

UNIVERSITÉ VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2

Année 2010

Thèse n°1759

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé
Option : Biologie cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement
le 15 décembre 2010

par **François VIGNERON**

ÉTUDE DE LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DE LA
CARDIOPROTECTION VIS-À-VIS DES LÉSIONS D'ISCHÉMIE-
REPERFUSION

IMPLICATION DE GSK-3 β , DE LA VOIE WNT ET DE
LA VOIE MTOR

Travail réalisé au sein de l'unité INSERM U828 – Adaptation Cardiovasculaire à l'ischémie

Membres du Jury :

Pr Jean-Pierre SAVINEAU	Université Bordeaux 2	Président
Dr Anne GARNIER	INSERM Châtenay-Malabry	Rapporteur
Pr Christophe PIOT	Université de médecine Montpellier	Rapporteur
Pr Alain BERDEAUX	Université Paris-Est	Examineur
Pr Laurent BARANDON	Université Bordeaux 2	Examineur
Pr Pierre DOS SANTOS	Université Bordeaux 2	Directeur

À ma famille.

Remerciements

Je tiens à remercier le président du jury, les rapporteurs et les examinateurs d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Pierre, pour toute la confiance qu'il a toujours eue en moi, mais aussi pour ses connaissances très approfondies en physiologie et bioénergétique cardiaques, ainsi que sur les mécanismes de l'ischémie-reperfusion et du préconditionnement. Merci également pour tous les groupes de musique que tu m'as fait découvrir (mais je reste quand même convaincu que Thom Yorke se prend trop la tête).

Je tiens également à remercier tous les membres de l'unité 828, ex 441, pour leur accueil et leur gentillesse, il y a déjà quelques années, quand je suis arrivé pour mon stage de Master I, qui s'est prolongé en Master II et enfin en thèse. C'était la première fois que j'entrais dans un laboratoire autre que pâtisseries et j'en garde un excellent souvenir.

Je souhaiterais remercier plus particulièrement :

Béatrice, qui m'a encadré depuis le début et que je n'ai jamais réussi à tutoyer. Merci énormément pour tout ce que vous avez fait pour moi et pour tout le temps que vous m'avez consacré, que ce soit pour des manips de western blot capricieuses, des montages de Langendorff hasardeux, des tampons de transfert douteux qui tournent au jaune pendant la nuit, des confirmations de géotypages de souris inconnues, mais aussi pour toutes les pistes, les réflexions, les conseils, les astuces, ... lorsque l'on était dans le bureau (et également pour les cafés qui ont coulé à flot. Un jour, promis, j'apprends à faire un café qui ne ressemble pas à de l'eau miliQ). Merci également de m'avoir tenu compagnie 4j/5 dans ce bureau glacial l'hiver et brûlant l'été. Merci énormément.

Liliane, qui m'a tout appris sur les souris et qui a réussi à me faire passer mon aversion pour la dissection. Merci de m'avoir montré comment attraper les souris, sans se faire mordre à la gorge toutes les 5 minutes ; de m'avoir appris à canuler sans perdre de temps et en évitant les fuites ; de m'avoir montré comment refaire un ballonnet (et surtout, le conserver dans l'eau entre chaque manips pour éviter qu'il ne s'assèche) ; de m'avoir appris à me servir de notre vieux pH-mètre, qui plante tout

Remerciements

le temps. Merci beaucoup pour tous les cœurs que vous avez perfusés et qui m'ont servi pour ce travail. Merci également pour toutes les anecdotes que vous m'avez raconté.

Marilyne, qui a repris le travail de Liliane, et qui en peu de temps est rapidement devenue indispensable de par son savoir faire et sa gentillesse. Merci pour toutes ces préparations de Krebs dès l'aube et pour tous ces cœurs perfusés. Merci aussi d'avoir passé une semaine avec moi à revoir toutes les feuilles excel des perfusions, pour au final, remarquer que ça n'a servi à rien.

Sandrine, pour son expérience et sa bonne humeur, mais aussi pour toutes les anecdotes hilarantes entre deux perfusions.

Bertrand et Philippe, qui m'ont fait découvrir le monde fabuleux de la perfusion, des in vivo de cochons et des oxymètres.

Annabel et Catherine, qui ont eu la gentillesse de m'apprendre à faire des PCR et qui ont supporté toutes mes erreurs de manips.

Cécile, Pascale, Thierry et Jean-Marie, pour les réunions du lundi, qui m'ont obligé à mettre à jour mes résultats toutes les semaines et m'ont permis de m'améliorer en powerpoint. Je tiens à remercier plus particulièrement Cécile pour toutes ses connaissances sur la voie Wnt et pour toutes ses idées qui ont enrichi mon travail.

Nancy et Betty, pour leur gentillesse et leurs conseils, mais aussi pour avoir assisté aux réunions du lundi et ainsi m'éviter de passer à l'oral toutes les semaines.

Simone, pour tous ses conseils et sa gentillesse sans limite. Merci aussi de m'avoir fait voyager à travers vos superbes albums photos.

Jérôme, qui s'est occupé des souris et leur a fourni eau, nourriture et amour ad libitum.

Je remercie également les FDR, et plus particulièrement Sylvain et Fred, toujours partants pour nos délires photographiques.

Je tiens enfin à remercier ma famille, sans qui je ne serai pas là, mais aussi ma nouvelle famille de Razimet.

Je remercie du fond du cœur ma Sylvie, pour m'avoir supporté et aidé pendant ces 3 années.

