioprotectrices et anti-inflammatoires [440,441]. La diminution du Fg β que nous observons suite au RIPreC pourrait donc être le reflet d'une dégradation en B β ₁₅₋₄₂, et pourrait ainsi contribuer à une partie de l'effet du RIPreC.

Un constat intéressant à faire à propos de notre étude est que la quasi-totalité des 8 protéines que nous avons identifiées comme modulées en réponse au RIPreC le sont également dans l'étude d'Hepponstall *et al.* chez le volontaire sain [147]. C'est donc la démonstration à la fois de la fiabilité de notre technique protéomique, mais également de la pertinence des protéines mises en évidence comme étant des facteurs circulants potentiels du RIPreC. De plus, pour la plupart, la taille des protéines est <30 kDa, ce qui correspond bien au consensus sur la taille des médiateurs du RIPreC.

Cette étude protéomique a donc été une réussite tout d'abord en terme de méthodologie, quand à la capacité de la technique de SELDI-TOF-MS à identifier des variations significatives de l'expression plasmatique de certaines protéines. C'est également une réussite en termes d'intérêt des protéines identifiées, puisqu'elles semblent posséder des propriétés intéressantes en rapport avec la cardioprotection.

Une prochaine étape de ce travail serait donc, comme pour l'ApoA-I, d'évaluer *in vivo* la capacité cardioprotectrice de ces molécules.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La prise en charge de l'IDM est aujourd'hui centrée sur la nécessité de reperfusion le plus précocement possible l'artère coronaire occluse. Grâce aux progrès des techniques de reperfusion myocardique à la phase aiguë, le pronostic des patients s'est donc considérablement amélioré. Il reste cependant des zones d'ombre dans la prise en charge de cette pathologie, et celle des lésions de reperfusion, engendrées par la revascularisation, qui viennent altérer les bénéfices de la restauration du flux.

En parallèle des progrès interventionnels, la découverte des propriétés protectrices de techniques de conditionnement a ouvert de nouvelles perspectives quant au traitement de l'IDM et à la prise en charge des patients. Elles permettent en effet de réduire les lésions de reperfusion et ainsi de diminuer la taille finale de l'infarctus.

Les travaux du laboratoire portent donc sur l'étude de la cardioprotection offerte par ces méthodes de conditionnement, et notamment sur l'identification des mécanismes moléculaires et cellulaires qui y sont liés. Par le passé, nous avons démontré l'efficacité du conditionnement local et pharmacologique [47,442], et nous étudions aujourd'hui les capacités protectrices du conditionnement à distance.

La découverte de ce phénomène de conditionnement à distance par Przyklenk *et al.* a conduit à de multiples hypothèses quant à l'origine de cette protection [69]. Il n'y a pour l'instant pas de description mécanistique complète de son mode d'action mais certaines parties de sa signalisation sont aujourd'hui bien décrites. De nombreuses études précliniques ont notamment décrit les voies de signalisation mises en jeu, ainsi que les effecteurs terminaux de la protection cellulaire [185,191,204].

Une part d'incertitude réside encore dans la transmission du signal protecteur de l'organe à distance jusqu'à l'organe cible. Plusieurs hypothèses existent et chacune d'entre elles s'appuie maintenant sur une littérature riche. Il est donc probable que les diverses possibilités suggérées ne soient pas nécessairement exclusives les unes des autres, et que l'action protectrice du RIC soit la résultante d'un phénomène multifactoriel.

Une autre donnée importante à prendre en compte, dans cette analyse des mécanismes de transduction du signal, est la notion de protection multiorganes offerte par le RIC. En effet, on sait que divers organes, autres que le cœur, peuvent bénéficier de la protection induite par le conditionnement à distance. De la même manière, de nombreux organes périphériques ont été décrits comme pouvant être le siège des ischémies transitoires salvatrices [443].

Il est donc nécessaire d'appréhender le RIC non pas comme un phénomène cardiodépendant, mais probablement plus comme un mécanisme protecteur non spécifique. Les médiateurs et les cibles impliqués doivent donc être bien évidemment cardiaques mais également ubiquitaires, à la fois capables d'agir au niveau des cardiomyocytes, mais également au niveau de nombreux types cellulaires.

Dans l'optique de la mise en circulation de molécules protectrices globales, la description d'une voie humorale par Dickson *et al.* a été une hypothèse séduisante pour expliquer cet effet multiorganes du RIC [140,141,143].

Depuis cette étude, de nombreuses autres ont décrit la mise en circulation de facteurs protecteurs suite aux I/R transitoires, et plusieurs organes périphériques ont montré de telles capacités de libération de facteurs humoraux [145]. L'objectif de nombreux groupes travaillant sur la cardioprotection à distance a alors été de connaître l'identité de ces facteurs humoraux. Pour cela divers inhibiteurs ont été testés, afin de bloquer la protection offerte par le RIC [84,148,156]. Certaines familles de molécules ont donc été décrites comme impliquées dans sa signalisation mais sans avoir nécessairement été démontrées comme augmentées dans la circulation sanguine.

Dans notre étude, nous avons donc cherché à mettre en évidence un ou des facteurs humoraux, mis en circulation par le RIPreC, et pouvant être impliqués dans la cardioprotection. Pour cela nous avons utilisé une technique protéomique inédite dans le domaine de la cardioprotection à distance, le SELDI-TOF-MS. Il s'agit d'une méthode qui permet entre autre d'analyser le protéome plasmatique, et en particulier les variations d'expression des protéines entre deux conditions. Cette technique était donc totalement adaptée pour atteindre notre objectif.

La 1^{ère} partie du projet a consisté à analyser le plasma de rats soumis à des RIPreC, pour les comparer à des plasmas d'animaux contrôles. Cette analyse sur plasma total a été associée à l'exploration du « *deep-proteome* », c'est-à-dire des protéines minoritaires du plasma. De nombreuses modulations du protéome ont ainsi été mises en évidence suite au RIPreC, et à partir de ces pics protéiques, 8 protéines ont pu être identifiées.

Parmi ces protéines, certaines présentaient une littérature intéressante en termes de cardioprotection. Il y avait notamment l'ApoA-I, connue pour ses capacités protectrices directes, mais également des protéines comme l'haptoglobine ou la transthyréline, qui jouent un rôle dans la régulation de son homéostasie. Ces protéines peuvent également agir indépendamment de l'ApoA-I, et avoir des propriétés anti-inflammatoires et de réparation tissulaire.

La deuxième partie du travail a consisté à l'exploitation de la protéine ApoA-I, identifiée comme augmentée suite au RIPreC. La bibliographie de cette protéine étant très riche quant à ses capacités protectrices [310,377,380,391], nous avons exploré son aptitude à induire une cardioprotection *in vivo*, et donc à être un potentiel facteur circulant du RIPreC.

Son administration à des rats en phase aiguë d'infarctus a donc permis de réduire de façon significative la taille de l'infarctus. Cette protection offerte, équivalente au RIPreC, était visualisée également à l'échelle cellulaire par une diminution de l'infiltration leucocytaire CD45⁺. Nous avons aussi pu montrer que la libération humorale d'ApoA-I, suite au RIPreC, était conservée en appliquant un deuxième algorithme de conditionnement à distance.

L'identification de cette protéine correspond bien à l'idée d'un facteur circulant possédant de fortes capacités protectrices générales. Elle peut en effet réduire l'inflammation systémique à des nombreux niveaux, et notamment en inhibant l'activation des lymphocytes T, des macrophages, des cellules endothéliales [378,389,394,395]. Elle est donc un bon facteur potentiel du RIPreC, pouvant expliquer les propriétés de protection multiorganes de cette technique.

Notre étude vient s'ajouter à deux récentes publications décrivant des facteurs potentiels du RIPreC. Cai *et al.* ont notamment mis en évidence que la protection tardive offerte par le RIPreC était associée à une augmentation de l'expression d'IL-10 dans le muscle à distance après 24 h, puis à une augmentation de la libération d'IL-10 plasmatique. Cette libération induisait ensuite une réduction de la taille de l'infarctus, liée à l'activation des voies de survie cellulaire [444]. Dans leur étude, Davidson *et al.* ont décrit un autre facteur humoral impliqué dans la transduction du signal protecteur du RIPreC [445]. Il s'agit de la voie du *stromal cell-derived factor-1 α* (SDF-1 α), et de son récepteur le *CXC chemokine receptor type 4* (CXCR4). Suite au RIPreC, la concentration de SDF-1 α était significativement augmentée dans le plasma des animaux, et cette augmentation était corrélée avec une réduction de la taille de l'infarctus. Cette protection était en revanche perdue en présence d'un inhibiteur de CXCR4.

Notre étude ainsi que ces travaux récents viennent donc apporter des précisions quant aux mécanismes par lesquels le RIPreC pourrait être médié au travers de la circulation sanguine. Ils décrivent des facteurs humoraux mis en circulation après le conditionnement ischémique, et capables de mimer la cardioprotection. Bien que les voies décrites semblent assez différentes, elles correspondent à l'hypothèse d'une libération de diverses molécules cardioprotectrices.

Au-delà de la libération de protéines, il existe d'autres hypothèses concernant la transmission humorale du signal protecteur du RIPreC. On sait notamment que les microparticules circulantes peuvent transporter, en leur sein ou à leur surface, bon nombre de molécules, et notamment des molécules de signalisation. Notre équipe s'est donc intéressée à explorer la possible médiation du RIC par les microparticules circulantes. Des rats ont donc été traités par un conditionnement à distance, et leurs microparticules plasmatiques ont été isolées. Malheureusement, alors que le taux de microparticules circulantes était bien augmenté suite au conditionnement, celles-ci n'ont pas été capables de reproduire une cardioprotection lorsqu'elles étaient injectées à des rats naïfs, au moment de la reperfusion myocardique (**Annexe**) [446]. Nous en avons donc conclu que les microparticules ne sont pas capables de médier la cardioprotection à distance.

Les microARN (miRNA) sont également connus pour être des molécules présentes dans le sang, et pouvant induire de multiples réponses cellulaires. Plusieurs miRNA possèdent d'ailleurs des capacités de protection cellulaire, notamment dans le cadre de l'I/R. On peut par exemple citer les miRNA-144 et 451, impliqués dans l'IPreC [447] ou encore le miRNA-214 qui protège les cardiomyocytes des lésions ischémiques liées à la surcharge calcique [448]. L'étude de Xu *et al.* a également démontré une modification du profil en miRNA dans le foie suite à l'IPreC [449]. Au laboratoire nous étudions donc le rôle que peuvent jouer les miRNA dans la protection induite par le RPreC. Ils pourraient, au même titre que l'ApoA-I, être libérés dans le sang suite au conditionnement, et agir dans les cardiomyocytes pour favoriser la survie suite aux lésions de reperfusion.

Bien que l'hypothèse d'une voie humorale soit donc aujourd'hui clairement décrite, une autre possibilité envisagée, pour expliquer la transmission du signal du RIC, est l'implication d'une voie neuronale. Fondée sur de nombreuses études démontrant une perte de l'effet protecteur par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des ganglions et par la section de nerfs périphériques, cette piste est intéressante à prendre en compte [78,80,124,138]. En effet, cette médiation neuronale du RIC n'est pas si éloignée de l'hypothèse humorale, et certaines études relient même les deux.

C'est le cas notamment de l'étude de Redington *et al.* qui a exploré trois stimulations, à savoir le RCT, le RPreC par ischémie de patte et le RPreC par stimulation électrique du nerf fémoral [135]. Ces trois stimulations étaient capables de réduire la taille de l'infarctus et d'améliorer les performances cardiaques, par transfert du plasma de l'animal conditionné à un animal naïf. Il s'agissait donc bien d'une démonstration de l'implication d'une voie humorale couplée à une voie neuronale. De plus, et de manière surprenante, le RCT et le RPreC par stimulation électrique étaient perdus lors de l'utilisation d'un bloqueur des nerfs sensitifs et d'un donneur de NO. Cela confirme donc bien l'hypothèse selon laquelle le conditionnement traumatique et le conditionnement direct des nerfs sont capables d'induire une cardioprotection à distance par deux intermédiaires : premièrement une transmission nerveuse de l'information à distance, induisant secondairement la libération de molécules protectrices dans la circulation sanguine.

D'une façon similaire à l'étude de Michelsen *et al.* [151], utilisant du sang de patients pour protéger des cœurs de lapins, Vibjerg Jensen *et al.* ont également exploré le lien entre la transmission nerveuse et la transmission humorale du RIPreC [450]. Ils ont pour cela réalisé des RIPreC chez des patients, non plus par un exercice physique mais par 4 cycles de 5 min d'ischémie-5 min de reperfusion au niveau d'un bras. Ces patients n'étaient pas tous des volontaires sains puisque seize d'entre eux étaient diabétiques : huit ne présentaient pas de neuropathies périphériques, et huit en présentaient. Ils ont ensuite utilisé le sang de ces patients pour essayer de protéger des cœurs isolés de lapins. Ils ont ainsi pu montrer que le sang provenant des patients diabétiques présentant des neuropathies n'était pas capable d'induire la cardioprotection, au contraire de celui des patients sans neuropathies. Il s'agissait donc d'une nouvelle démonstration que la libération de facteurs humoraux par le RIPreC est probablement modulée par une voie nerveuse.

Dans notre modèle de cardioprotection par le RIPreC, l'origine et le mode de libération de l'ApoA-I restent encore un mystère. Compte tenu du temps très court (10 min) entre le début de la reperfusion de la patte suite au RIPreC et le moment du prélèvement de sang ayant permis de mettre en évidence l'augmentation du taux d'ApoA-I, l'hypothèse la plus probable est celle d'une libération d'ApoA-I préexistante, et non d'une synthèse *de novo*. Les deux organes principaux fournissant l'ApoA-I étant le foie et l'intestin, il est possible d'envisager une transmission du signal protecteur du RIPreC à l'un ou les deux organes, induisant la mise en circulation d'ApoA-I. Cette voie n'est aujourd'hui qu'hypothétique mais il est intéressant de faire le lien entre notre modèle et les deux études citées précédemment. Pourrait-il y avoir l'implication d'une voie neuronale afférente périphérique de la patte vers le foie et/ou l'intestin, induisant un mécanisme de relargage de l'ApoA-I dans le sang ? Ou bien s'agit-il d'un facteur humoral libéré par la patte, véhiculé vers le foie et/ou l'intestin pour mettre en circulation l'ApoA-I ? Ces hypothèses méritent d'être étudiées afin de mieux appréhender la cardioprotection induite par l'ApoA-I et plus généralement pour mieux comprendre d'éventuels liens entre la voie humorale et la voie neuronale. La compréhension du mode d'action du RIPreC pourrait ainsi faciliter son application chez l'homme.

Jusqu'à présent, une vingtaine d'essais cliniques ont été menés pour évaluer l'effet du RIC dans diverses applications thérapeutiques, et les résultats sont

partagés. Seulement une étude sur deux a conclu à un bénéfice du RIC, et ces études positives avaient pour critère principal la diminution de la libération des biomarqueurs et la réduction des lésions tissulaires. Il n'y a donc pour le moment pas de recommandations à l'utilisation de cette procédure en routine clinique [110-112] [107].

L'étude de Thielmann *et al.*, parue récemment, vient pourtant relancer le débat sur l'intérêt clinique de cette procédure [118]. Pour la première fois, un essai clinique présente un bénéfice du RIPreC sur la morbi-mortalité. Il est possible que la positivité de cette étude soit liée à son effectif bien supérieur à ceux des études précédentes.

L'avenir du RIC dans la routine clinique passe donc probablement par la réalisation de nouveaux essais cliniques plus robustes afin de démontrer un réel effet protecteur du conditionnement à distance. Pour cela il faudra sûrement constituer des effectifs plus grands et avoir des critères principaux d'étude axés sur la survenue d'évènements cardiovasculaires ainsi que sur la survie des patients. Le recrutement de patients à haut risque, donc plus à même de présenter un bénéfice, devrait également permettre de mieux évaluer l'effet du RIC. L'utilisation de molécules protectrices, comme l'ApoA-I ou le SDF-1 α , en complément pharmacologique au conditionnement à distance, pourrait aussi être envisagée afin de potentialiser un éventuel effet bénéfique chez les patients.