Table des Matières

Remerciements	V
Table des Matières	ix
Liste des Figures	xv
Liste des Tableaux	xvi
Abréviations	xix
PRÉAMBULE	- 1 -
Liste des Communications	- 7 -
PREMIÈRE PARTIE	- 11 -
INTRODUCTION.....	- 11 -
I-Physiopathologie de l'Ischémie-Reperfusion Myocardique	- 13 -
Sommaire	- 13 -
I.1- Hypoxie et ischémie	- 15 -
I.1.a- Hypoxie physiologique	- 15 -
I.1.a.α- Hypoxie physiologique lors du développement et de la différenciation cellulaire ..	- 15 -
-	
I.1.a.β- Hypoxie physiologique d'adaptation.....	- 16 -
I.1.b- Hypoxie pathologique.....	- 17 -
I.1.b.α- Hypoxie pathologique d'adaptation	- 17 -
I.1.b.β- L'hypoxie par réduction princeps de la perfusion. Le cas de l'athérosclérose coronaire et de l'ischémie myocardique.	- 19 -
I.2- Perturbations myocardiques induites par l'ischémie-reperfusion	- 20 -
I.2.a- Préambule.....	- 20 -
I.2.b- Métabolisme énergétique du myocarde.....	- 21 -
I.2.b.α- Métabolisme énergétique du myocarde en conditions normoxiques	- 21 -
I.2.b.α.I- Généralités	- 21 -
I.2.b.α.II- L'utilisation de substrats énergétiques.....	- 23 -
I.2.b.α.III- La phosphorylation oxydative	- 24 -
I.2.b.α.IV- Le transfert énergétique de la mitochondrie aux sites d'utilisation.....	- 24 -
I.2.b.β- Perturbations du métabolisme énergétique du myocarde en conditions ischémiques	- 26 -
I.2.c- L'homéostasie calcique intracardiomyocytaire et le couplage excitation-contraction ..	- 28 -
I.2.c.α- L'homéostasie calcique intracardiomyocytaire en conditions normoxiques	- 28 -

I.2.c.β- Perturbations de l'homéostasie calcique du myocarde en conditions ischémiques ... -	29 -
I.2.d- Stress oxydant en conditions d'ischémie	- 30 -
I.2.e- La reperfusion	- 31 -
I.2.e.α- La majoration brutale de la surcharge calcique	- 33 -
I.2.e.β- La majoration brutale du stress oxydant.....	- 34 -
I.2.c.γ- Intégrité mitochondriale en situation d'ischémie-reperfusion	- 34 -
II-Mort Cellulaire et Ischémie-Reperfusion	- 37 -
Sommaire	- 37 -
II.1- Apoptose.....	- 39 -
II.1.a- Apoptose.....	- 39 -
II.1.a.α- La voie extrinsèque de l'apoptose	- 39 -
II.1.a.β- La voie intrinsèque de l'apoptose.....	- 40 -
II.1.b- Apoptose et infarctus du myocarde	- 42 -
II.1.b.α- Voie extrinsèque de l'apoptose et infarctus du myocarde	- 42 -
II.1.b.β- Voie intrinsèque de l'apoptose et infarctus du myocarde	- 43 -
II.2- Nécrose	- 44 -
II.2.a- Nécrose.....	- 44 -
II.2.a.α- Nécrose par les récepteurs de mort	- 44 -
II.2.a.β- Nécrose impliquant le mPTP.....	- 45 -
II.2.a.γ- Nécrose impliquant le calcium et les protéases	- 45 -
II.2.b- Nécrose et infarctus du myocarde	- 46 -
II.3- Autophagie	- 47 -
II.3.a- Autophagie.....	- 47 -
II.3.b- Autophagie et infarctus du myocarde	- 48 -
II.3.b.α- Autophagie et ischémie prolongée.....	- 48 -
II.3.b.β- Autophagie et reperfusion.....	- 49 -
III-La Cardioprotection	- 51 -
Sommaire	- 51 -
III.1- Le préconditionnement	- 53 -
III.1.a- Le préconditionnement ischémique	- 53 -
III.1.a.α- Historique et concept de l'IPC.....	- 53 -
III.1.a.β - Signalisation intracellulaire de l'IPC.....	- 55 -
III.1.a.β.I – PI3K.....	- 56 -

III.1.a.β.II – Akt	- 58 -
III.1.a.β.III – GSK-3β.....	- 59 -
III.1.a.β.IV – Les MAPK.....	- 60 -
III.1.a.β.V – La voie Wnt/Frizzled.....	- 62 -
III.1.a.β.VI – mTOR	- 68 -
III.1.a.β.VII –p70S6K	- 71 -
III.1.a.β.VIII –4E-BP1.....	- 73 -
III.1.a.β.IX –PKC.....	- 73 -
III.1.a.β.X –NOS.....	- 75 -
III.1.a.β.XI –Le mitoK _{ATP}	- 77 -
III.1.a.β.XII –Les ROS.....	- 78 -
III.1.a.β.XIII –Le mPTP	- 78 -
III.1.b- Le préconditionnement pharmacologique.....	- 81 -
III.1.b.α – PPC par les cytokines	- 81 -
III.1.b.β – PPC par les ligands des GPCR.....	- 83 -
III.1.b.γ– Peptides natriurétiques.....	- 84 -
III.1.b.δ – Anesthésiques volatils.....	- 84 -
III.1.b.ε – Statines.....	- 85 -
III.1.b.ζ– Angiotensine II.....	- 85 -
III.1.b.η– Donneurs de NO.....	- 85 -
III.1.b.θ– Les KCO.....	- 86 -
III.1.b.ι– La cyclosporine A.....	- 87 -
III.2- Le postconditionnement.....	- 88 -
III.2.a- Le postconditionnement ischémique.....	- 88 -
III.2.a.α- Historique.....	- 88 -
III.2.a.β- Signalisation intracellulaire du postconditionnement ischémique	- 90 -
III.2.b- Le postconditionnement pharmacologique	- 92 -
III.2.b.α– PPC par les cytokines.....	- 93 -
III.2.b.β– PPC par les ligands des GPCR.....	- 93 -
III.2.b.γ– Anesthésiques volatils.....	- 94 -
III.2.b.δ– Les KCO.....	- 94 -
III.1.b.ε– La cyclosporine A.....	- 94 -
OBJECTIFS DE CETTE THÈSE.....	- 97 -
DEUXIÈME PARTIE	- 101 -

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	- 101 -
I-Modèles Animaux.....	- 103 -
I.1- Modèles animaux.....	- 103 -
I.2- Génération des souris transgéniques.....	- 104 -
I.2.a- Souris sFRP1-Tg.....	- 104 -
I.2.b- Souris GSK-3 $\alpha\beta$ Knock-in.....	- 105 -
I.3- Génotypage.....	- 105 -
II-Cœur de Souris Isolé-Perfusé.....	- 107 -
II.1- Perfusion rétrograde de cœur de souris selon la technique de Langendorff.....	- 109 -
II.2- Protocoles de préconditionnement.....	- 110 -
II.3- Protocoles de postconditionnement.....	- 112 -
III-Modèle de Fibres Endocardiques.....	- 114 -
III.1- Technique de prélèvement des fibres endocardiques de ventricule gauche.....	- 114 -
III.2- Protocole de traitement des fibres endocardiques de ventricule gauche.....	- 115 -
IV-Analyse de la Signalisation Intracellulaire de la Cardioprotection.....	- 117 -
IV.1- Analyses par western blot.....	- 117 -
IV.1.a- Dosage protéique.....	- 117 -
IV.1.b- Électrophorèse et transfert.....	- 118 -
IV.1.c- Immunomarquage.....	- 118 -
V-Analyse de la Cardioprotection.....	- 119 -
V.1- Coloration des zones nécrosées.....	- 119 -
V.2- Quantification des zones nécrosées et à risque.....	- 119 -
V.3-Expressions des Résultats et Analyses Statistiques.....	- 120 -
TROISIÈME PARTIE.....	- 123 -
RÉSULTATS.....	- 123 -
I- Rôle de la GSK-3 β dans la signalisation intracellulaire du Préconditionnement :	
Implications des voies mTOR et Wnt.....	- 125 -
Sommaire.....	- 125 -
I.1- Rôle de la GSK-3 β dans la signalisation intracellulaire du préconditionnement : influences des voies mTOR et Wnt.....	- 127 -
I.1.a- Le préconditionnement requiert la voie RISK : rôle central de GSK-3 β	- 127 -
I.1.a. α - Préconditionnement et nécrose myocardique.....	- 127 -
I.1.a. β - Implication de la voie RISK lors du préconditionnement.....	- 127 -
I.1.a. γ - L'inhibition de GSK-3 β lors du préconditionnement joue un rôle majeur.....	- 130 -
I.1.b- Le préconditionnement implique l'activation de la voie de survie mTOR.....	- 132 -

I.1.b.α- Le préconditionnement induit la phosphorylation de mTOR.....	- 132 -
I.1.b.β- Le Préconditionnement induit la phosphorylation de deux cibles de mTOR : p70S6K et 4E-BP1.....	- 133 -
I.1.c- Existence d'une communication entre les voies Wnt/Frz et mTOR lors du préconditionnement	- 135 -
I.1.c.α- Voie Wnt et cardioprotection.....	- 135 -
I.1.c.β- sFRP1 bloque l'inhibition de GSK-3β de façon Akt-indépendante.....	- 135 -
I.1.c.γ- Communication entre les voies Wnt et mTOR.....	- 137 -
I.1.d- L'inhibition de GSK-3β et l'activation de mTOR dépendent de l'ouverture du mitoK _{ATP} et de la production de ROS	- 137 -
I.1.d.α- Le Préconditionnement est mitoK _{ATP} dépendant.....	- 137 -
I.1.d.β- La production de ROS est nécessaire à la signalisation du Préconditionnement.....	- 139 -
I.2- Discussion et Perspectives	- 141 -
II- Implication de GSK-3β et du mitoK _{ATP} lors du Postconditionnement : Une cardioprotection indépendante des voies Wnt et mTOR.....	- 147 -
Sommaire	- 147 -
II.1- Implication de GSK-3β et du mitoK _{ATP} lors du Postconditionnement : Une cardioprotection indépendante des voies Wnt et mTOR	- 149 -
II.1.a- Le postconditionnement requiert la voie RISK : rôle central de GSK-3β.....	- 149 -
II.1.a.α- Postconditionnement et nécrose myocardique.....	- 149 -
II.1.a.β- Implication de la voie RISK lors du postconditionnement.....	- 149 -
II.1.a.γ- L'inhibition de GSK-3β est primordiale lors du postconditionnement.....	- 151 -
II.1.b- L'efficacité du postconditionnement est indépendante de l'activation de la voie de survie mTOR.....	- 152 -
II.1.c- La voie Wnt/Frz n'est pas impliquée dans le postconditionnement	- 154 -
II.1.d- L'inhibition de GSK-3β et la cardioprotection dépendent de l'ouverture du mitoK _{ATP} lors du postconditionnement.....	- 155 -
II.2- Discussion et Perspectives	- 159 -
CONCLUSION GÉNÉRALE	- 165 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 171 -
Références Bibliographiques	- 173 -