Le traitement des lésions d'ischémie-reperfusion reste encore à ce jour un défi pour les groupes travaillant sur la cardioprotection. Malgré de solides connaissances sur la signalisation et sur les phénomènes physiologiques impliqués dans son fonctionnement, le RIC n'a pour le moment pas pu être extrapolé efficacement en clinique. Cette cardioprotection à distance reste cependant une thématique d'avenir notamment avec la découverte de potentiels facteurs circulants pouvant médier son effet cardioprotecteur. Au niveau de la recherche fondamentale, il est encore nécessaire d'approfondir la compréhension de leur libération, notamment en explorant le lien pouvant unir la voie humorale et la voie systémique. L'utilisation chez l'homme de ces facteurs humoraux, en association au RIC, pourrait permettre de lutter efficacement contre la morbi-mortalité liée aux lésions d'ischémie-reperfusion.

ANNEXE

Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism

Julien Jeanneteau, Pierre Hibert, Maria Carmen Martinez, Simon Tual-Chalot, Sophie Tamareille, Alain Furber, Ramaroson Andriantsitohaina and Fabrice Prunier

Am J Physiol Heart Circ Physiol 303:H871-H877, 2012. First published 10 August 2012;
doi: 10.1152/ajpheart.00102.2012

You might find this additional info useful...

This article cites 32 articles, 16 of which you can access for free at:
<http://ajpheart.physiology.org/content/303/7/H871.full#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:
<http://ajpheart.physiology.org/content/303/7/H871.full>

Additional material and information about *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* can be found at:
<http://www.the-aps.org/publications/ajpheart>

This information is current as of July 4, 2013.

American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology publishes original investigations on the physiology of the heart, blood vessels, and lymphatics, including experimental and theoretical studies of cardiovascular function at all levels of organization ranging from the intact animal to the cellular, subcellular, and molecular levels. It is published 24 times a year (twice monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2012 the American Physiological Society. ISSN: 1522-1539. Visit our website at <http://www.the-aps.org/>.

Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism

Julien Jeanneteau,^{1,2} Pierre Hibert,¹ Maria Carmen Martinez,³ Simon Tual-Chalot,³ Sophie Tamarelle,¹ Alain Furber,^{1,2} Ramaroson Andriantsitohaina,³ and Fabrice Prunier^{1,2}

¹Université d'Angers, laboratoire Cardioprotection, Remodelage et Thrombose, Angers, France; ²Centre Hospitalier Universitaire Angers, Service de Cardiologie, Angers, France; ³Université d'Angers, laboratoire Stress oxydant et pathologies métaboliques, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Angers, France

Submitted 7 February 2012; accepted in final form 16 July 2012

Jeanneteau J, Hibert P, Martinez MC, Tual-Chalot S, Tamarelle S, Furber A, Andriantsitohaina R, Prunier F. Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303: H871–H877, 2012. First published August 10, 2012; doi:10.1152/ajpheart.00102.2012.—Remote ischemic conditioning (RCond) induced by short periods of ischemia and reperfusion of an organ or tissue before myocardial reperfusion is an attractive strategy of cardioprotection in the context of acute myocardial infarction. Nonetheless, its mechanism remains unknown. A humoral factor appears to be involved, although its identity is currently unknown. We hypothesized that the circulating microparticles (MPs) are the link between the remote tissue and the heart. MPs from rats and healthy humans undergoing RCond were characterized. In rats, RCond was induced by 10 min of limb ischemia. In humans, RCond was induced by three cycles of 5-min inflation and 5-min deflation of a blood-pressure cuff. In the second part of the study, rats underwent 40 min myocardial ischemia followed by 2 h reperfusion. Infarct size was measured and compared among three groups of rats: 1) myocardial infarction alone (MI) ($n = 6$); 2) MI + RCond started 20 min after coronary ligation ($n = 6$); and 3) MI + injection of RCond-derived rat MPs (MI + MPs) ($n = 5$). MPs from endothelial cells (CD54⁺ and CD146⁺ for rats and humans, respectively) and procoagulant MPs (Annexin V⁺) markedly increased after RCond, both in rats and humans. RCond reduced infarct size ($24.4 \pm 5.9\%$ in MI + RCond vs. $54.6 \pm 4.7\%$ in MI alone; $P < 0.01$). Infarct size did not decrease in MI + MPs compared with MI alone ($50.2 \pm 6.4\%$ vs. $54.6 \pm 4.7\%$, not significantly different). RCond increased endothelium-derived and procoagulant MPs in both rats and humans. However, MP release did not appear to be a biological vector of RCond in our model.

myocardial infarction; reperfusion injury; cardioprotection

MYOCARDIAL INFARCTION (MI) is a major cause of mortality worldwide (22). Although highly beneficial, myocardial reperfusion is paradoxically associated with cellular injuries including cardiomyocyte death (25). Therefore, new treatment strategies are required to protect the heart during myocardial reperfusion. Remote ischemic postconditioning (RCond), defined as brief intermittent episodes of ischemia and reperfusion in an organ or tissue remote to the heart, offers a novel approach to myocardial protection (10). First described by Kerendi et al. in 2005 (13), RCond is clinically applicable and has been successful in reducing infarct size in the human heart (5). However, the signaling pathways linking the remote organ or tissue to the heart remain unclear (11). A humoral factor appears to be involved (15), although its identity is currently unknown.

Address for reprint requests and other correspondence: F. Prunier, EA 3860, Faculté de Médecine, Rue Haute de Reculée, FR-49045 Angers Cedex 1, France (e-mail address: FaPrunier@chu-angers.fr).

Microparticles (MPs) are small membrane vesicles that are released from cells in response to activation or apoptosis. MPs are present in the blood of healthy individuals. The number and cellular source of MPs are altered in various pathological states, including cardiovascular diseases (20). Endothelial microparticles (EMPs), reflecting endothelial injury, increase in patients with acute coronary syndrome and MI (4). MPs may play a role by interacting with circulating cells or components of the vessel wall. Indeed, MPs can be considered vectors of biological messages, such as induction of endothelial and vascular dysfunctions (7, 20). MPs may also have beneficial biological effects, promoting nitric oxide production (3) or vasculogenesis (18).

In this investigation, we sought to evaluate the role of circulating MPs in the messages relayed to the heart during RCond. Our aim was to characterize circulating MPs after RCond according to their cellular origins and procoagulant properties and to determine whether these MPs could be a biological vector of RCond.

MATERIALS AND METHODS

Study 1: MP isolation and characterization of MP phenotype after RCond in rats. Male Wistar rats weighing 260 ± 7 g were assigned to two groups of 10 rats: 1) control (anesthesia and blood sampling only) and 2) RCond (blood sampling 10 min after the end of limb ischemia). All animals were treated in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996), and the study was approved the Animal Care and Use Committee. Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60 mg/kg) and orotracheally intubated with a 16-gauge tube. The animals were ventilated using a small animal ventilator at a rate of 50–60 breaths per minute (Series Small animal Ventilator, SAR-830/P; CWE, Ardmore, PA). Body core temperature was monitored during the surgical procedure with a rectal thermometer and maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ by using a homeothermic blanket linked to a temperature control unit (HB101/2 RS; Bioseb, France). RCond was performed by thin elastic placed around the upper third of the hind extremity in tight position, as previously described (23). Limb ischemia was performed for 10 min followed by 10 min of reperfusion. The underskin temperature was measured in an interdigital space of the leg using an electrothermometer. Limb ischemia was confirmed by the pale color of the limb and the decrease in temperature ($>3^\circ\text{C}$ in all).

Subtotal blood (8 ml) from rats was collected in sodium citrate tubes after inferior vena cava puncture. Blood samples were centrifuged for 20 min at 240 g, and plasma was then isolated and centrifuged for 20 min at 1,500 g to obtain platelet-free plasma (PFP). As previously described (12), three hundred microliters of PFP was frozen and stored at -80°C for quantitative and qualitative analyses. Remaining PFP was subjected to a centrifugation at 21,000 g for 45 min to pellet MPs for experiments. Supernatant was replaced by 100 μl 0.9% sodium chloride, and pellets were mixed together in a 2-ml

tube. A further centrifugation at 21,000 g for 45 min was performed, and the pellet was resuspended in 300 μ l of 0.9% sodium chloride and kept at 4°C. At this stage MPs were sufficiently washed to ensure that there were not contaminated by circulating plasma products. As previously described (2), membrane MP subpopulations were discriminated in both PFP and pellet MPs according to the expression of membrane-specific antigens. Numeration of platelet, leukocyte, endothelial, and erythrocyte MPs was performed using anti-CD61, anti-CD45, anti-CD54 (BioLegend, San Diego, CA), and anti-erythrocyte cell (BD Biosciences, San Jose, CA) labeling, respectively. Annexin V binding was used to count phosphatidylserine-expressing circulating MPs (3 μ l of Annexin V/5 μ l PFP; Beckman Coulter, Villepinte, France). An equal volume of sample and Flowcount beads were then added, and samples were analyzed in a flow cytometer 500 MPL System (Beckman Coulter). The size of MPs was determined with a Zetasizer ZS (Malvern, Worcestershire, UK). Particle sizing was based on photon correlation spectroscopy, and the results were expressed in nanometers. MP size was 740 ± 58 nm (627–821 nm).

Study 2: MP isolation and characterization of MP phenotype after RCond in humans. Eight healthy donors were recruited. The study was approved by the ethics committee at the University Hospital of Angers (France), and donors gave written informed consent. Donors were Caucasian men who did not have any accepted cardiovascular risk factors. The mean age of donors was 31 ± 2 years. They did not carry out any strenuous physical activity during the last 48 h. As described by Hoole et al. (12), RCond was performed by using a blood pressure cuff placed around the arm. The cuff was inflated to 200 mmHg pressure for 5 min, followed by 5 min of deflation, to permit reperfusion. This sequence was repeated two more times.

Peripheral blood (25 ml) from donors was collected in sodium citrate tubes. Venous puncture was performed in the contralateral arm before and 5 min after RCond. Blood samples were centrifuged by using the same protocol as for rats. A total of 200 μ l PFP was frozen and stored at -80°C for quantitative and qualitative analyses using flow cytometry. Numeration of platelet, leukocyte, endothelial, and erythrocyte MPs was performed by using anti-CD41, anti-CD45, anti-CD146, and anti-CD235a (Beckman Coulter) labeling, respectively. Additionally, annexin V binding was used to numerate phosphatidylserine-expressing circulating MPs. As described above for rats, an equal volume of sample and Flowcount beads were added, and samples were analyzed in a flow cytometer.

Study 3: infarct size measurement after RCond-derived rat MPs injection. RCond-derived rat MPs were injected intravenously into rats undergoing myocardial ischemia. Infarct size was measured and then compared with rats receiving RCond during similar myocardial

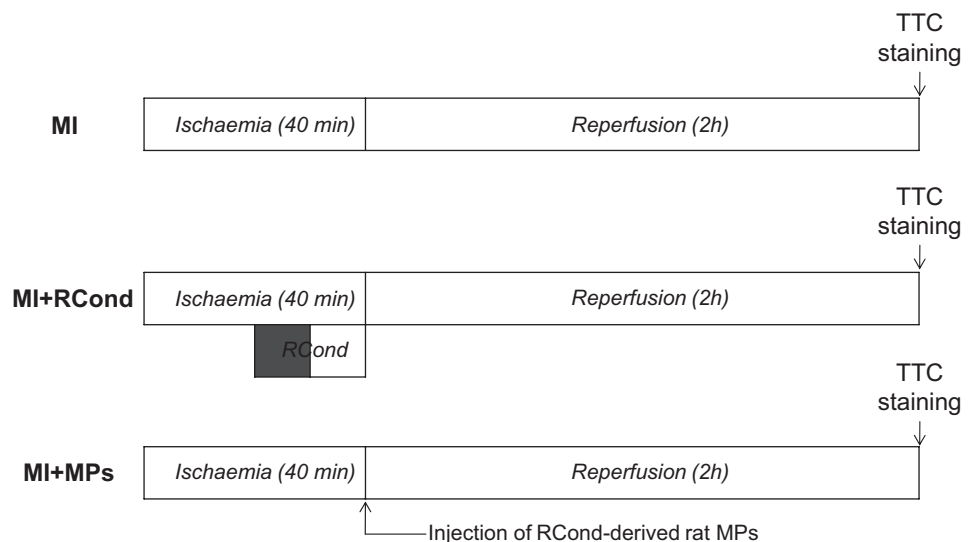
ischemia. Thus male Wistar rats weighing 288 ± 9 g were randomly assigned to one of the following groups (Fig. 1): 1) MI alone ($n = 6$); 2) MI + RCond started 20 min after coronary ligation ($n = 6$); or 3) MI + injection of RCond-derived rat MPs (MI + MPs) ($n = 5$).

All rats underwent a total of 40 min coronary ligation followed by a 2-h reperfusion by using an open chest surgical approach. A median thoracotomy was performed. After removal of the pericardium so as to expose the heart, a 7-0 polypropylene suture (Premio 7/0; Peters surgical) was placed around the proximal portion of the left anterior descending coronary artery (LAD). The ligature ends were passed through a small length of plastic tube to form a snare. For reversible coronary artery occlusion, the snare was pressed onto the surface of the heart directly above the coronary artery. Ischemia was confirmed by blanching of the myocardium below the suture and dyskinesia of the ischemic region. After 40 min of occlusion, reperfusion was achieved by loosening the snare and confirmed by a marked hyperemic response at reperfusion. Two hours after reperfusion, the heart was harvested. The LAD was re-occluded using the 7-0 monofilament suture kept in place. The ascending aorta was retrogradely perfused *ex vivo* by using Evans Blue. The left ventricle was sliced transversely from apex to base into five to six 1-mm slices. The slices were incubated in 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma) in phosphate buffer solution, pH 7.4, at 37°C for 20 min and then fixed in 10% formalin. For each section, the area at risk (nonblue) and infarct size (white area) were quantified with computerized planimetry using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Infarct size was expressed as a percentage of total left ventricular area at risk (INF%AAR), and risk area was expressed as a percentage of left ventricular area (AAR%LV).

The estimated plasma volume of each rat was calculated as previously described (17). Briefly, total rat blood volume was estimated using the formula $[0.06 \times \text{body wt (g)} + 0.77]$ and assuming a 43% hematocrit. The number of RCond-derived rat MPs to be injected was then estimated from the mean circulating level of MPs detected in the rat plasma following RCond. For example, estimated total blood volume of a rat of 250 g body wt was 15.77 ml and with the assumption of a 43% hematocrit, estimated plasma volume was 8.99 ml. Because mean concentration of MPs after RCond was $3,310$ events/ μ l of plasma, 29.77×10^6 RCond-derived rat MPs were injected ($8.99 \times 3,310 \times 10^3$). The profile of circulating RCond-derived MPs as well as injected RCond-derived MPs was analyzed by flow cytometer. The injection was performed in the femoral vein 2 min before myocardial reperfusion.

Statistical analysis. Statistical tests were performed using SPSS 14 software (SPSS, Chicago, IL). Data were expressed as means \pm SE,

Fig. 1. Experimental protocol. Open chest-operated Wistar rats were subjected to 40 min of coronary occlusion followed by 2 h of reperfusion and assigned into 3 groups: 1) myocardial infarction group (MI), rats received no other intervention; 2) MI + remote ischemic conditioning (RCond) group (MI + RCond), rats received 1 cycle of 10-min limb ischemia followed by 10-min limb reperfusion, 20 min after coronary ligation; 3) MI + injection of RCond-derived rat microparticles (MI + MPs). Injection was performed in the femoral vein 2 min before reperfusion. After 2 h of reperfusion, infarct size was measured after triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining in all groups.



and n represents the number of experiences. Between-group differences were compared using χ^2 -squared tests for categorical variables and one-way ANOVA, followed by post hoc Fisher's least significant difference-corrected multiple comparison test for continuous variables. Circulating levels of MPs before and after RCond in humans were compared by paired t -test.