Liste des Figures

Figure 1- L'Hypoxie dirige la formation endochondrale des os.	- 15 -
Figure 2- Pression partielle d'oxygène et altitude.	- 17 -
Figure 3- Angiogenèse par sprouting et intussusception.	- 18 -
Figure 4- Formation de plaque d'athérome et de thrombus lors d'une athérosclérose.	- 20 -
Figure 5- Métabolisme énergétique cardiaque.	- 23 -
Figure 6- Métabolisme énergétique de la mitochondrie durant (A) l'ischémie et (B) la reperfusion.	- 27 -
Figure 7- Couplage excitation-contraction : le rôle de l'homéostasie calcique.	- 29 -
Figure 8- Taille d'infarctus en fonction de la durée d'ischémie et conséquences de la reperfusion.	- 32 -
Figure 9- Médiateurs principaux de la mort cellulaire causée par la reperfusion.	- 33 -
Figure 10- Signalisations de l'apoptose.	- 39 -
Figure 11- Éléments impliqués dans la voie extrinsèque de l'apoptose.	- 40 -
Figure 12- Éléments impliqués dans la voie intrinsèque de l'apoptose.	- 41 -
Figure 13- Mort cellulaire consécutive à l'ischémie-reperfusion chez (A) les souris lpr et (B) les souris TNFR1/TNFR2 KO.	- 42 -
Figure 14- Atténuation de la mort cellulaire après IR chez (A) des souris surexprimant Bcl-2 et (B) chez des souris après traitement à l'YVAD-CMK, un inhibiteur de la caspase 2.	- 43 -
Figure 15- Voies de signalisation de la nécrose.	- 45 -
Figure 16- Prévention des dommages cardiaques dus à l'IR chez les souris cyclophiline D^{-/-}.	- 46 -
Figure 17- Formation de l'autophagolysosome au cours de l'autophagie	- 47 -
Figure 18- Régulation de l'autophagie par les voies mTOR et Beclin1.	- 48 -
Figure 19- Effets de l'ischémie prolongée sur la taille d'infarctus chez les souris DN-AMPK.	- 49 -
Figure 20- Effets de l'ischémie-reperfusion chez les souris beclin 1^{+/-}.	- 49 -
Figure 21- Premières expériences de Préconditionnement Ischémique par Murry.	- 53 -
Figure 22- Signalisation intracellulaire du preconditionnement ischémique (I) – De l'activation des récepteurs GPCR à l'inhibition de GSK-3β.	- 57 -
Figure 23- Voie canonique Wnt/Frizzled.	- 64 -
Figure 24- Modèle d'activation des protéines Rac1, cdc42 et RhoA dans la signalisation Wnt/Frizzled/Dishevelled.	- 66 -
Figure 25- Voie de signalisation de mTOR	- 71 -
Figure 26 - Signalisation intracellulaire du preconditionnement ischémique (II) – De la translocation de PKCε au maintien de la fermeture du mPTP.	- 75 -
Figure 27- Architecture moléculaire hypothétique du pore de transition de perméabilité mitochondrial mPTP. - 79 -	
Figure 28- Étude des composants du mPTP.	- 80 -
Figure 29– Mesure de la taille d'infarctus – Comparaison entre post conditionnement et preconditionnement ischémiques.	- 89 -
Figure 30- Signalisation intracellulaire du postconditionnement – Mise en parallèle des voies RISK et SAFE.	- 90 -
Figure 31- Effet cardioprotecteur de la cyclosporine A en tant qu'agent postconditionnant.	- 95 -
Figure 32- Génération des souris sFRP1-Tg.	- 104 -
Figure 33- Exemple de gel après PCR lors d'un génotypage α-MHC/tTA X TRE-sFRP1.	- 107 -
Figure 34- Modèle de cœur isolé perfusé Langendorff.	- 108 -
Figure 35- Cœur isolé perfusé.	- 109 -
Figure 36- Tracé expérimental typique de la pression développée du ventricule gauche.	- 110 -

Figure 37- . Protocoles expérimentaux pour l'étude des voies de signalisation du préconditionnement et de la cardioprotection.	- 111 -
Figure 38- Protocoles expérimentaux pour l'étude des voies de signalisation du postconditionnement et de la cardioprotection.	- 113 -
Figure 39- Prélèvement de Fibres Endocardiques de Ventricule Gauche.	- 115 -
Figure 40- Protocoles expérimentaux pour l'étude des voies de signalisation de la cardioprotection sur modèle de fibres endocardiques de ventricule gauche.	- 116 -
Figure 41- Coloration des zones nécrosées au 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride.	- 119 -
Figure 42- Le préconditionnement protège le cœur via la voie Akt/GSK-3β.	- 128 -
Figure 43- Le préconditionnement pharmacologique au diazoxide induit l'inhibition de GSK-3β sur un modèle de fibres endocardiques.	- 130 -
Figure 44- Le préconditionnement est GSK-3β dépendant.	- 131 -
Figure 45- mTOR est activé durant le préconditionnement par GSK-3β de manière Wnt-dépendante.	- 133 -
Figure 46- Le préconditionnement implique p70S6K et 4E-BP1, deux cibles de mTOR.	- 134 -
Figure 47- La voie Wnt interfère avec le préconditionnement ischémique et pharmacologique - sFRP1 bloque l'inhibition de GSK-3β de façon Akt-indépendante.	- 137 -
Figure 48- L'inhibition de GSK-3β et l'activation de mTOR dépendent de l'ouverture du mitoK_{ATP} et de la production de ROS.	- 138 -
Figure 49- Modèle de signalisation du Préconditionnement.	- 143 -
Figure 50- Le postconditionnement protège le cœur via la voie Akt/GSK-3β (I).	- 150 -
Figure 51- Le postconditionnement protège le cœur via la voie Akt/GSK-3β (II).	- 152 -
Figure 52- La voie mTOR n'est pas impliquée lors du postconditionnement.	- 153 -
Figure 53- la voie Wnt/ Frz n'intervient pas dans la mise en place de la cardioprotection par postconditionnement.	- 155 -
Figure 54- L'inhibition de GSK-3β et la cardioprotection est dépendante de l'ouverture du mitoK_{ATP} lors du postconditionnement.	- 156 -
Figure 55- Modèle de signalisation du postconditionnement.	- 161 -

Liste des Tableaux

Tableau 1- Modulateurs des canaux K_{ATP} et leurs spécificités.	- 86 -
Tableau 2- Génération des souris GSK-3$\alpha\beta$ Knock-in.	- 105 -
Tableau 3- Amorces pour génotypes.	- 106 -
Tableau 4- Antagonistes utilisés pour l'étude de la signalisation intracellulaire du préconditionnement et du postconditionnement.	- 112 -
Tableau 5- Antagonistes utilisés pour étudier la signalisation intracellulaire du préconditionnement sur modèle de fibres endocardiques de ventricule gauche.	- 116 -
Tableau 6- Anticorps et leurs dilutions, utilisés lors des études sur la signalisation intracellulaire de la cardioprotection.	- 118 -

Abréviations

<i>4E-BP1</i>	<i>eIF4E-Binding Proteins 1</i>
<i>5-HD</i>	<i>5-hydroxydécanoate</i>
$\Delta\Psi$	<i>Gradient électrochimique de protons</i>
<i>AAR</i>	<i>Area at Risk</i>
<i>ADP</i>	<i>Adénosine Diphosphate</i>
<i>AIF</i>	<i>Apoptosis Inducible Factor</i>
<i>Akt</i>	<i>Protein kinase B</i>
<i>AMP</i>	<i>Adénosine MonoPhosphate</i>
<i>AMPK</i>	<i>5' Adenosine MonoPhosphate-activated protein Kinase</i>
<i>ANP</i>	<i>A-type Natriuretic Peptide</i>
<i>ANT</i>	<i>Adenine Nucleotide Translocator</i>
<i>Apaf-1</i>	<i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>
<i>APC</i>	<i>Adenomatous Poliposis Coli</i>
<i>Atg</i>	<i>Autophagy related homolog</i>
<i>ATP</i>	<i>Adénosine TriPhosphate</i>
<i>Bak</i>	<i>Bcl-2 homologous antagonist/Killer</i>
<i>Bax</i>	<i>Bcl2-associated X protein</i>
<i>Bcl-2</i>	<i>B cell leukemia/lymphoma-2</i>
<i>Bcl-x_L</i>	<i>B cell leukemia/lymphoma-x, isoforme long</i>
<i>BH</i>	<i>Tampon d'homogénéisation</i>
<i>BH3</i>	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>
<i>BNP</i>	<i>B-type Natriuretic Peptide</i>
<i>BPCO</i>	<i>Broncho-Pneumopathies Chroniques Obstrucives</i>
<i>CEC</i>	<i>Couplage Excitation-Contraction</i>
<i>CK</i>	<i>Créatine Kinase</i>
<i>Cr</i>	<i>Créatine</i>

Abréviations

<i>CRD</i>	<i>Cystein Rich Domain</i>
<i>CsA</i>	<i>Cyclosporine A</i>
<i>CT-1</i>	<i>Cardiotrophine-1</i>
<i>Cyp-D</i>	<i>Cyclophiline D</i>
<i>dATP</i>	<i>Désoxy Adénine TriPhosphate</i>
<i>dCTP</i>	<i>Désoxy Cytosine TriPhosphate</i>
<i>DISC</i>	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
<i>dGTP</i>	<i>Désoxy Guanine TriPhosphate</i>
<i>Dkk</i>	<i>Dickkopf</i>
<i>DMSO</i>	<i>Diméthylsulfoxyde</i>
<i>DTT</i>	<i>Dithiothréitol</i>
<i>dTTP</i>	<i>Désoxy Thymines TriPhosphate</i>
<i>Dvl</i>	<i>Dishevelled</i>
<i>DZX</i>	<i>Diazoxide</i>
<i>eNOS</i>	<i>Synthase d'Oxyde Nitrique endothéliale</i>
<i>EPO</i>	<i>Erythropoïétine</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
<i>FRB</i>	<i>FKBP12-Rapamycin Binding</i>
<i>Frz</i>	<i>Frizzled</i>
<i>GPCR</i>	<i>Récepteur couplé à une protéine G</i>
<i>GSK3</i>	<i>Glycogène Synthase Kinase 3</i>
<i>HD</i>	<i>Domaine d'Homologie</i>
<i>HGF</i>	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
<i>HIF</i>	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
<i>HK II</i>	<i>Hexokinase II</i>
<i>HSF</i>	<i>Heat Shock Factor</i>
<i>HSP</i>	<i>Heat Shock Protein</i>
<i>IGF</i>	<i>Insulin-like growth factor</i>
<i>IL</i>	<i>Interleukine</i>