RESULTS

Study 1: circulating levels of MPs and their cellular origins after RCond in rats. The total number of circulating MPs was not significantly increased in the RCond group compared with the control group ($3,310 \pm 650$ vs. $1,994 \pm 257$ events/ μ l of plasma, respectively; $P = 0.08$; Fig. 2A). Phenotypical characterization of the cellular origin of MPs showed a significant increase in endothelium-derived (CD54⁺) and Annexin V⁺ MPs in the RCond group versus the control group (Fig. 2, B and C). MPs from other cellular origins did not significantly differ between these two groups of rats, including those from platelet-(CD61⁺), leukocyte- (CD45⁺), and erythrocyte-derived cells (Fig. 2D–F). It should be noted that only 0.98 \pm 0.37% of leukocyte MPs were CD54⁺, indicating that CD54⁺ MPs reflected endothelial cell-derived MPs.

Study 2: circulating levels of MPs and their cellular origins after RCond in humans. Comparison between before and after RCond showed no significant difference for the total number of circulating MPs ($13,385 \pm 2,338$ vs. $14,908 \pm 2,653$ events/ μ l

of plasma, respectively; $P = 0.67$; Fig. 3A). As for rats, phenotypical characterization of the cellular origin of MPs showed a significant increase in endothelium-derived (CD146⁺) and Annexin V⁺ MPs in the RCond group versus the control group (Fig. 3, B and C, and Fig. 4). MPs from other cellular origins did not significantly differ between the two groups (Fig. 3, D–F).

Study 3: infarct size measurement after rat RCond-derived MPs injection. Mortality rate was similar in all MI groups (MI = 23.1%, MI + RCond = 18.2%, MI + MPs = 18.2%, not significantly different). The ischemic area induced by LAD ligation (AAR%LV) did not differ among the three groups (MI = $39.4 \pm 1.9\%$, MI + RCond = $39.2 \pm 5.5\%$, MI + MPs = $44.2 \pm 3.2\%$, not significantly different; Fig. 5).

As shown in Fig. 5, RCond induced infarct size reduction (INF%AAR = $24.4 \pm 5.9\%$ in MI + RCond group vs. $54.6 \pm 4.7\%$ in the MI alone group, respectively; $P < 0.01$). Contrary to MI + RCond, infarct size was not decreased in MI + MPs, compared with MI alone (INF%AAR = $50.2 \pm 6.4\%$ vs. $54.6 \pm 4.7\%$, respectively, not significantly different).

Phenotypical characterization of cellular origins of MPs showed no differences between injected MPs and those of circulating MPs (Fig. 6). These results suggest that the populations of MPs used for injection remain similar to those of circulating MPs.

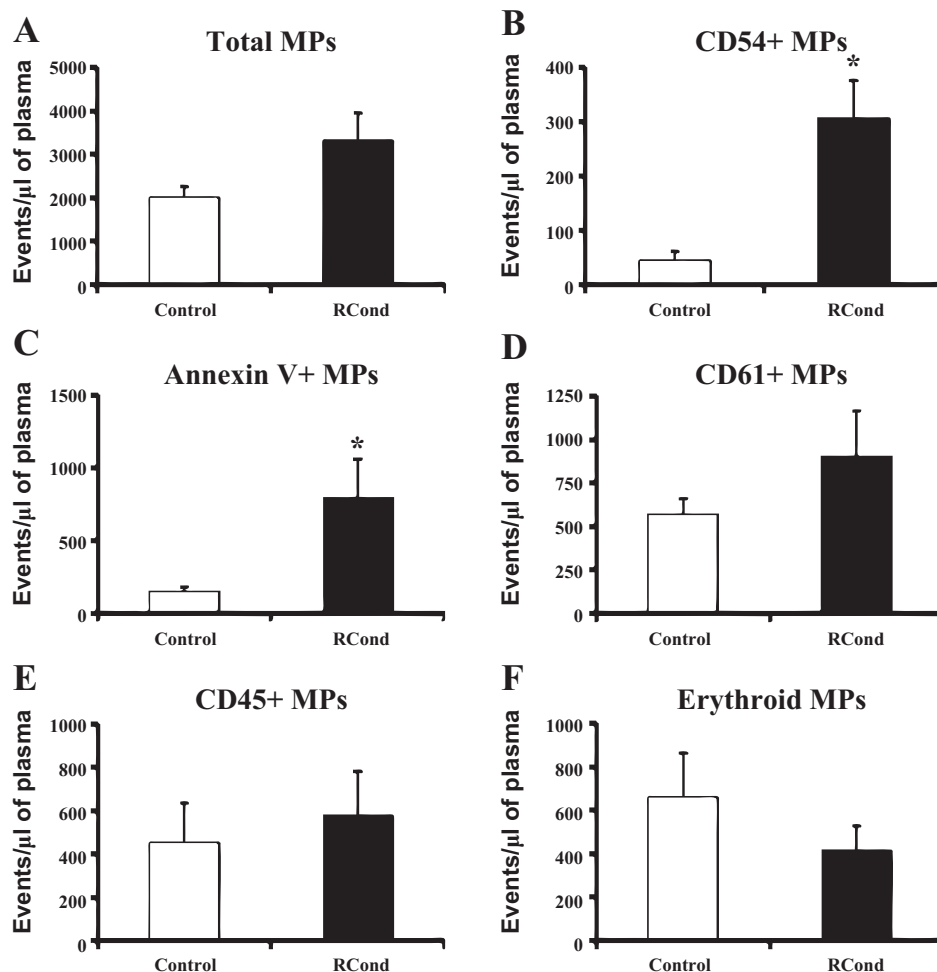


Fig. 2. Circulating MP levels in 2 groups of rats. Histograms show total circulating MP levels (A) and endothelium-derived MPs (CD54⁺; B), procoagulant MPs (Annexin V⁺; C), platelet-(CD61⁺; D), leukocyte- (CD45⁺; E), and erythrocyte-derived MPs (F) from control group ($n = 10$) and RCond group ($n = 10$). Results are expressed as events per microliter of plasma and given as means \pm SE. * $P < 0.05$ vs. control group.

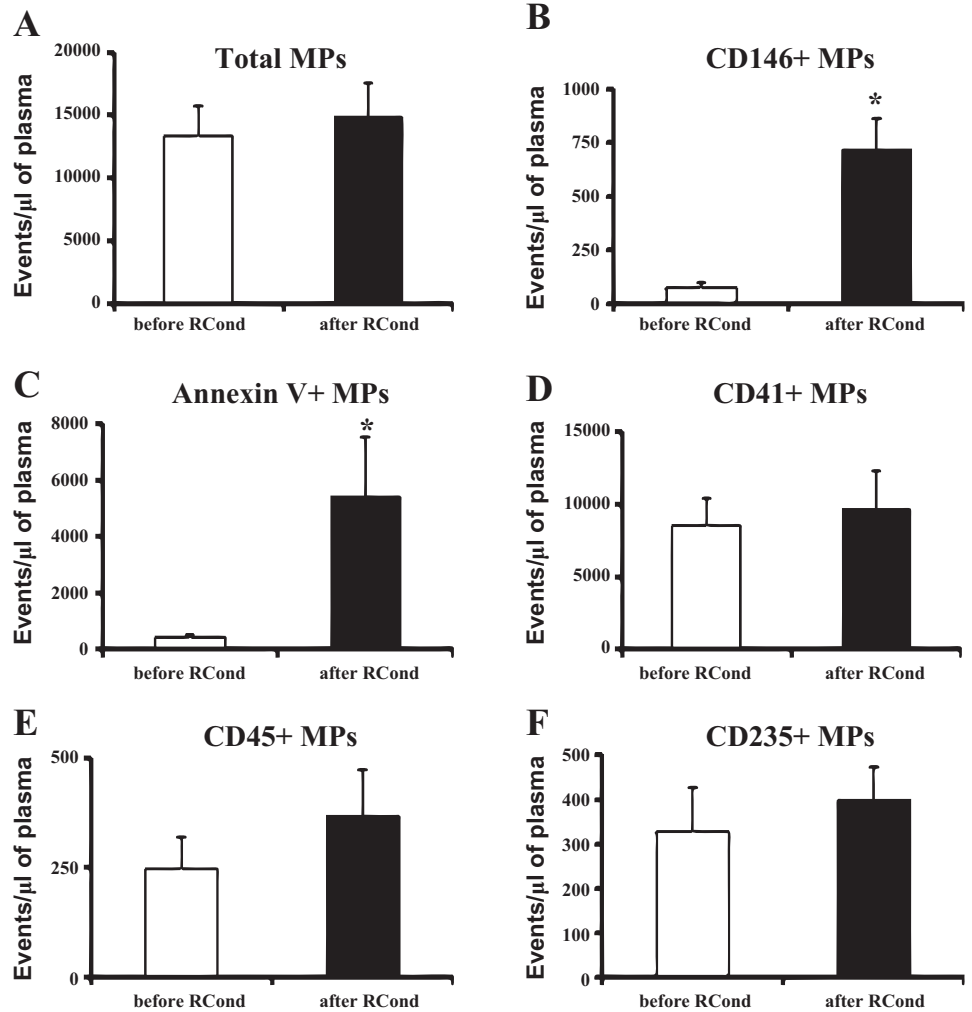


Fig. 3. Circulating MP levels before and after remote ischemic conditioning in human donors ($n = 8$). Histograms show total circulating MP levels (A), and endothelium-derived MPs (CD146⁺; B), procoagulant MPs (Annexin V⁺; C), platelet- (CD41⁺; D), leukocyte- (CD45⁺; E), and erythrocyte-derived (CD235⁺; F) MPs. Results are expressed as events per microliter of plasma and given as means \pm SE. * $P < 0.05$ vs. before RCond group.

DISCUSSION

RCond is a new noninvasive procedure with high potential for clinical application in patients presenting an acute MI. However, the mediator of RCond is still unknown. The present study demonstrated increased levels of EMPs and procoagulant MPs during RCond in both rats and humans. However, injection of rat RCond-derived MPs to rats did not mimic RCond-derived cardioprotection.

The actual mechanism of RCond and the messages relayed to the heart are still unknown. We, and others, have demonstrated that RCond activates the reperfusion injury salvage

kinase (RISK) and survivor activating factor enhancement (SAFE) pathways in the heart, both signal transduction cascades initially described in local ischemic pre- or postconditioning (11, 29, 30). Numerous studies sought to determine the vector between the remote organ and the heart. Several pathways, which may interact with each other, have been proposed (11): a neurogenic pathway, a systemic response, and/or a humoral pathway. In the neural hypothesis, one or various endogenous substances, released at the reperfusion, activate afferent neurofibers, resulting in a cardioprotective signal on the myocardium (9). In the systemic response, ischemia and reperfusion in the remote organ could

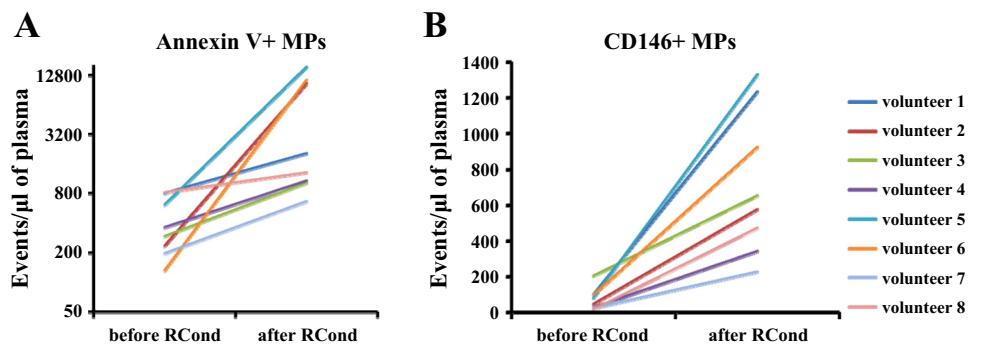


Fig. 4. Circulating MP levels of procoagulant MPs (Annexin V⁺; A) and endothelium-derived MPs (CD146⁺; B) before and after RCond in human donors ($n = 8$). Phenotypical characterization of cellular origin of MPs showed a \sim 12-fold (Annexin V⁺) and \sim 10-fold (CD146⁺) increase in the circulating level of procoagulant- and endothelium-derived MPs after RCond compared with before, respectively. Results are expressed as events per microliter of plasma.

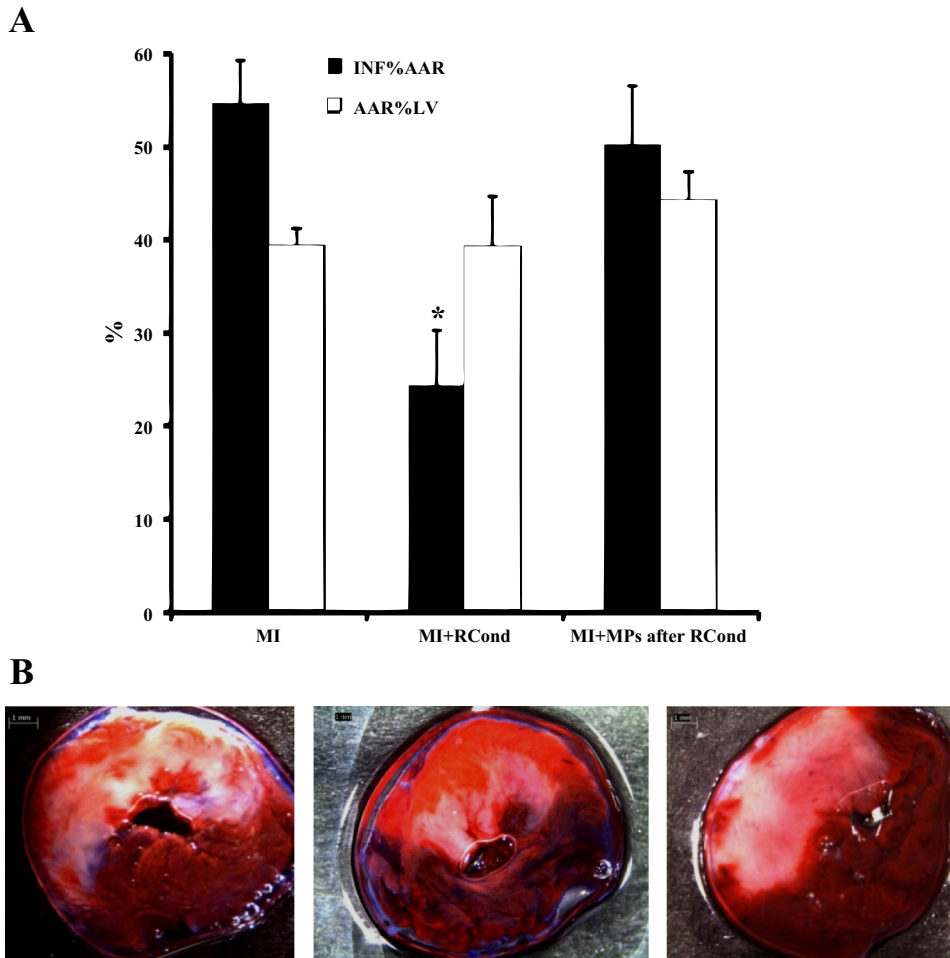


Fig. 5. Infarct size assessment in MPs-treated rats. *A*: infarct size is expressed as a percentage of area at risk (INF%AAR; black column), and area at risk expressed as a percentage of left ventricular area (AAR%LV; white column) in 3 groups of rats: 1) MI ($n = 6$); 2) MI + RCond ($n = 6$); 3) MI + MPs ($n = 5$). * $P < 0.05$ vs. MI group. *B*: representative pictures from each group of a mid-left ventricle slice after TTC staining.

change gene transcription, thereby suppressing proinflammatory gene expression (14). There are strong arguments for the existence of a humoral factor, released by the remote organ after ischemia, which is then transported to the heart (15). Shimizu et al. (28) showed that plasma or dialysate of plasma obtained from donor rabbits or humans subjected to RCond, using four cycles of 5 min limb ischemia and 5 min reperfusion, decreased ischemia-reperfusion injury in isolated hearts and cardiomyocytes models. The identity of this potential humoral factor is still unknown, even if several endogenous substances such as adenosine (24) and

opioids (32) could be involved at some point. Thus, the link between the remote organ and the heart is still unclear, and a proteomic study failed to clarify the connexion (16). MP characteristics are consistent with the low molecular mass and hydrophobic nature of the circulating factor that has been shown in Langendorff-perfused rabbit heart (28). Despite clear increased levels of EMPs and procoagulant MPs after RCond in both humans and rats, injection of rat RCond-derived MPs to rats before reperfusion did not induce cardioprotection in our model.