<i>iNOS</i>	<i>Synthase d'Oxyde Nitrique inducible</i>
<i>IPC</i>	<i>Préconditionnement Ischémique</i>
<i>IPost</i>	<i>Postconditionnement Ischémique</i>
<i>IR</i>	<i>Ischémie-Reperfusion</i>
<i>IS</i>	<i>Infarct size</i>
<i>KCO</i>	<i>Ouvreurs de canaux potassiques</i>
<i>KI</i>	<i>Knoc- in</i>
<i>LiCl</i>	<i>Chlorure de Lithium</i>
<i>LIF</i>	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<i>MAPKK</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
<i>mCK</i>	<i>Mitochondrial Créatine Kinase</i>
<i>MCU</i>	<i>Uniport calcique mitochondrial</i>
<i>MES</i>	<i>Morpholino Éthane Sulfonate</i>
<i>MitoK_{ATP}</i>	<i>Canal potassique mitochondriale ATP sensible</i>
<i>MPG</i>	<i>2-mercaptopropionyl glycine</i>
<i>mPTP</i>	<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
<i>mTOR</i>	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
<i>NADH</i>	<i>Nicotinamide Adénine Dinucléotide</i>
<i>NCX</i>	<i>Sodium/Calcium Exchanger</i>
<i>NF-κB</i>	<i>Nuclear Factor κ light-chain enhancer of activated B cells</i>
<i>nNOS</i>	<i>Synthase d'Oxyde Nitrique neuronale</i>
<i>NO</i>	<i>Oxyde Nitrique</i>
<i>NOS</i>	<i>Synthase d'Oxyde Nitrique</i>
<i>PA</i>	<i>Potentiel d'Action</i>
<i>P_{A02}</i>	<i>Pression artérielle partielle d'oxygène</i>
<i>PBR</i>	<i>Peripheral Benzodiazepine Receptor</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
<i>PCP</i>	<i>voie de polarité planaire cellulaire</i>

Abréviations

<i>PCr</i>	<i>Phosphocréatine</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PH</i>	<i>Pleckstrin Homology</i>
<i>pH_i</i>	<i>pH intracellulaire</i>
<i>PI3K</i>	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
<i>PIAS</i>	<i>Protein Inhibitors of STAT</i>
<i>PIP₃</i>	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>
<i>PKA</i>	<i>Protéine Kinase A</i>
<i>PKB</i>	<i>Protéine Kinase B</i>
<i>PKC</i>	<i>Protéine Kinase C</i>
<i>PLB</i>	<i>Phospholamban</i>
<i>P_{O2}</i>	<i>Pression d'Oxygène</i>
<i>PP2A</i>	<i>Protéine Phosphatase 2A</i>
<i>PPC</i>	<i>Préconditionnement Pharmacologique</i>
<i>PPost</i>	<i>Postconditionnement Pharmacologique</i>
<i>RBD</i>	<i>Ras-binding Domain</i>
<i>RE</i>	<i>Réticulum Endoplasmique</i>
<i>RIP1</i>	<i>Receptor Interacting Protein 1</i>
<i>RISK</i>	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinases</i>
<i>RMN</i>	<i>Raisonnance Magnétique Nucléaire</i>
<i>ROS</i>	<i>Espèces dérivées de l'oxygène</i>
<i>RS</i>	<i>Réticulum Sarcoplasmique</i>
<i>SAFE</i>	<i>Survivor Activating Factor Enhancement</i>
<i>sarck_{ATP}</i>	<i>Canal potassique sarcolemmal ATP sensible</i>
<i>SDS</i>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<i>SDS-PAGE</i>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
<i>SERCA</i>	<i>Sarco/Endoplasmique Reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
<i>sFRP1</i>	<i>secreted Frizzled Receptor Protein 1</i>
<i>STAT</i>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>

<i>TAE</i>	<i>Tampon Tris, Acétate, EDTA</i>
<i>TGF</i>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<i>TNFR1</i>	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
<i>TORC 1</i>	<i>mTOR complex 1</i>
<i>TORC 2</i>	<i>mTOR complex 2</i>
<i>TRAF2</i>	<i>TNF Receptor-Associated Factor 2</i>
<i>TTC</i>	<i>2,3,5-triphenyltetrazolium chloride</i>
<i>UCP</i>	<i>Uncoupling Proteins</i>
<i>VDAC</i>	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i>
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<i>WIF</i>	<i>Wnt Inhibitory Factor</i>
<i>Wm</i>	<i>Wortmannine</i>

PRÉAMBULE

Les maladies cardiaques secondaires à l'athérosclérose sont la première cause de mortalité et de morbidité en France. L'athérosclérose coronaire est en effet à l'origine de plus des 2/3 des cas d'insuffisance cardiaque. Il s'agit d'une pathologie d'évolution généralement lente dont la première conséquence est une altération de la contractilité myocardique. Cette atteinte peut être secondaire à un infarctus du myocarde, et caractérisée par une nécrose cardiomyocytaire systématisée à un territoire vasculaire (secondaire à la thrombose d'une artère coronaire). Elle peut aussi survenir en l'absence d'infarctus et faire le lit de la myocardiopathie ischémique.

Les mécanismes reliant l'atteinte coronaire athéroscléreuse et la dysfonction mécanique du myocarde sont particulièrement méconnus. Par ailleurs, les différentes stratégies de revascularisation (pontage aorto-coronarien, angioplastie percutanée, fibrinolyse) et les thérapeutiques médicamenteuses utilisées en pratique clinique chez les patients présentant une coronaropathie chronique ou à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde, visent principalement à réduire les besoins énergétiques du myocarde grâce à une action hémodynamique et/ou à améliorer la perfusion. Si ces traitements sont parfois très efficaces sur les symptômes, ils n'ont que peu (pour certains) ou pas (pour d'autres) d'intérêt pronostique. Il est donc nécessaire de développer la recherche pharmacologique dans le domaine de la cytoprotection, de manière à proposer des stratégies thérapeutiques (synergiques avec celles déjà utilisées) visant à protéger le myocarde des lésions d'ischémie et de reperfusion, indépendamment de toute action princeps sur l'hémodynamique ou sur la perfusion et, *in fine*, améliorer les capacités fonctionnelles et le pronostic vital des patients.