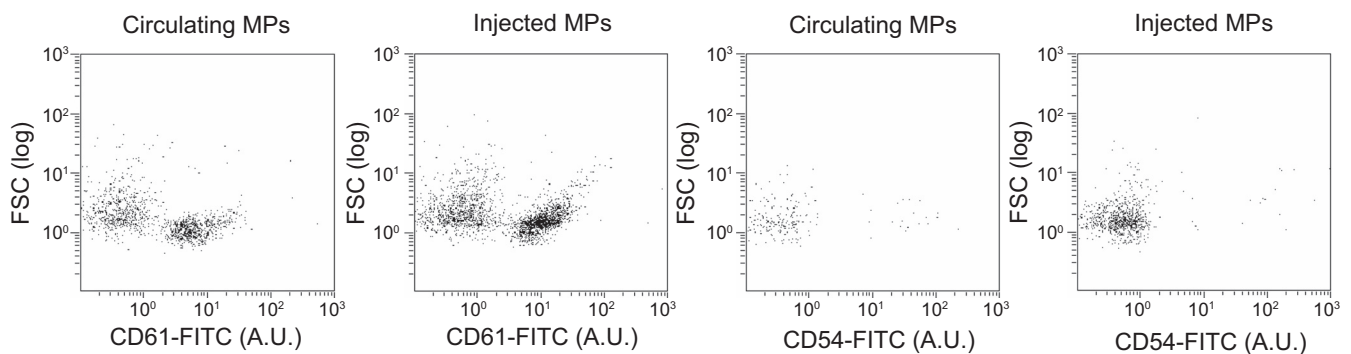


Fig. 6. Flow cytometer dot plot [forward scatter (FSC) vs. fluorescence levels of fluorescently labeled microparticles] showing circulating (*left*) and injected (*right*) MP profile. MPs were stained with CD61-FITC antibody or CD54-biotin antibody plus streptavidin-FITC and then measured using fluorescence threshold triggering.

To the best of our knowledge, the present study is the first to examine the effect of RCond on circulating MP levels. Interestingly, we observed similar results in both rats and humans. We found an approximately sevenfold increase in rats and a ~10-fold increase in humans in circulating EMP levels after RCond. EMPs are a novel marker of endothelial injury (8). Various stimuli have been shown to provoke EMP release in such prothrombotic or proinflammatory states, or during oxidative stress (8). Nitric oxide synthase decoupling may also participate in the production of EMP (31). Moreover, low laminar shear stress on the vessel wall is associated with high EMP levels (6). Ex vivo studies have analyzed the effects of these EMPs; for example, human EMPs can induce severe endothelial dysfunction in rat aortic rings by altering the endothelial nitric oxide transduction pathway (7). Thus EMPs could be considered to be endothelial dysfunction markers. Furthermore, studies in humans have shown association between EMPs and clinical manifestations or risk factors. EMPs are released by ischemic tissues, in acute coronary syndromes (4) or prolonged muscle ischemia (18). In this study, we demonstrated that EMPs are also released during short-term peripheral ischemia. In addition, RCond induced an approximately sixfold increase in rats and a ~12-fold increase in humans in the circulating level of procoagulant MPs, which are characterized by expressing phosphatidylserine on their outer leaflet. During this short-term ischemia, in both rats and humans, the loss of endothelial integrity and the apoptosis of endothelial cells may have induced a procoagulant state, with the subsequent release of MPs. As for EMPs, significant increases in procoagulant MP levels have been shown in the circulating blood of patients with acute coronary syndrome (19) and prolonged muscle ischemia (18). In this study, procoagulant MPs originated mainly but not exclusively from endothelial cells. The nonsignificant upward trend of platelet- and leukocyte-derived MPs may be involved in this increase in procoagulant MPs after RCond. Furthermore, other cellular types could also play a role, such as smooth muscle cells. At last, we observed that the total number of circulating MPs did not differ after RCond, despite a strong upward trend in both rats and humans. In the present study, only the phenotype of MPs differed after RCond, as previously described in other pathological state (26).

Limitations. Because the circulating time course of the injected RCond-induced MPs is unknown in our model, the lack of response to MPs injection may be due to a rapid MP sequestration. However, the half-life of transfused platelet-derived MPs has been reported to exceed 5 h in humans (27). Furthermore, similar approaches using exogenous injection of MPs were previously tested in our group, inducing relevant responses (1, 21). Thus we showed that circulating levels of MPs and EMPs were increased in patients with septic shock. These MPs isolated from septic patients were then injected intravenously into mice, providing evidence that increased circulating MPs are protective against vascular hyporeactivity (21). Furthermore, circulating MPs isolated from patients with metabolic syndrome injected to mice induced vascular dysfunction (1). Finally, MPs collected after RCond massively expressed phosphatidylserine and were procoagulant, with a potential thrombogenic effect following injection. However, we observed an infarct size decrease in the MI + RCond

group, although procoagulant MPs were released into the plasma of these rats.

In summary, this study demonstrated that RCond induces similar MP release in both rats and humans, especially EMPs. However, these MPs did not appear to be a biological vector of RCond between the remote organ and the heart in our experimental model.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre Legras and Jérôme Roux from the animal facilities (*Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire*) for taking care of the animal subjects. We also thank Patrick Saulnier for sizing MPs.

GRANTS

Julien Jeanneteau and Pierre Hibert were supported by grants from the "Fédération Française de Cardiologie" and the "Conseil Général du Maine et Loire," respectively.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: J.J., P.H., M.C.M., S.T.-C., and S.T. performed experiments; J.J., M.C.M., R.A., and F.P. analyzed data; J.J., M.C.M., S.T., and F.P. interpreted results of experiments; J.J. prepared figures; J.J. drafted manuscript; J.J., P.H., M.C.M., S.T., A.F., R.A., and F.P. approved final version of manuscript; M.C.M., R.A., and F.P. edited and revised manuscript; F.P. conception and design of research.

REFERENCES

1. Agouni A, Ducluzeau PH, Benamer T, Faure S, Sladkova M, Duluc L, Leftheriotis G, Pechanova O, Delibegovic M, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Microparticles from patients with metabolic syndrome induce vascular hypo-reactivity via Fas/Fas-ligand pathway in mice. *PLoS One* 6: e27809, 2011.
2. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal A.H, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, Heymes C, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* 173: 1210–1219, 2008.
3. Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J* 21: 2735–2741, 2007.
4. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E, Ahn YS. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 145: 962–970, 2003.
5. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bottcher M, Kalltoft AK, Terkelsen CJ, Munk K, Andersen NH, Hansen TM, Trautner S, Lassen JF, Christiansen EH, Krusell LR, Kristensen SD, Thuesen L, Nielsen SS, Rehling M, Sorensen HT, Redington AN, Nielsen TT. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 375: 727–734, 2010.
6. Boulanger CM, Amabile N, Guerin AP, Pannier B, Leroyer AS, Mallat CN, Tedgui A, London GM. In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension* 49: 902–908, 2007.
7. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 104: 2649–2652, 2001.
8. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 335: 143–151, 2009.
9. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 94: 2193–2200, 1996.

10. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis* 204: 334–341, 2009.
11. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 79: 377–386, 2008.
12. Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmke R, Densem CG, Clarke SC, Shapiro LM, Schofield PM, O'Sullivan M, Dutka DP. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial. *Circulation* 119: 820–827, 2009.
13. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol* 100: 404–412, 2005.
14. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics* 19: 143–150, 2004.
15. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, Kharbanda RK, Redington AN. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation* 79: 1691–1695, 2005.
16. Lang SC, Elsasser A, Scheler C, Vetter S, Tiefenbacher CP, Kubler W, Katus HA, Vogt AM. Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning—identifying a protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol* 101: 149–158, 2006.
17. Lee HB, Blafox MD. Blood volume in the rat. *J Nucl Med* 26: 72–76, 1985.
18. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, Recalde A, Blanc-Brude O, Mees B, Vilar J, Tedgui A, Levy BI, Chimini G, Boulanger CM, Silvestre JS. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 119: 2808–2817, 2009.
19. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101: 841–843, 2000.
20. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1004–H1009, 2005.
21. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 1148–1155, 2008.
22. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349: 1498–1504, 1997.
23. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273: H1707–H1712, 1997.
24. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H1542–H1547, 1998.
25. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 38: 291–300, 1998.
26. Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, Mastronardi ML, Agouni A, Meslier N, Racineux JL, Martinez MC, Trzepizur W, Andriantsitohaina R. Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am J Pathol* 177: 974–983, 2010.
27. Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grutzner S, Iberer M, Toth B, Pihusch R. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets* 22: 111–116, 2011.
28. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, Li J, Gross G, Wilson GJ, Callahan J, Redington AN. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)* 117: 191–200, 2009.
29. Tamarelle S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croue A, Henrion D, Furber A, Prunier F. Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H2035–H2043, 2009.
30. Tamarelle S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croue A, Henrion D, Furber A, Prunier F. RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol* 106: 1329–1339, 2011.
31. Wang JM, Wang Y, Huang JY, Yang Z, Chen L, Wang LC, Tang AL, Lou ZF, Tao J. C-reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH₄-dependent NO formation. *J Vasc Res* 44: 241–248, 2007.
32. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sarvary L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res* 55: 590–601, 2002.

BIBLIOGRAPHIE

1. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB (1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56: 786-794.
2. Braunwald E (1989) Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival. Should the paradigm be expanded? *Circulation* 79: 441-444.
3. Ginks WR, Sybers HD, Maroko PR, Covell JW, Sobel BE, et al. (1972) Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *J Clin Invest* 51: 2717-2723.
4. Maroko PR, Libby P, Ginks WR, Bloor CM, Shell WE, et al. (1972) Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 51: 2710-2716.
5. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H (1960) Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 70: 68-78.
6. Zweier JL, Talukder MA (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 70: 181-190.
7. Kleikers PW, Wingler K, Hermans JJ, Diebold I, Altenhofer S, et al. (2012) NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Med (Berl)* 90: 1391-1406.
8. Avkiran M (2001) Protection of the ischaemic myocardium by Na⁺/H⁺ exchange inhibitors: potential mechanisms of action. *Basic Res Cardiol* 96: 306-311.
9. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M (1998) A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 38: 291-300.
10. Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (1995) Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol* 268: H1531-1539.
11. Bond JM, Herman B, Lemasters JJ (1991) Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 798-803.
12. Griffiths EJ, Halestrap AP (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 307 (Pt 1): 93-98.
13. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ (2006) Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent

- death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H2024-2034.
14. Zweier JL (1988) Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* 263: 1353-1357.
 15. Klein HH, Pich S, Lindert S, Nebendahl K, Warneke G, et al. (1989) Treatment of reperfusion injury with intracoronary calcium channel antagonists and reduced coronary free calcium concentration in regionally ischemic, reperfused porcine hearts. *J Am Coll Cardiol* 13: 1395-1401.
 16. Avkiran M, Marber MS (2002) Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol* 39: 747-753.
 17. Halestrap AP, Pasdois P (2009) The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1402-1415.
 18. Post JA, Verkleij AJ, Langer GA (1995) Organization and function of sarcolemmal phospholipids in control and ischemic/reperfused cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 27: 749-760.
 19. Shen AC, Jennings RB (1972) Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 67: 441-452.
 20. Thibault H, Piot C, Ovize M (2007) Postconditioning in man. *Heart Fail Rev* 12: 245-248.
 21. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136.
 22. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM (1993) Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88: 1264-1272.
 23. Liu H, Wu R, Jia RP, Zhong B, Zhu JG, et al. (2013) Ischemic preconditioning increases endothelial progenitor cell number to attenuate partial nephrectomy-induced ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 8: e55389.
 24. Jin LM, Liu YX, Zhou L, Xie HY, Feng XW, et al. (2010) Ischemic preconditioning attenuates morphological and biochemical changes in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Pathobiology* 77: 136-146.
 25. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, et al. (1997) Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 77: 314-318.

26. Walsh SR, Tang TY, Kullar P, Jenkins DP, Dutka DP, et al. (2008) Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg* 34: 985-994.
27. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB (1993) Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 342: 276-277.
28. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, et al. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H579-588.
29. Laskey WK (2005) Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv* 65: 361-367.
30. Ma X, Zhang X, Li C, Luo M (2006) Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction. *J Interv Cardiol* 19: 367-375.
31. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, et al. (2005) Postconditioning the human heart. *Circulation* 112: 2143-2148.
32. Szekeres L, Papp JG, Szilvassy Z, Udvary E, Vegh A (1993) Moderate stress by cardiac pacing may induce both short term and long term cardioprotection. *Cardiovasc Res* 27: 593-596.
33. Lawson CS, Coltart DJ, Hearse DJ (1993) "Dose"-dependency and temporal characteristics of protection by ischaemic preconditioning against ischaemia-induced arrhythmias in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 25: 1391-1402.
34. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, et al. (1993) Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 72: 1293-1299.
35. Vinten-Johansen J, Granfeldt A, Mykytenko J, Undyala VV, Dong Y, et al. (2011) The multidimensional physiological responses to postconditioning. *Antioxid Redox Signal* 14: 791-810.
36. Roubille F, Franck-Miclo A, Covinhes A, Lafont C, Cransac F, et al. (2011) Delayed postconditioning in the mouse heart in vivo. *Circulation* 124: 1330-1336.
37. Flaherty MP, Guo Y, Tiwari S, Rezazadeh A, Hunt G, et al. (2008) The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 45: 735-741.

38. Peart JN, Gross GJ (2003) Adenosine and opioid receptor-mediated cardioprotection in the rat: evidence for cross-talk between receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H81-89.
39. Sugano M, Tsuchida K, Hata T, Makino N (2004) In vivo transfer of soluble TNF- α receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats. *FASEB J* 18: 911-913.
40. Yang XM, Krieg T, Cui L, Downey JM, Cohen MV (2004) NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J Mol Cell Cardiol* 36: 411-421.
41. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM (2004) Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 95: 230-232.
42. Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, Fischer G, Xu L, et al. (2006) Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. *Cardiovasc Res* 72: 152-162.
43. Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, et al. (2005) Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1618-1626.
44. Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, Wang OL, Rokosh G, et al. (2005) Role of the protein kinase C- ϵ -Raf-1-MEK-1/2-p44/42 MAPK signaling cascade in the activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 and induction of cyclooxygenase-2 after ischemic preconditioning. *Circulation* 112: 1971-1978.
45. Boengler K, Buechert A, Heinen Y, Roeskes C, Hilfiker-Kleiner D, et al. (2008) Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ Res* 102: 131-135.
46. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, et al. (2005) Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor- α activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* 112: 3911-3918.
47. Tamarelle S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croue A, et al. (2011) RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic

- perconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol* 106: 1329-1339.
48. Wang Y, Ahmad N, Kudo M, Ashraf M (2004) Contribution of Akt and endothelial nitric oxide synthase to diazoxide-induced late preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1125-1131.
 49. Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, Wang OL, Rokosh G, et al. (2007) Endothelial nitric oxide synthase plays an obligatory role in the late phase of ischemic preconditioning by activating the protein kinase C epsilon p44/42 mitogen-activated protein kinase pSer-signal transducers and activators of transcription1/3 pathway. *Circulation* 116: 535-544.
 50. Quarrie R, Cramer BM, Lee DS, Steinbaugh GE, Erdahl W, et al. (2011) Ischemic preconditioning decreases mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production in the postischemic heart. *J Surg Res* 165: 5-14.
 51. Sivaraman V, Hausenloy DJ, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, et al. (2009) The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 46: 758-764.
 52. Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, et al. (2006) Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc Res* 70: 315-324.
 53. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M (2006) PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res* 69: 178-185.
 54. Heusch G, Boengler K, Schulz R (2008) Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation* 118: 1915-1919.
 55. Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH (2008) Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* 15: 521-529.
 56. Baines CP (2009) The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 104: 181-188.
 57. Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, et al. (2006) The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 281: 20801-20808.

58. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61: 372-385.
59. Saotome M, Katoh H, Yaguchi Y, Tanaka T, Urushida T, et al. (2009) Transient opening of mitochondrial permeability transition pore by reactive oxygen species protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1125-1132.
60. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M (2008) Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 117: 2761-2768.
61. Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E (2002) Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 90: 377-379.
62. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, et al. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113: 1535-1549.
63. Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, Ahmed AI, Clark JE, et al. (2008) Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse. *Circ Res* 103: 307-314.
64. Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF (2007) Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol* 152: 855-869.
65. Krieg T, Qin Q, Philipp S, Alexeyev MF, Cohen MV, et al. (2004) Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2606-2611.
66. Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, Yang XM, Philipp S, et al. (2004) Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H468-476.
67. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, et al. (2006) Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol* 101: 180-189.

68. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, et al. (2010) Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 87: 406-423.
69. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P (1993) Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87: 893-899.
70. McClanahan T NB, Wolke L, Martin B, Metz T, Gallagher K (1993) Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits. *FASEB J* 7: A118. (abstract).
71. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA (1997) Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 96: 1641-1646.
72. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B (1997) Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol* 273: H1707-1712.
73. Diwan V, Jaggi AS, Singh M, Singh N, Singh D (2008) Possible involvement of erythropoietin in remote renal preconditioning-induced cardioprotection in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 51: 126-130.
74. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM (1998) Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 275: H1542-1547.
75. Singh D, Chopra K (2004) Evidence of the role of angiotensin AT(1) receptors in remote renal preconditioning of myocardium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26: 117-122.
76. Weinbrenner C, Schulze F, Sarvary L, Strasser RH (2004) Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via delta1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart. *Cardiovasc Res* 61: 591-599.
77. Heidbreder M, Naumann A, Tempel K, Dominiak P, Dendorfer A (2008) Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cardiovasc Res* 78: 108-115.

78. Schoemaker RG, van Heijningen CL (2000) Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1571-1576.
79. Wolfrum S, Nienstedt J, Heidbreder M, Schneider K, Dominiak P, et al. (2005) Calcitonin gene related peptide mediates cardioprotection by remote preconditioning. *Regul Pept* 127: 217-224.
80. Schulte G, Sommerschild H, Yang J, Tokuno S, Goiny M, et al. (2004) Adenosine A receptors are necessary for protection of the murine heart by remote, delayed adaptation to ischaemia. *Acta Physiol Scand* 182: 133-143.
81. Tokuno S, Hinokiyama K, Tokuno K, Lowbeer C, Hansson LO, et al. (2002) Spontaneous ischemic events in the brain and heart adapt the hearts of severely atherosclerotic mice to ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 995-1001.
82. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, et al. (2002) Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 106: 2881-2883.
83. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, et al. (2005) Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation* 79: 1691-1695.
84. Zhang SZ, Wang NF, Xu J, Gao Q, Lin GH, et al. (2006) Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology* 105: 550-556.
85. Kanoria S, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR (2007) Hind limb remote preconditioning of the liver: a role for nitric oxide and HO-1. *Transplantation* 83: 363-364.
86. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, et al. (2008) Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. *J Surg Res* 150: 304-330.
87. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, et al. (2007) Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1883-1890.

88. Wei M, Xin P, Li S, Tao J, Li Y, et al. (2011) Repeated remote ischemic postconditioning protects against adverse left ventricular remodeling and improves survival in a rat model of myocardial infarction. *Circ Res* 108: 1220-1225.
89. Zhao JL, Yang YJ, Pei WD, Sun YH, You SJ, et al. (2009) Remote periconditioning reduces myocardial no-reflow by the activation of K ATP channel via inhibition of Rho-kinase. *Int J Cardiol* 133: 179-184.
90. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, et al. (2005) Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol* 100: 404-412.
91. Li CM, Zhang XH, Ma XJ, Luo M (2006) Limb ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Scand Cardiovasc J* 40: 312-317.
92. Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, Font G, Piroth Z, et al. (2007) Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart* 93: 749-752.
93. Gritsopoulos G, Iliodromitis EK, Zoga A, Farmakis D, Demerouti E, et al. (2009) Remote postconditioning is more potent than classic postconditioning in reducing the infarct size in anesthetized rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther* 23: 193-198.
94. Breivik L, Helgeland E, Aarnes EK, Mrdalj J, Jonassen AK (2011) Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion. *Basic Res Cardiol* 106: 135-145.
95. Tang ZL, Dai W, Li YJ, Deng HW (1999) Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359: 243-247.
96. Kanoria S, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM, Williams R, et al. (2006) Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 93: 762-768.
97. Moses MA, Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Huang N, et al. (2005) Mitochondrial KATP channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of

- skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H559-567.
98. Peng B, Guo QL, He ZJ, Ye Z, Yuan YJ, et al. (2012) Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway. *Brain Res* 1445: 92-102.
 99. Ren C, Yan Z, Wei D, Gao X, Chen X, et al. (2009) Limb remote ischemic postconditioning protects against focal ischemia in rats. *Brain Res* 1288: 88-94.
 100. Xiao L, Lu R, Hu CP, Deng HW, Li YJ (2001) Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol* 427: 131-135.
 101. Li G, Labruto F, Sirsjo A, Chen F, Vaage J, et al. (2004) Myocardial protection by remote preconditioning: the role of nuclear factor kappa-B p105 and inducible nitric oxide synthase. *Eur J Cardiothorac Surg* 26: 968-973.
 102. Moses MA, Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Huang N, et al. (2005) Inducing late phase of infarct protection in skeletal muscle by remote preconditioning: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1609-1617.
 103. Szijarto A, Czigany Z, Turoczi Z, Harsanyi L (2012) Remote ischemic preconditioning--a simple, low-risk method to decrease ischemic reperfusion injury: models, protocols and mechanistic background. A review. *J Surg Res* 178: 797-806.
 104. Venugopal V, Hausenloy DJ, Ludman A, Di Salvo C, Kolvekar S, et al. (2009) Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial. *Heart* 95: 1567-1571.
 105. Li L, Luo W, Huang L, Zhang W, Gao Y, et al. (2010) Remote preconditioning reduces myocardial injury in adult valve replacement: a randomized controlled trial. *J Surg Res* 164: e21-26.
 106. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bottcher M, Kalltoft AK, et al. (2010) Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 375: 727-734.

107. Pilcher JM, Young P, Weatherall M, Rahman I, Bonser RS, et al. (2012) A systematic review and meta-analysis of the cardioprotective effects of remote ischaemic preconditioning in open cardiac surgery. *J R Soc Med* 105: 436-445.
108. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, et al. (2007) Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 370: 575-579.
109. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, et al. (2006) Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol* 47: 2277-2282.
110. Brevoord D, Kranke P, Kuijpers M, Weber N, Hollmann M, et al. (2012) Remote ischemic conditioning to protect against ischemia-reperfusion injury: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 7: e42179.
111. Lim SY, Hausenloy DJ (2012) Remote ischemic conditioning: from bench to bedside. *Front Physiol* 3: 27.
112. Yetgin T, Manintveld OC, Boersma E, Kappetein AP, van Geuns RJ, et al. (2012) Remote ischemic conditioning in percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting. *Circ J* 76: 2392-2404.
113. Hong DM, Mint JJ, Kim JH, Sohn IS, Lim TW, et al. (2010) The effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Anaesth Intensive Care* 38: 924-929.
114. Karuppasamy P, Chaubey S, Dew T, Musto R, Sherwood R, et al. (2011) Remote intermittent ischemia before coronary artery bypass graft surgery: a strategy to reduce injury and inflammation? *Basic Res Cardiol* 106: 511-519.
115. Rahman IA, Mascaro JG, Steeds RP, Frenneaux MP, Nightingale P, et al. (2010) Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment? *Circulation* 122: S53-59.
116. Hausenloy DJ, Yellon DM (2011) The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat Rev Cardiol* 8: 619-629.
117. Zhou C, Liu Y, Yao Y, Zhou S, Fang N, et al. (2013) beta-blockers and volatile anesthetics may attenuate cardioprotection by remote preconditioning in adult

- cardiac surgery: a meta-analysis of 15 randomized trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 27: 305-311.
118. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, et al. (2013) Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 382: 597-604.
 119. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD (1996) Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 94: 2193-2200.
 120. Faigle M, Seessle J, Zug S, El Kasmi KC, Eltzschig HK (2008) ATP release from vascular endothelia occurs across Cx43 hemichannels and is attenuated during hypoxia. *PLoS One* 3: e2801.
 121. Liem DA, Verdouw PD, Ploeg H, Kazim S, Duncker DJ (2002) Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H29-37.
 122. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, et al. (1999) Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol* 33: 556-564.
 123. Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, et al. (2010) Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 40: 804-809.
 124. Ding YF, Zhang MM, He RR (2001) Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Sheng Li Xue Bao* 53: 7-12.
 125. Dong JH, Liu YX, Ji ES, He RR (2004) [Limb ischemic preconditioning reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats]. *Sheng Li Xue Bao* 56: 41-46.
 126. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, et al. (2002) Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform. *Cardiovasc Res* 55: 583-589.
 127. Ferdinandy P, Csont T, Csonka C, Torok M, Dux M, et al. (1997) Capsaicin-sensitive local sensory innervation is involved in pacing-induced

- preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and CGRP? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356: 356-363.
128. Li YJ, Xiao ZS, Peng CF, Deng HW (1996) Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol* 311: 163-167.
 129. Ren X, Wang Y, Jones WK (2004) TNF-alpha is required for late ischemic preconditioning but not for remote preconditioning of trauma. *J Surg Res* 121: 120-129.
 130. Jones WK, Fan GC, Liao S, Zhang JM, Wang Y, et al. (2009) Peripheral nociception associated with surgical incision elicits remote nonischemic cardioprotection via neurogenic activation of protein kinase C signaling. *Circulation* 120: S1-9.
 131. Gross GJ, Baker JE, Moore J, Falck JR, Nithipatikom K (2011) Abdominal surgical incision induces remote preconditioning of trauma (RPCT) via activation of bradykinin receptors (BK2R) and the cytochrome P450 epoxygenase pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 25: 517-522.
 132. Gross GJ, Hsu A, Gross ER, Falck JR, Nithipatikom K (2013) Factors mediating remote preconditioning of trauma in the rat heart: central role of the cytochrome p450 epoxygenase pathway in mediating infarct size reduction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 18: 38-45.
 133. Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, Kwiecien S, Sliwowski Z, et al. (2004) Importance of brain-gut axis in the gastroprotection induced by gastric and remote preconditioning. *J Physiol Pharmacol* 55: 165-177.
 134. Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ (2010) The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 105: 651-655.
 135. Redington KL, Disenhouse T, Strantzas SC, Gladstone R, Wei C, et al. (2012) Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors. *Basic Res Cardiol* 107: 241.
 136. Wong GT, Lu Y, Mei B, Xia Z, Irwin MG (2012) Cardioprotection from remote preconditioning involves spinal opioid receptor activation. *Life Sci* 91: 860-865.
 137. Mastitskaya S, Marina N, Gourine A, Gilbey MP, Spyer KM, et al. (2012) Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones. *Cardiovasc Res* 95: 487-494.

138. Donato M, Buchholz B, Rodriguez M, Perez V, Inserte J, et al. (2013) Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* 98: 425-434.
139. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sarvary L, Strasser RH (2002) Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res* 55: 590-601.
140. Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP, Becker RC, Porcaro WA, et al. (1999) Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J Thromb Thrombolysis* 8: 123-129.
141. Dickson EW, Porcaro WA, Fenton RA, Heard SO, Reinhardt CP, et al. (2000) "Preconditioning at a distance" in the isolated rabbit heart. *Acad Emerg Med* 7: 311-317.
142. Huffman LC, Koch SE, Butler KL (2008) Coronary effluent from a preconditioned heart activates the JAK-STAT pathway and induces cardioprotection in a donor heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H257-262.
143. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, et al. (1999) Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol* 277: H2451-2457.
144. Lang SC, Elsasser A, Scheler C, Vetter S, Tiefenbacher CP, et al. (2006) Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol* 101: 149-158.
145. Serejo FC, Rodrigues LF, Jr., da Silva Tavares KC, de Carvalho AC, Nascimento JH (2007) Cardioprotective properties of humoral factors released from rat hearts subject to ischemic preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol* 49: 214-220.
146. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, et al. (2009) Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)* 117: 191-200.
147. Hepponstall M, Ignjatovic V, Binos S, Monagle P, Jones B, et al. (2012) Remote ischemic preconditioning (RIPC) modifies plasma proteome in humans. *PLoS One* 7: e48284.

148. Dickson EW, Blehar DJ, Carraway RE, Heard SO, Steinberg G, et al. (2001) Naloxone blocks transferred preconditioning in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1751-1756.
149. Dickson EW, Tubbs RJ, Porcaro WA, Lee WJ, Blehar DJ, et al. (2002) Myocardial preconditioning factors evoke mesenteric ischemic tolerance via opioid receptors and K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H22-28.
150. Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ (2002) Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1317-1323.
151. Michelsen MM, Stottrup NB, Schmidt MR, Lofgren B, Jensen RV, et al. (2012) Exercise-induced cardioprotection is mediated by a bloodborne, transferable factor. *Basic Res Cardiol* 107: 260.
152. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, et al. (2003) Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1435-1443.
153. Zhou Y, Fathali N, Lekic T, Ostrowski RP, Chen C, et al. (2011) Remote limb ischemic postconditioning protects against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rat pups by the opioid receptor/Akt pathway. *Stroke* 42: 439-444.
154. Di Filippo C, Rossi F, Rossi S, D'Amico M (2004) Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. *J Leukoc Biol* 75: 453-459.
155. Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, Jabejdar-Maralani P, Sadeghipour H, et al. (2008) Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 579: 246-252.
156. Viscomi MT, Oddi S, Latini L, Pasquariello N, Florenzano F, et al. (2009) Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *J Neurosci* 29: 4564-4570.
157. Su B, Dong H, Ma R, Zhang X, Ding Q, et al. (2009) Cannabinoid 1 receptor mediation of spinal cord ischemic tolerance induced by limb remote ischemia preconditioning in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 138: 1409-1416.

158. Petrishchev NN, Vlasov TD, Sipovsky VG, Kurapeev DI, Galagudza MM (2001) Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning? *Pathophysiology* 7: 271-274.
159. Vlasov TD, Korzhevskii DE, Poliakova EA (2004) [Ischemic adaptation of the rat brain as a method for protection of endothelium from ischemic reperfusion injury]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 90: 40-48.
160. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J (1999) Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 30: 1481-1489.
161. Kuntscher MV, Kastell T, Altmann J, Menke H, Gebhard MM, et al. (2002) Acute remote ischemic preconditioning II: the role of nitric oxide. *Microsurgery* 22: 227-231.
162. Kanoria S, Jalan R, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR (2007) Protocols and mechanisms for remote ischemic preconditioning: a novel method for reducing ischemia reperfusion injury. *Transplantation* 84: 445-458.
163. Kanoria S, Glantzounis G, Quaglia A, Dinesh S, Fusai G, et al. (2012) Remote preconditioning improves hepatic oxygenation after ischaemia reperfusion injury. *Transpl Int* 25: 783-791.
164. Tokuno S, Chen F, Pernow J, Jiang J, Valen G (2002) Effects of spontaneous or induced brain ischemia on vessel reactivity: the role of inducible nitric oxide synthase. *Life Sci* 71: 679-692.
165. Wang Y, Xu H, Mizoguchi K, Oe M, Maeta H (2001) Intestinal ischemia induces late preconditioning against myocardial infarction: a role for inducible nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 49: 391-398.
166. Lai IR, Chang KJ, Chen CF, Tsai HW (2006) Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: the protective role of heme oxygenase-1. *Transplantation* 81: 1311-1317.
167. Kant R, Diwan V, Jaggi AS, Singh N, Singh D (2008) Remote renal preconditioning-induced cardioprotection: a key role of hypoxia inducible factor-prolyl 4-hydroxylases. *Mol Cell Biochem* 312: 25-31.
168. Kalakech H, Tamarelle S, Pons S, Godin-Ribuot D, Carmeliet P, et al. (2013) Role of hypoxia inducible factor-1alpha in remote limb ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*.

169. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, et al. (2004) The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics* 19: 143-150.
170. Konstantinov IE, Arab S, Li J, Coles JG, Boscarino C, et al. (2005) The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130: 1326-1332.
171. Huda R, Chung DH, Mathru M (2005) Ischemic preconditioning at a distance: altered gene expression in mouse heart and other organs following brief occlusion of the mesenteric artery. *Heart Lung Circ* 14: 36-43.
172. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, et al. (2001) Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 33: 100-113.
173. Gyurkovics EA, P. Turóczy, ZS. Garbaisz, D. Varga, M. Hegedüs, V. Lotz, G. Kupcsulik, P. Szijártó, A. (2010) Postconditioning attenuates remote organ injury after lower limb arterial occlusion. *Interventional Medicine & Applied Science* 2: 169-177.
174. Waldow T, Alexiou K, Witt W, Albrecht S, Wagner F, et al. (2005) Protection against acute porcine lung ischemia/reperfusion injury by systemic preconditioning via hind limb ischemia. *Transpl Int* 18: 198-205.
175. Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Campbell FC (2002) Ischemic preconditioning before lower limb ischemia--reperfusion protects against acute lung injury. *J Vasc Surg* 35: 1264-1273.
176. Shimizu M, Saxena P, Konstantinov IE, Cherepanov V, Cheung MM, et al. (2010) Remote ischemic preconditioning decreases adhesion and selectively modifies functional responses of human neutrophils. *J Surg Res* 158: 155-161.
177. Xin P, Zhu W, Li J, Ma S, Wang L, et al. (2010) Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1819-1831.
178. Hausenloy DJ, Iliodromitis EK, Andreadou I, Papalois A, Gritsopoulos G, et al. (2012) Investigating the signal transduction pathways underlying remote ischemic conditioning in the porcine heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 26: 87-93.
179. Kristiansen SB, Henning O, Kharbanda RK, Nielsen-Kudsk JE, Schmidt MR, et al. (2005) Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted

- heart by a KATP channel-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1252-1256.
180. Wang YP, Maeta H, Mizoguchi K, Suzuki T, Yamashita Y, et al. (2002) Intestinal ischemia preconditions myocardium: role of protein kinase C and mitochondrial K(ATP) channel. *Cardiovasc Res* 55: 576-582.
 181. Loukogeorgakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, Kolvekar SK, Donald A, et al. (2007) Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation* 116: 1386-1395.
 182. Okorie MI, Bhavsar DD, Ridout D, Charakida M, Deanfield JE, et al. (2011) Postconditioning protects against human endothelial ischaemia-reperfusion injury via subtype-specific KATP channel activation and is mimicked by inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *Eur Heart J* 32: 1266-1274.
 183. Rajagopal S, Kumar DP, Mahavadi S, Bhattacharya S, Zhou R, et al. (2013) Activation of G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, induces smooth muscle relaxation via both Epac- and PKA-mediated inhibition of RhoA/Rho kinase pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304: G527-535.
 184. Wang D, Luo P, Wang Y, Li W, Wang C, et al. (2013) Glucagon-like peptide-1 protects against cardiac microvascular injury in diabetes via a cAMP/PKA/Rho-dependent mechanism. *Diabetes* 62: 1697-1708.
 185. Yang C, Talukder MA, Varadharaj S, Velayutham M, Zweier JL (2013) Early ischaemic preconditioning requires Akt- and PKA-mediated activation of eNOS via serine1176 phosphorylation. *Cardiovasc Res* 97: 33-43.
 186. Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Asanuma H, Node K, et al. (2001) Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: the role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation* 104: 705-710.
 187. Khaliulin I, Parker JE, Halestrap AP (2010) Consecutive pharmacological activation of PKA and PKC mimics the potent cardioprotection of temperature preconditioning. *Cardiovasc Res* 88: 324-333.
 188. Weerateerangkul P, Chattipakorn S, Chattipakorn N (2011) Roles of the nitric oxide signaling pathway in cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Monit* 17: RA44-52.

189. Queliconi BB, Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Kowaltowski AJ, Brookes PS (2011) Redox regulation of the mitochondrial K(ATP) channel in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1309-1315.
190. Rottlaender D, Boengler K, Wolny M, Schwaiger A, Motloch LJ, et al. (2012) Glycogen synthase kinase 3beta transfers cytoprotective signaling through connexin 43 onto mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E242-251.
191. Ishikawa S, Kuno A, Tanno M, Miki T, Kouzu H, et al. (2012) Role of connexin-43 in protective PI3K-Akt-GSK-3beta signaling in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H2536-2544.
192. Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marban E (2001) Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 89: 891-898.
193. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H649-657.
194. Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, Seetharaman S, Paucek P, et al. (2002) Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H284-295.
195. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 1404-1407.
196. Becker LB, vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT (1999) Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol* 277: H2240-2246.
197. Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT (2000) Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ Res* 86: 541-548.
198. Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP, Terzic A (2002) Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H531-539.

199. Haworth RA, Hunter DR (1979) The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys* 195: 460-467.
200. Crompton M, Virji S, Ward JM (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258: 729-735.
201. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1366: 79-94.
202. Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, Ward JM (1999) The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp* 66: 167-179.
203. Hausenloy DJ, Yellon DM (2003) The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 35: 339-341.
204. Hausenloy DJ, Yellon DM (2007) Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther* 116: 173-191.
205. Griffiths EJ, Halestrap AP (1993) Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 25: 1461-1469.
206. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, et al. (2005) Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 38: 367-374.
207. Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 7: 207-219.
208. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, et al. (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434: 652-658.
209. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, et al. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434: 658-662.
210. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, et al. (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 359: 473-481.

211. Kim JS, Ohshima S, Pediaditakis P, Lemasters JJ (2004) Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition- and pH-dependent cell death after reperfusion. *Free Radic Biol Med* 37: 1943-1950.
212. Costa AD, Pierre SV, Cohen MV, Downey JM, Garlid KD (2008) cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc Res* 77: 344-352.
213. Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L (1988) The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* 29: 245-271.
214. Bolanos-Garcia VM, Miguel RN (2003) On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 83: 47-68.
215. Reschly EJ, Sorci-Thomas MG, Davidson WS, Meredith SC, Reardon CA, et al. (2002) Apolipoprotein A-I alpha -helices 7 and 8 modulate high density lipoprotein subclass distribution. *J Biol Chem* 277: 9645-9654.
216. Li YJ, Wei YS, Fu XH, Hao DL, Xue Z, et al. (2008) The apolipoprotein CIII enhancer regulates both extensive histone modification and intergenic transcription of human apolipoprotein AI/CIII/AIV genes but not apolipoprotein AV. *J Biol Chem* 283: 28436-28444.
217. Frank PG, Marcel YL (2000) Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res* 41: 853-872.
218. Nolte RT, Atkinson D (1992) Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism. *Biophys J* 63: 1221-1239.
219. Thomas MJ, Bhat S, Sorci-Thomas MG (2008) Three-dimensional models of HDL apoA-I: implications for its assembly and function. *J Lipid Res* 49: 1875-1883.
220. Carnevale Schianca GP, Pedrazzoli R, Onolfo S, Colli E, Cornetti E, et al. (2011) ApoB/apoA-I ratio is better than LDL-C in detecting cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21: 406-411.
221. Raitakari OT, Makinen VP, McQueen MJ, Niemi J, Juonala M, et al. (2013) Computationally estimated apolipoproteins B and A1 in predicting cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 226: 245-251.

222. Ho AS, Cheng CC, Lee SC, Liu ML, Lee JY, et al. (2010) Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. *J Biomed Sci* 17: 58.
223. Mohamadkhani A, Jazii FR, Sayehmiri K, Jafari-Nejad S, Montaser-Kouhsari L, et al. (2011) Plasma myeloperoxidase activity and apolipoprotein A-1 expression in chronic hepatitis B patients. *Arch Iran Med* 14: 254-258.
224. Duverger N, Rader D, Ikewaki K, Nishiwaki M, Sakamoto T, et al. (1995) Characterization of high-density apolipoprotein particles A-I and A-I:A-II isolated from humans with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Eur J Biochem* 227: 123-129.
225. Schmidt HH, Gregg RE, Tietge UJ, Beisiegel U, Zech LA, et al. (1998) Upregulated synthesis of both apolipoprotein A-I and apolipoprotein B in familial hyperalphalipoproteinemia and hyperbetalipoproteinemia. *Metabolism* 47: 1160-1166.
226. Wilcox HG, Frank RA, Heimberg M (1991) Effects of thyroid status and fasting on hepatic metabolism of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 32: 395-405.
227. Fisher EA, Feig JE, Hewing B, Hazen SL, Smith JD (2012) High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 2813-2820.
228. Sorci-Thomas MG, Thomas MJ (2012) High density lipoprotein biogenesis, cholesterol efflux, and immune cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 2561-2565.
229. Zannis VI, Chroni A, Krieger M (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med (Berl)* 84: 276-294.
230. Cho KH, Jonas A (2000) A key point mutation (V156E) affects the structure and functions of human apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 275: 26821-26827.
231. Pownall HJ, Ehnholm C (2006) The unique role of apolipoprotein A-I in HDL remodeling and metabolism. *Curr Opin Lipidol* 17: 209-213.
232. Huang R, Silva RA, Jerome WG, Kontush A, Chapman MJ, et al. (2011) Apolipoprotein A-I structural organization in high-density lipoproteins isolated from human plasma. *Nat Struct Mol Biol* 18: 416-422.
233. Sevugan Chetty P, Mayne L, Kan ZY, Lund-Katz S, Englander SW, et al. (2012) Apolipoprotein A-I helical structure and stability in discoidal high-density lipoprotein (HDL) particles by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 11687-11692.

234. Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, Harvey SC, Liadaki KN, et al. (2000) Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 11: 105-115.
235. Fielding CJ, Fielding PE (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36: 211-228.
236. Zannis VI, Chroni A, Kypreos KE, Kan HY, Cesar TB, et al. (2004) Probing the pathways of chylomicron and HDL metabolism using adenovirus-mediated gene transfer. *Curr Opin Lipidol* 15: 151-166.
237. Santamarina-Fojo S, Lambert G, Hoeg JM, Brewer HB, Jr. (2000) Lecithin-cholesterol acyltransferase: role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11: 267-275.
238. Jonas A (2000) Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1529: 245-256.
239. Rye KA, Duong M, Psaltis MK, Curtiss LK, Bonnet DJ, et al. (2002) Evidence that phospholipids play a key role in pre-beta apoA-I formation and high-density lipoprotein remodeling. *Biochemistry* 41: 12538-12545.
240. Charles MA, Kane JP (2012) New molecular insights into CETP structure and function: a review. *J Lipid Res* 53: 1451-1458.
241. Thuren T (2000) Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol* 11: 277-283.
242. Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gambert P (1998) Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 9: 203-209.
243. Deckelbaum RJ, Eisenberg S, Oschry Y, Granot E, Sharon I, et al. (1986) Conversion of human plasma high density lipoprotein-2 to high density lipoprotein-3. Roles of neutral lipid exchange and triglyceride lipases. *J Biol Chem* 261: 5201-5208.
244. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, et al. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520.
245. Rhoads D, Brissette L (2004) The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 39-77.

246. Williams DL, Connelly MA, Temel RE, Swarnakar S, Phillips MC, et al. (1999) Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 10: 329-339.
247. Moestrup SK, Kozyraki R (2000) Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr Opin Lipidol* 11: 133-140.
248. Speer T, Zewinger S, Fliser D (2013) Uraemic dyslipidaemia revisited: role of high-density lipoprotein. *Nephrol Dial Transplant* 28: 2456-2463.
249. Kielar D, Dietmaier W, Langmann T, Aslanidis C, Probst M, et al. (2001) Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem* 47: 2089-2097.
250. Oram JF, Vaughan AM (2000) ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 11: 253-260.
251. Fitzgerald ML, Okuhira K, Short GF, 3rd, Manning JJ, Bell SA, et al. (2004) ATP-binding cassette transporter A1 contains a novel C-terminal VFNFA motif that is required for its cholesterol efflux and ApoA-I binding activities. *J Biol Chem* 279: 48477-48485.
252. Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR (2000) Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem* 275: 33053-33058.
253. Remaley AT, Stonik JA, Demosky SJ, Neufeld EB, Bocharov AV, et al. (2001) Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 818-823.
254. Lee JY, Parks JS (2005) ATP-binding cassette transporter A1 and its role in HDL formation. *Curr Opin Lipidol* 16: 19-25.
255. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, et al. (1999) Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 29-33.
256. Yamauchi Y, Hayashi M, Abe-Dohmae S, Yokoyama S (2003) Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly. *J Biol Chem* 278: 47890-47897.
257. Arakawa R, Hayashi M, Remaley AT, Brewer BH, Yamauchi Y, et al. (2004) Phosphorylation and stabilization of ATP binding cassette transporter A1 by synthetic amphiphilic helical peptides. *J Biol Chem* 279: 6217-6220.

258. Nagao K, Kimura Y, Mastuo M, Ueda K (2010) Lipid outward translocation by ABC proteins. *FEBS Lett* 584: 2717-2723.
259. Silver DL, Tall AR (2001) The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr Opin Lipidol* 12: 497-504.
260. Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, et al. (1997) Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem* 272: 13242-13249.
261. Krieger M (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 108: 793-797.
262. Liadaki KN, Liu T, Xu S, Ishida BY, Duchateaux PN, et al. (2000) Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. *J Biol Chem* 275: 21262-21271.
263. Trigatti B, Covey S, Rizvi A (2004) Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. *Biochem Soc Trans* 32: 116-120.
264. Cao G, Garcia CK, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL, et al. (1997) Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J Biol Chem* 272: 33068-33076.
265. Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S (2006) Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1758: 2016-2026.
266. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, et al. (2007) Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316: 295-298.
267. Tani M, Sano T, Ito M, Igarashi Y (2005) Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. *J Lipid Res* 46: 2458-2467.
268. Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, et al. (2008) Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res* 102: 669-676.

269. Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, et al. (2000) Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J* 352 Pt 3: 809-815.
270. Zhang B, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Miura S, et al. (2005) Correlation of high density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-phosphate with serum levels of HDL-cholesterol and apolipoproteins. *Atherosclerosis* 178: 199-205.
271. Hla T (2004) Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol* 15: 513-520.
272. Spiegel S, Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 397-407.
273. Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, et al. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54: 265-269.
274. Rosen H, Gonzalez-Cabrera PJ, Sanna MG, Brown S (2009) Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu Rev Biochem* 78: 743-768.
275. Rodriguez C, Gonzalez-Diez M, Badimon L, Martinez-Gonzalez J (2009) Sphingosine-1-phosphate: A bioactive lipid that confers high-density lipoprotein with vasculoprotection mediated by nitric oxide and prostacyclin. *Thromb Haemost* 101: 665-673.
276. Hayden MR, Clee SM, Brooks-Wilson A, Genest J, Jr., Attie A, et al. (2000) Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Curr Opin Lipidol* 11: 117-122.
277. Gu X, Lawrence R, Krieger M (2000) Dissociation of the high density lipoprotein and low density lipoprotein binding activities of murine scavenger receptor class B type I (mSR-BI) using retrovirus library-based activity dissection. *J Biol Chem* 275: 9120-9130.
278. Parathath S, Sahoo D, Darlington YF, Peng Y, Collins HL, et al. (2004) Glycine 420 near the C-terminal transmembrane domain of SR-BI is critical for proper delivery and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem* 279: 24976-24985.
279. Choi JW, Lee CW, Chun J (2008) Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim Biophys Acta* 1781: 531-539.

280. Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, et al. (2000) Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 106: 951-961.
281. Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, et al. (1997) The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res* 38: 191-205.
282. van den Bogaard B, Holleboom AG, Duivenvoorden R, Hutten BA, Kastelein JJ, et al. (2012) Patients with low HDL-cholesterol caused by mutations in LCAT have increased arterial stiffness. *Atherosclerosis* 225: 481-485.
283. Sorci-Thomas MG, Thomas MJ (2002) The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc Med* 12: 121-128.
284. Chetty PS, Ohshiro M, Saito H, Dhanasekaran P, Lund-Katz S, et al. (2012) Effects of the Iowa and Milano mutations on apolipoprotein A-I structure and dynamics determined by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Biochemistry* 51: 8993-9001.
285. Nichols WC, Dwulet FE, Liepnieks J, Benson MD (1988) Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 156: 762-768.
286. Bruckert E, von Eckardstein A, Funke H, Beucler I, Wiebusch H, et al. (1997) The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-I-Milano. *Atherosclerosis* 128: 121-128.
287. Weisgraber KH, Bersot TP, Mahley RW, Franceschini G, Sirtori CR (1980) A-I-milano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *J Clin Invest* 66: 901-907.
288. Matsunaga T, Hiasa Y, Yanagi H, Maeda T, Hattori N, et al. (1991) Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2793-2797.
289. Haase CL, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Kateifides AK, Kardassis D, et al. (2011) Mutation in APOA1 predicts increased risk of ischaemic heart disease and total mortality without low HDL cholesterol levels. *J Intern Med* 270: 136-146.

290. Bielicki JK, Oda MN (2002) Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 41: 2089-2096.
291. Shah PK, Yano J, Reyes O, Chyu KY, Kaul S, et al. (2001) High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation* 103: 3047-3050.
292. Igarashi J, Michel T (2000) Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae. eNOS activation by sphingosine 1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. *J Biol Chem* 275: 32363-32370.
293. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, et al. (2001) High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 7: 853-857.
294. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, et al. (2004) HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 113: 569-581.
295. Kimura T, Tomura H, Mogi C, Kuwabara A, Damirin A, et al. (2006) Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 281: 37457-37467.
296. Matsuo Y, Miura S, Kawamura A, Uehara Y, Rye KA, et al. (2007) Newly developed reconstituted high-density lipoprotein containing sphingosine-1-phosphate induces endothelial tube formation. *Atherosclerosis* 194: 159-168.
297. Assanasen C, Mineo C, Seetharam D, Yuhanna IS, Marcel YL, et al. (2005) Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J Clin Invest* 115: 969-977.
298. Drew BG, Fidge NH, Gallon-Beaumier G, Kemp BE, Kingwell BA (2004) High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6999-7004.
299. Kimura T, Tomura H, Mogi C, Kuwabara A, Ishiwara M, et al. (2006) Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory

- signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Cell Signal* 18: 841-850.
300. Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW (2003) High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem* 278: 9142-9149.
301. Brewer HB, Jr. (2011) Clinical review: The evolving role of HDL in the treatment of high-risk patients with cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 1246-1257.
302. Tolle M, Levkau B, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, et al. (2005) Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ Res* 96: 913-920.
303. Levkau B, Hermann S, Theilmeyer G, van der Giet M, Chun J, et al. (2004) High-density lipoprotein stimulates myocardial perfusion in vivo. *Circulation* 110: 3355-3359.
304. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW (2006) Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 98: 1352-1364.
305. Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, Yarwood H, Miller NE, et al. (1999) High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 910-917.
306. Norata GD, Banfi C, Pirillo A, Tremoli E, Hamsten A, et al. (2004) Oxidised-HDL3 induces the expression of PAI-1 in human endothelial cells. Role of p38MAPK activation and mRNA stabilization. *Br J Haematol* 127: 97-104.
307. Vinals M, Martinez-Gonzalez J, Badimon L (1999) Regulatory effects of HDL on smooth muscle cell prostacyclin release. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2405-2411.
308. Gonzalez-Diez M, Rodriguez C, Badimon L, Martinez-Gonzalez J (2008) Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin. *Thromb Haemost* 100: 119-126.
309. Escudero I, Martinez-Gonzalez J, Alonso R, Mata P, Badimon L (2003) Experimental and interventional dietary study in humans on the role of HDL fatty acid composition in PGI₂ release and Cox-2 expression by VSMC. *Eur J Clin Invest* 33: 779-786.
310. Liu D, Ji L, Tong X, Pan B, Han JY, et al. (2011) Human apolipoprotein A-I induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I-2 release in

- endothelial cells through ATP-binding cassette transporter A1. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C739-748.
311. Zhang QH, Zu XY, Cao RX, Liu JH, Mo ZC, et al. (2012) An involvement of SR-B1 mediated PI3K-Akt-eNOS signaling in HDL-induced cyclooxygenase 2 expression and prostacyclin production in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 420: 17-23.
312. Shakhov Y, Larrue J, Perova N, Dorian B, Daret D, et al. (1989) Prostacyclin-mediated effect of high density lipoproteins as cellular cholesterol acceptors on aortic smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 21: 461-468.
313. Spieker LE, Sudano I, Hurlimann D, Lerch PG, Lang MG, et al. (2002) High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 105: 1399-1402.
314. Basisoendial RJ, Hovingh GK, Levels JH, Lerch PG, Andresen I, et al. (2003) Restoration of endothelial function by increasing high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. *Circulation* 107: 2944-2948.
315. Naqvi TZ, Shah PK, Ivey PA, Molloy MD, Thomas AM, et al. (1999) Evidence that high-density lipoprotein cholesterol is an independent predictor of acute platelet-dependent thrombus formation. *Am J Cardiol* 84: 1011-1017.
316. Li D, Weng S, Yang B, Zander DS, Saldeen T, et al. (1999) Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 378-383.
317. Lerch PG, Spycher MO, Doran JE (1998) Reconstituted high density lipoprotein (rHDL) modulates platelet activity in vitro and ex vivo. *Thromb Haemost* 80: 316-320.
318. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, et al. (2004) Roles of thromboxane A₂ and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 114: 784-794.
319. O'Connell BJ, Genest J, Jr. (2001) High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 104: 1978-1983.
320. Nicholls SJ, Cutri B, Worthley SG, Kee P, Rye KA, et al. (2005) Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2416-2421.
321. MacCallum PK, Cooper JA, Martin J, Howarth DJ, Meade TW, et al. (2000) Haemostatic and lipid determinants of prothrombin fragment F1.2 and D-dimer in plasma. *Thromb Haemost* 83: 421-426.

322. Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernandez JA (1999) High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest* 103: 219-227.
323. Deguchi H, Yegneswaran S, Griffin JH (2004) Sphingolipids as bioactive regulators of thrombin generation. *J Biol Chem* 279: 12036-12042.
324. Deguchi H, Fernandez JA, Griffin JH (2002) Neutral glycosphingolipid-dependent inactivation of coagulation factor Va by activated protein C and protein S. *J Biol Chem* 277: 8861-8865.
325. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL (2004) Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 109: IV6-19.
326. Eren M, Painter CA, Atkinson JB, Declerck PJ, Vaughan DE (2002) Age-dependent spontaneous coronary arterial thrombosis in transgenic mice that express a stable form of human plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* 106: 491-496.
327. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Barboriak JJ, Anderson AJ, et al. (1998) Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1046-1053.
328. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, et al. (2005) Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2185-2191.
329. Pajkrt D, Lerch PG, van der Poll T, Levi M, Illi M, et al. (1997) Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia. *Thromb Haemost* 77: 303-307.
330. Dimmeler S, Haendeler J, Zeiher AM (2002) Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol* 13: 531-536.
331. Sugano M, Tsuchida K, Makino N (2000) High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 872-876.
332. Suc I, Escargueil-Blanc I, Trolly M, Salvayre R, Negre-Salvayre A (1997) HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2158-2166.

333. Kimura T, Sato K, Kuwabara A, Tomura H, Ishiwara M, et al. (2001) Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 31780-31785.
334. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, et al. (2001) Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem* 276: 34480-34485.
335. Kimura T, Sato K, Malchinkhuu E, Tomura H, Tamama K, et al. (2003) High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1283-1288.
336. Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, et al. (2001) Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem* 276: 10627-10633.
337. Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Negre-Salvayre A, et al. (2007) Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1843-1849.
338. Kruger AL, Peterson S, Turkseven S, Kaminski PM, Zhang FF, et al. (2005) D-4F induces heme oxygenase-1 and extracellular superoxide dismutase, decreases endothelial cell sloughing, and improves vascular reactivity in rat model of diabetes. *Circulation* 111: 3126-3134.
339. Tauber JP, Cheng J, Gospodarowicz D (1980) Effect of high and low density lipoproteins on proliferation of cultured bovine vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 66: 696-708.
340. Murugesan G, Sa G, Fox PL (1994) High-density lipoprotein stimulates endothelial cell movement by a mechanism distinct from basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 74: 1149-1156.
341. Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, et al. (2000) Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J* 348 Pt 1: 71-76.
342. Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Seeger F, Aicher A, et al. (2007) Sphingosine-1-phosphate stimulates the functional capacity of progenitor cells

- by activation of the CXCR4-dependent signaling pathway via the S1P3 receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 275-282.
343. Seetharam D, Mineo C, Gormley AK, Gibson LL, Vongpatanasin W, et al. (2006) High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res* 98: 63-72.
344. Miura S, Fujino M, Matsuo Y, Kawamura A, Tanigawa H, et al. (2003) High density lipoprotein-induced angiogenesis requires the activation of Ras/MAP kinase in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 802-808.
345. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, et al. (1999) Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99: 301-312.
346. Rikitake Y, Hirata K, Kawashima S, Ozaki M, Takahashi T, et al. (2002) Involvement of endothelial nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 108-114.
347. Kothapalli D, Fuki I, Ali K, Stewart SA, Zhao L, et al. (2004) Antimitogenic effects of HDL and APOE mediated by Cox-2-dependent IP activation. *J Clin Invest* 113: 609-618.
348. Tolle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, et al. (2008) HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1542-1548.
349. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, et al. (2004) Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 95: 764-772.
350. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ (1995) High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1987-1994.
351. Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness M (2004) Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 680-683.
352. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, et al. (1991) Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 88: 2039-2046.

353. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ (1999) Ability of reconstituted high density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *J Lipid Res* 40: 345-353.
354. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, De Palma A, Saresella M, et al. (1997) Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 61-65.
355. Park SH, Park JH, Kang JS, Kang YH (2003) Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 168-182.
356. Wadham C, Albanese N, Roberts J, Wang L, Bagley CJ, et al. (2004) High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation* 109: 2116-2122.
357. Schmidt A, Geigenmuller S, Volker W, Buddecke E (2006) The antiatherogenic and antiinflammatory effect of HDL-associated lysosphingolipids operates via Akt -->NF-kappaB signalling pathways in human vascular endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 101: 109-116.
358. Nofer JR, Geigenmuller S, Gopfert C, Assmann G, Buddecke E, et al. (2003) High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 98-103.
359. Whetzel AM, Bolick DT, Srinivasan S, Macdonald TL, Morris MA, et al. (2006) Sphingosine-1 phosphate prevents monocyte/endothelial interactions in type 1 diabetic NOD mice through activation of the S1P1 receptor. *Circ Res* 99: 731-739.
360. Aoki S, Yatomi Y, Shimosawa T, Yamashita H, Kitayama J, et al. (2007) The suppressive effect of sphingosine 1-phosphate on monocyte-endothelium adhesion may be mediated by the rearrangement of the endothelial integrins alpha(5)beta(1) and alpha(v)beta(3). *J Thromb Haemost* 5: 1292-1301.
361. Shimamura K, Takashiro Y, Akiyama N, Hirabayashi T, Murayama T (2004) Expression of adhesion molecules by sphingosine 1-phosphate and histamine in endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 486: 141-150.
362. Theilmeier G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schafers M, et al. (2006) High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly

- protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation* 114: 1403-1409.
363. Matsunaga T, Hokari S, Koyama I, Harada T, Komoda T (2003) NF-kappa B activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 313-319.
364. Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach MF, et al. (2003) HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J* 17: 743-745.
365. Theilmeier G, De Geest B, Van Veldhoven PP, Stengel D, Michiels C, et al. (2000) HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice. *FASEB J* 14: 2032-2039.
366. Rong JX, Li J, Reis ED, Choudhury RP, Dansky HM, et al. (2001) Elevating high-density lipoprotein cholesterol in apolipoprotein E-deficient mice remodels advanced atherosclerotic lesions by decreasing macrophage and increasing smooth muscle cell content. *Circulation* 104: 2447-2452.
367. Puranik R, Bao S, Nobecourt E, Nicholls SJ, Dusting GJ, et al. (2008) Low dose apolipoprotein A-I rescues carotid arteries from inflammation in vivo. *Atherosclerosis* 196: 240-247.
368. Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL, Ibrahim R, Lesperance J, et al. (2007) Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 297: 1675-1682.
369. Shaw JA, Bobik A, Murphy A, Kanellakis P, Blombery P, et al. (2008) Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ Res* 103: 1084-1091.
370. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, et al. (2003) Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 290: 2292-2300.
371. von Eckardstein A (2004) Therapeutic approaches for the modification of high-density lipoproteins. *Drug Discov Today*.
372. Simons K, Gerl MJ (2010) Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 688-699.
373. Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13: 816-825.

374. Anderson HA, Hiltbold EM, Roche PA (2000) Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat Immunol* 1: 156-162.
375. Zidovetzki R, Levitan I (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1311-1324.
376. Wang SH, Yuan SG, Peng DQ, Zhao SP (2012) HDL and ApoA-I inhibit antigen presentation-mediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells. *Atherosclerosis* 225: 105-114.
377. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, Kohno T, Edwards CK, 3rd, et al. (2001) Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 97: 2381-2389.
378. Umemoto T, Han CY, Mitra P, Averill MM, Tang C, et al. (2013) Apolipoprotein AI and high-density lipoprotein have anti-inflammatory effects on adipocytes via cholesterol transporters: ATP-binding cassette A-1, ATP-binding cassette G-1, and scavenger receptor B-1. *Circ Res* 112: 1345-1354.
379. Yvan-Charvet L, Ranalletta M, Wang N, Han S, Terasaka N, et al. (2007) Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 117: 3900-3908.
380. Diederich W, Orso E, Drobnik W, Schmitz G (2001) Apolipoprotein AI and HDL(3) inhibit spreading of primary human monocytes through a mechanism that involves cholesterol depletion and regulation of CDC42. *Atherosclerosis* 159: 313-324.
381. Duong CQ, Bared SM, Abu-Khader A, Buechler C, Schmitz A, et al. (2004) Expression of the lysophospholipid receptor family and investigation of lysophospholipid-mediated responses in human macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1682: 112-119.
382. Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, et al. (2004) Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 1245-1251.
383. Nofer JR, Bot M, Brodde M, Taylor PJ, Salm P, et al. (2007) FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 115: 501-508.