Dans cette perspective, le phénomène de préconditionnement ischémique, initialement décrit par Murry en 1986 (Murry, Jennings et al. 1986), ainsi que celui de postconditionnement (Zhao, Corvera et al. 2003), ont été le point de départ d'un formidable effort de recherche dont les résultats sont en train de modifier les stratégies de prise en charge des patients en anesthésie-réanimation, en chirurgie cardiaque, en transplantation ou à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde.

Grâce à des séries d'occlusions-reperfusions courtes, réalisées juste avant l'ischémie (pour le Préconditionnement Ischémique, IPC) ou au moment de la reperfusion après ischémie (pour le Postconditionnement Ischémique, IPost), le cœur affiche une plus grande résistance vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion. Il en découle, entre autres, une diminution de la taille d'infarctus, une amélioration de ses fonctions contractiles et de sa relaxation, une diminution de l'occurrence des arythmies ventriculaires, et une diminution des lésions vasculaires (notamment endothéliales). La reproduction de ces résultats en pratique clinique devrait se traduire par une amélioration du pronostic après un accident coronarien aigu.

Les mécanismes intracellulaires impliqués restent encore assez obscurs malgré le regain d'efforts de recherche développés dans ce domaine depuis plus de deux décennies. De par l'étude de ces voies de signalisation protectrices, il est désormais possible de cibler de manière pharmacologique certains protagonistes impliqués dans la cardioprotection afin de mimer les effets du pré-et du postconditionnement. En ne visant qu'une ou plusieurs cibles de ces voies de signalisation, on peut ainsi diminuer les risques d'effets secondaires délétères, mais aussi simplifier la mise en place d'un protocole lourd comme lors de l'IPC ou de l'IPost. On parle ainsi de Préconditionnement Pharmacologique (PPC) ou Postconditionnement Pharmacologique (PPost).

Dans le laboratoire, nous avons déjà montré, avec d'autres, l'implication du canal potassique mitochondrial ATP sensible ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) lors du preconditionnement ischémique, mais également l'implication de la voie de développement Wnt/Frz et de la Glycogène Synthase Kinase 3β lors de la mise en place de cette cardioprotection.

C'est dans ce contexte que s'intègre ce travail ayant pour but d'approfondir la compréhension des mécanismes d'action de la cardioprotection vis-à-vis des lésions induites par l'ischémie-reperfusion, et plus particulièrement l'intégration des rôles respectifs du canal $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, de la Glycogène Synthase Kinase 3β , des voies Wnt/Frz et mTOR. Sa finalité pratique s'inscrit dans l'élaboration de nouvelles stratégies de prise en charge de l'infarctus du myocarde à la phase aiguë.

Dans un premier temps seront présentées les principales perturbations physiopathologiques observées lors de l'ischémie-reperfusion myocardique. Puis, seront exposées les différentes modalités de mort cellulaire engendrées par l'ischémie. Enfin les concepts de cardioprotection par preconditionnement et postconditionnement, qu'ils soient ischémique ou pharmacologique seront développés. Nous insisterons sur les éléments impliqués dans la signalisation intracellulaire de ces phénomènes.

Dans une seconde partie seront présentées les méthodes et les expériences réalisées au cours de cette thèse afin d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection.

Dans une troisième partie seront présentés les résultats obtenus, tout d'abord lors de l'étude du Préconditionnement puis lors de l'étude du Postconditionnement.

Enfin ces résultats seront discutés dans une quatrième partie.

Liste des Communications

- 10-1 Vigneron, F.**, Jaspard-Vinassa, B., Bonnet, M., Tariosse, L., Bonoron-Adèle, S., Couffinhal, T., Duplaà, C., Dos Santos, P. mTOR and Wnt pathway crosstalk involved in preconditioning through GSK-3 β . GRRC, Nantes, 15-17 Avril 2010 (Communication affichée CA).
- 10-2 Vigneron, F.**, Jaspard-Vinassa, B., Bonnet, M., Tariosse, L., Bonoron-Adèle, S., Couffinhal, T., Duplaà, C., Dos Santos, P. mTOR and Wnt pathway crosstalk involved in preconditioning through GSK-3 β . Journée École Doctorale de Bordeaux, Arcachon 2010 (CA).
- 10-3 Vigneron, F.**, Jaspard-Vinassa, B., Bonnet, M., Tariosse, L., Bonoron-Adèle, S., Couffinhal, T., Duplaà, C., Dos Santos, P. Crosstalk of mTOR and Wnt pathways involved in preconditioning through GSK-3 β . 15th world congress on heart disease, Vancouver, 25-27 Juillet 2010 (Communication Orale CO).
- 10-4 Vigneron, F.**, Vinassa, B., Lemoine, S., Couffinhal, T., Dos Santos, P., Duplaa, C. Cardioprotective signaling of postconditioning is independent of Wnt and mTOR pathways. 15th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research ECCR, Nice, October 8-10, 2010 (CO).
-
- 09-1 Vigneron, F.**, Vinassa, B., Tariosse, L., Campagnac, M., Couffinhal, T., Bonoron-Adèle, S., Dos Santos, P., Duplaà, C. Inhibition of mTOR survival pathway by an embryonic developmental Wnt pathway suppresses preconditioning induced cardioprotection. GRRC, Nancy, 2-3 avril 2009 (CA).
- 09-2 Vigneron, F.**, Vinassa, B., Tariosse, L., Campagnac, M., Couffinhal, T., Bonoron-Adèle, S., Dos Santos, P., Duplaà, C. Implication de Wnt/Frizzled et GSK-3 β dans la cardioprotection vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion. Journée IFR, Bordeaux 2009 (CO).
- 09-3 Vigneron, F.**, Vinassa, B., Tariosse, L., Campagnac, M., Couffinhal, T., Bonoron-Adèle, S., Dos Santos, P., Duplaà, C. Inhibition of mTOR survival pathway by an embryonic developmental Wnt pathway suppresses preconditioning induced cardioprotection. Journée École Doctorale de Bordeaux, Arcachon 2009 (CA).
- 09-4 Vigneron, F.**, Vinassa, B., Tariosse, L., Campagnac, M., Couffinhal, T., Bonoron-Adèle, S., Dos Santos, P., Duplaà, C. GSK-3 β , mTOR and Wnt pathway crosstalk involved in preconditioning-induced cardioprotection. 14th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research ECCR, Nice, October 9-11, 2009 (CO).