384. Keul P, Tolle M, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, et al. (2007) The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 607-613.
385. Hughes JE, Srinivasan S, Lynch KR, Proia RL, Ferdek P, et al. (2008) Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res* 102: 950-958.
386. Duenas AI, Aceves M, Fernandez-Pisonero I, Gomez C, Orduna A, et al. (2008) Selective attenuation of Toll-like receptor 2 signalling may explain the atheroprotective effect of sphingosine 1-phosphate. *Cardiovasc Res* 79: 537-544.
387. Suzuki M, Pritchard DK, Becker L, Hoofnagle AN, Tanimura N, et al. (2010) High-density lipoprotein suppresses the type I interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. *Circulation* 122: 1919-1927.
388. Mogilenko DA, Orlov SV, Trulioff AS, Ivanov AV, Nagumanov VK, et al. (2012) Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages. *FASEB J* 26: 2019-2030.
389. Yin K, Chen WJ, Zhou ZG, Zhao GJ, Lv YC, et al. (2012) Apolipoprotein A-I inhibits CD40 proinflammatory signaling via ATP-binding cassette transporter A1-mediated modulation of lipid raft in macrophages. *J Atheroscler Thromb* 19: 823-836.
390. van Loo G, Beyaert R (2011) Negative regulation of NF-kappaB and its involvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 13: 221.
391. Cheng AM, Handa P, Tateya S, Schwartz J, Tang C, et al. (2012) Apolipoprotein A-I attenuates palmitate-mediated NF-kappaB activation by reducing Toll-like receptor-4 recruitment into lipid rafts. *PLoS One* 7: e33917.
392. Zabalawi M, Bhat S, Loughlin T, Thomas MJ, Alexander E, et al. (2003) Induction of fatal inflammation in LDL receptor and ApoA-I double-knockout mice fed dietary fat and cholesterol. *Am J Pathol* 163: 1201-1213.
393. Zabalawi M, Bharadwaj M, Horton H, Cline M, Willingham M, et al. (2007) Inflammation and skin cholesterol in LDLr^{-/-}, apoA-I^{-/-} mice: link between cholesterol homeostasis and self-tolerance? *J Lipid Res* 48: 52-65.

394. Wilhelm AJ, Zabalawi M, Grayson JM, Weant AE, Major AS, et al. (2009) Apolipoprotein A-I and its role in lymphocyte cholesterol homeostasis and autoimmunity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 843-849.
395. Wilhelm AJ, Zabalawi M, Owen JS, Shah D, Grayson JM, et al. (2010) Apolipoprotein A-I modulates regulatory T cells in autoimmune LDLr^{-/-}, ApoA-I^{-/-} mice. *J Biol Chem* 285: 36158-36169.
396. Mineo C, Shaul PW (2012) Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. *Circ Res* 111: 1079-1090.
397. Bellosta S, Gomaschi M, Canavesi M, Rossoni G, Monetti M, et al. (2006) Inhibition of MMP-2 activation and release as a novel mechanism for HDL-induced cardioprotection. *FEBS Lett* 580: 5974-5978.
398. Calabresi L, Rossoni G, Gomaschi M, Sisto F, Berti F, et al. (2003) High-density lipoproteins protect isolated rat hearts from ischemia-reperfusion injury by reducing cardiac tumor necrosis factor- α content and enhancing prostaglandin release. *Circ Res* 92: 330-337.
399. Marchesi M, Booth EA, Davis T, Bisgaier CL, Lucchesi BR (2004) Apolipoprotein A-IMilano and 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine complex (ETC-216) protects the in vivo rabbit heart from regional ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 1023-1031.
400. Marchesi M, Booth EA, Rossoni G, Garcia RA, Hill KR, et al. (2008) Apolipoprotein A-IMilano/POPC complex attenuates post-ischemic ventricular dysfunction in the isolated rabbit heart. *Atherosclerosis* 197: 572-578.
401. Rossoni G, Gomaschi M, Berti F, Sirtori CR, Franceschini G, et al. (2004) Synthetic high-density lipoproteins exert cardioprotective effects in myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 79-84.
402. Kiya Y, Miura S, Imaizumi S, Uehara Y, Matsuo Y, et al. (2009) Reconstituted high-density lipoprotein attenuates postinfarction left ventricular remodeling in rats. *Atherosclerosis* 203: 137-144.
403. Imaizumi S, Miura S, Nakamura K, Kiya Y, Uehara Y, et al. (2008) Antiarrhythmogenic effect of reconstituted high-density lipoprotein against ischemia/reperfusion in rats. *J Am Coll Cardiol* 51: 1604-1612.
404. Gu SS, Shi N, Wu MP (2007) The protective effect of ApolipoproteinA-I on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci* 81: 702-709.

405. Cuzzocrea S, Dugo L, Patel NS, Di Paola R, Cockerill GW, et al. (2004) High-density lipoproteins reduce the intestinal damage associated with ischemia/reperfusion and colitis. *Shock* 21: 342-351.
406. Shi N, Wu MP (2008) Apolipoprotein A-I attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Biomed Sci* 15: 577-583.
407. Thiemermann C, Patel NS, Kvale EO, Cockerill GW, Brown PA, et al. (2003) High density lipoprotein (HDL) reduces renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 14: 1833-1843.
408. Jin ZQ, Zhou HZ, Zhu P, Honbo N, Mochly-Rosen D, et al. (2002) Cardioprotection mediated by sphingosine-1-phosphate and ganglioside GM-1 in wild-type and PKC epsilon knockout mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1970-1977.
409. Lecour S, Smith RM, Woodward B, Opie LH, Rochette L, et al. (2002) Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 34: 509-518.
410. Morel S, Frias MA, Rosker C, James RW, Rohr S, et al. (2012) The natural cardioprotective particle HDL modulates connexin43 gap junction channels. *Cardiovasc Res* 93: 41-49.
411. Jin ZQ, Karliner JS, Vessey DA (2008) Ischaemic postconditioning protects isolated mouse hearts against ischaemia/reperfusion injury via sphingosine kinase isoform-1 activation. *Cardiovasc Res* 79: 134-140.
412. Vessey DA, Li L, Honbo N, Karliner JS (2009) Sphingosine 1-phosphate is an important endogenous cardioprotectant released by ischemic pre- and postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1429-1435.
413. Jin ZQ, Goetzl EJ, Karliner JS (2004) Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation* 110: 1980-1989.
414. Vessey DA, Li L, Jin ZQ, Kelley M, Honbo N, et al. (2011) A sphingosine kinase form 2 knockout sensitizes mouse myocardium to ischemia/reoxygenation injury and diminishes responsiveness to ischemic preconditioning. *Oxid Med Cell Longev* 2011: 961059.
415. Means CK, Xiao CY, Li Z, Zhang T, Omens JH, et al. (2007) Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2944-2951.

416. Zhang J, Honbo N, Goetzl EJ, Chatterjee K, Karliner JS, et al. (2007) Signals from type 1 sphingosine 1-phosphate receptors enhance adult mouse cardiac myocyte survival during hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3150-3158.
417. Karliner JS, Honbo N, Summers K, Gray MO, Goetzl EJ (2001) The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1713-1717.
418. Tao R, Zhang J, Vessey DA, Honbo N, Karliner JS (2007) Deletion of the sphingosine kinase-1 gene influences cell fate during hypoxia and glucose deprivation in adult mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 74: 56-63.
419. Tao R, Hoover HE, Honbo N, Kalinowski M, Alano CC, et al. (2010) High-density lipoprotein determines adult mouse cardiomyocyte fate after hypoxia-reoxygenation through lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1022-1028.
420. Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW (2010) Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. *Cardiovasc Res* 85: 118-126.
421. Frias MA SS, Lacerda L, James RW, Lecour S (2010) HDL protects against lethal reperfusion injury via the SAFE pathway. *SA Heart J* 7: 202.
422. Frias MA, Pedretti S, Hacking D, Somers S, Lacerda L, et al. (2013) HDL protects against ischemia reperfusion injury by preserving mitochondrial integrity. *Atherosclerosis* 228: 110-116.
423. Somers SJ, Frias M, Lacerda L, Opie LH, Lecour S (2012) Interplay between SAFE and RISK pathways in sphingosine-1-phosphate-induced cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther* 26: 227-237.
424. Hacking D KR, Yellon DM, Opie LH, Hausenloy DJ, Lecour S (2010) Sphingosine-1 phosphate mediates cardioprotection by modulation. *SA Heart J* 7: 203.
425. Ni YG, Berenji K, Wang N, Oh M, Sachan N, et al. (2006) Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling. *Circulation* 114: 1159-1168.
426. Ozog MA, Bernier SM, Bates DC, Chatterjee B, Lo CW, et al. (2004) The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the Janus

- tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Mol Biol Cell* 15: 4761-4774.
427. Fan G, Molstad M, Braziel RM, Standley M, Huang J, et al. (2005) Proteomic profiling of mature CD10+ B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 124: 920-929.
 428. Fertin M, Burdese J, Beseme O, Amouyel P, Bauters C, et al. (2011) Strategy for purification and mass spectrometry identification of SELDI peaks corresponding to low-abundance plasma and serum proteins. *J Proteomics* 74: 420-430.
 429. Vandenbrouck YG, J. Jaquinod, M. Bruley C. (2005) Protéomique : analyse des données issues des spectromètres de masse. *Biofutur* 252: 29-31.
 430. Fertin M, Beseme O, Duban S, Amouyel P, Bauters C, et al. (2010) Deep plasma proteomic analysis of patients with left ventricular remodeling after a first myocardial infarction. *Proteomics Clin Appl* 4: 654-673.
 431. Pinet F, Beseme O, Cieniewski-Bernard C, Drobecq H, Jourdain S, et al. (2008) Predicting left ventricular remodeling after a first myocardial infarction by plasma proteome analysis. *Proteomics* 8: 1798-1808.
 432. Grall S, Prunier-Mirebeau D, Tamareille S, Mateus V, Lamon D, et al. (2013) Endoplasmic reticulum stress pathway involvement in local and remote myocardial ischemic conditioning. *Shock* 39: 433-439.
 433. Beseme O, Fertin M, Drobecq H, Amouyel P, Pinet F (2010) Combinatorial peptide ligand library plasma treatment: Advantages for accessing low-abundance proteins. *Electrophoresis* 31: 2697-2704.
 434. Haas MJ, Mazza AD, Wong NC, Mooradian AD (2012) Inhibition of apolipoprotein A-I gene expression by obesity-associated endocannabinoids. *Obesity (Silver Spring)* 20: 721-729.
 435. Zheng XL, Wong NC (2006) Cyclosporin A inhibits apolipoprotein AI gene expression. *J Mol Endocrinol* 37: 367-373.
 436. Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ (1995) The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 359: 133-136.
 437. Salvatore A, Cigliano L, Bucci EM, Corpillo D, Velasco S, et al. (2007) Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyl-transferase. *Biochemistry* 46: 11158-11168.

438. Sousa MM, Berglund L, Saraiva MJ (2000) Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 41: 58-65.
439. Borish L, King MS, Mascali JJ, Johnson S, Coll B, et al. (1992) Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production. *Inflammation* 16: 471-484.
440. Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Mersmann J, Zacharowski PA, et al. (2007) The fibrin-derived peptide Bbeta15-42 is cardioprotective in a pig model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 35: 1730-1735.
441. Petzelbauer P, Zacharowski PA, Miyazaki Y, Friedl P, Wickenhauser G, et al. (2005) The fibrin-derived peptide Bbeta15-42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. *Nat Med* 11: 298-304.
442. Tamareille S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croue A, et al. (2009) Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H2035-2043.
443. Hausenloy DJ, Yellon DM (2008) Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 79: 377-386.
444. Cai ZP, Parajuli N, Zheng X, Becker L (2012) Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10. *Basic Res Cardiol* 107: 277.
445. Davidson SM, Selvaraj P, He D, Boi-Doku C, Yellon RL, et al. (2013) Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1alpha/CXCR4 signalling axis. *Basic Res Cardiol* 108: 377.
446. Jeanneteau J, Hibert P, Martinez MC, Tual-Chalot S, Tamareille S, et al. (2012) Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303: H871-877.
447. Wang X, Zhu H, Zhang X, Liu Y, Chen J, et al. (2012) Loss of the miR-144/451 cluster impairs ischaemic preconditioning-mediated cardioprotection by targeting Rac-1. *Cardiovasc Res* 94: 379-390.
448. Aurora AB, Mahmoud AI, Luo X, Johnson BA, van Rooij E, et al. (2012) MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca(2)(+) overload and cell death. *J Clin Invest* 122: 1222-1232.
449. Xu CF, Yu CH, Li YM (2009) Regulation of hepatic microRNA expression in response to ischemic preconditioning following ischemia/reperfusion injury in mice. *OMICS* 13: 513-520.

450. Jensen RV, Stottrup NB, Kristiansen SB, Botker HE (2012) Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Res Cardiol* 107: 285.

Thèse de Doctorat

Pierre HIBERT

Recherche de facteurs circulants impliqués dans la cardioprotection ischémique à distance par une approche protéomique

Identification of circulating factors involved in remote ischemic cardioprotection by a proteomic approach

Résumé

La désobstruction coronaire précoce améliore considérablement le pronostic des patients atteints d'infarctus du myocarde, mais elle est à l'origine de lésions myocardiques irréversibles. Une technique simple et efficace pour lutter contre ces lésions de reperfusion est le préconditionnement ischémique à distance (RIPreC). De nombreuses études suggèrent un rôle majeur des facteurs humoraux transportés par la circulation, dans la cardioprotection induite par le RIPreC, mais leurs identités restent encore inconnues. L'objectif de notre travail était donc d'identifier un ou des facteurs circulants du RIPreC. Dans la première partie de l'étude nous avons réalisé une analyse protéomique SELDI-TOF-MS sur des plasmas de rats. Nous avons ainsi démontré que le RIPreC était responsable de nombreuses modifications du protéome plasmatique. Dans l'ensemble les protéines identifiées étaient cohérentes avec un rôle protecteur du RIPreC. Certaines sont en effet impliquées dans la réponse anti-oxydative, la réparation tissulaire ou encore l'anti-inflammation. Les données de la littérature rapportant des propriétés de cytoprotection dans un contexte d'ischémie-reperfusion, l'apolipoprotéine A-I (ApoA-I), augmentée suite au RIPreC, était une bonne candidate pour être un facteur circulant du RIPreC. La seconde partie du projet consistait à valider *in vivo* l'action bénéfique de cette protéine, dans un modèle d'infarctus du myocarde. L'ApoA-I, injectée avant l'ischémie myocardique, était capable de réduire la taille de l'infarctus. Nous avons ainsi confirmé que le RIPreC était responsable de modifications significatives du protéome plasmatique *in vivo*, et en particulier de l'augmentation de l'ApoA-I. Cette protéine était capable d'induire une cardioprotection lorsqu'elle est injectée avant l'ischémie myocardique. L'ApoA-I pourrait donc être un facteur circulant impliqué dans le RIPreC.

Mots clés

Infarctus du myocarde, cardioprotection, préconditionnement ischémique à distance, protéomique, apolipoprotéine A-I

Abstract

Early reperfusion of occluded coronary artery significantly improves outcomes in patients with myocardial infarction. Unfortunately, this reperfusion can be the cause of irreversible myocardial damage, called reperfusion injuries. Remote ischemic preconditioning (RIPreC) is a simple and attractive strategy to reduce these myocardial injuries. Despite convincing evidence of the critical role played by circulating humoral mediators in RIPreC-induced cardioprotection, their actual identities remain unknown. Therefore, in this study we aimed to identify RIPreC-induced humoral mediators. In the first part of the study, we performed a proteomic analysis on rat plasma using SELDI-TOF-MS technique. We thus related RIPreC to highly proteomic modulation. Overall, the proteins identified were in accordance with a protective role of RIPreC. Some of them play a role in anti-oxidative stress, tissue repair, and anti-inflammatory process. In particular, apolipoprotein A-I (ApoA-I), significantly increased in rat plasma following RIPreC stimulus, has strong cytoprotective effects against ischemia-reperfusion injury. It could then be a potential blood-borne factor of RIPreC. In the second part of the study we tried to demonstrate the cardioprotective properties of ApoA-I in a myocardial infarction model *in vivo*. ApoA-I injected before myocardial ischemia in rats significantly reduced myocardial infarct size. Taken together, our data indicated that RIPreC induces significant modifications of plasmatic proteome *in vivo*, notably ApoA-I increase. Furthermore, ApoA-I injection before myocardial ischemia-reperfusion was able to recapitulate RIPreC-induced cardioprotection. ApoA-I may then be a protective blood-borne factor involved in the RIPreC mechanism.

Key Words

Myocardial infarction, cardioprotection, remote ischemic preconditioning, proteomic, apolipoprotein A-I