- 08-1 Vigneron, F.**, Vinassa, B., Tariosse, L., Grauzam, S., Couffinhal, T., Bonoron-Adèle, S., Duplâa, C. Dos Santos, P. Implication of GSK-3 β and Wnt/Frizzled pathway in intracellular signaling of preconditioning by diazoxide. Journée IFR, Bordeaux 2008 (CA).
- 08-2 Vigneron, F.**, Vinassa, B., Tariosse, L., Grauzam, S., Couffinhal, T., Bonoron-Adèle, S., Duplâa, C. Dos Santos, P. Implication of GSK-3 β and Wnt/Frizzled pathway in intracellular signaling of preconditioning by diazoxide. 28th European Section meeting ISHR, Athènes, May 29-31, 2008 (CA).
- 08-3 Vigneron, F.**, Vinassa, B., Tariosse, L., Grauzam, S., Couffinhal, T., Bonoron-Adèle, S., Duplâa, C. Dos Santos, P. Implication of GSK-3 β and Wnt/Frizzled pathway in intracellular signaling of preconditioning by diazoxide. European Vascular Genomics Network EVGN 4th Summer School, Cracovie, September 15-19 2008 (CA).

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION

I-Physiopathologie de l'Ischémie-Reperfusion Myocardique

Sommaire

Sommaire.....	- 13 -
I.1- Hypoxie et ischémie	- 15 -
I.1.a- Hypoxie physiologique.....	- 15 -
I.1.a.α- Hypoxie physiologique lors du développement et de la différenciation cellulaire...-	15 -
I.1.a.β- Hypoxie physiologique d'adaptation	- 16 -
I.1.b- Hypoxie pathologique.....	- 17 -
I.1.b.α- Hypoxie pathologique d'adaptation.....	- 17 -
I.1.b.β- L'hypoxie par réduction princeps de la perfusion. Le cas de l'athérosclérose coronaire et de l'ischémie myocardique.	- 19 -
I.2- Perturbations myocardiques induites par l'ischémie-reperfusion	- 20 -
I.2.a- Préambule	- 20 -
I.2.b- Métabolisme énergétique du myocarde	- 21 -
I.2.b.α- Métabolisme énergétique du myocarde en conditions normoxiques	- 21 -
I.2.b.α.I- Généralités.....	- 21 -
I.2.b.α.II- L'utilisation de substrats énergétiques.....	- 23 -
I.2.b.α.III- La phosphorylation oxydative	- 24 -
I.2.b.α.IV- Le transfert énergétique de la mitochondrie aux sites d'utilisation	- 24 -
I.2.b.β- Perturbations du métabolisme énergétique du myocarde en conditions ischémiques..-	26 -
I.2.c- L'homéostasie calcique intracardiomyocytaire et le couplage excitation-contraction....-	28 -
I.2.c.α- L'homéostasie calcique intracardiomyocytaire en conditions normoxiques	- 28 -
I.2.c.β- Perturbations de l'homéostasie calcique du myocarde en conditions ischémiques.-	29 -
I.2.d- Stress oxydant en conditions d'ischémie	- 30 -
I.2.e- La reperfusion	- 31 -
I.2.e.α- La majoration brutale de la surcharge calcique.....	- 33 -
I.2.e.β- La majoration brutale du stress oxydant.....	- 34 -
I.2.e.γ- Intégrité mitochondriale en situation d'ischémie-reperfusion	- 34 -

L'ischémie est définie par la diminution de l'apport sanguin artériel à un organe. On observe alors une baisse de l'oxygénation des tissus de l'organe en dessous de ses besoins (hypoxie), entraînant une perturbation, voire l'arrêt de sa fonction.

Il existe différents types d'hypoxie, physiologique ou pathologique.

I.1- Hypoxie et ischémie

I.1.a- Hypoxie physiologique

I.1.a.α- Hypoxie physiologique lors du développement et de la différenciation cellulaire

L'hypoxie, ou diminution des apports en dioxygène aux tissus, peut être liée à différentes causes, qui ne sont pas toujours d'ordre pathologique. En effet, au cours du développement embryonnaire, les apports en oxygène au fœtus sont assurés par le sang maternel. Le placenta va permettre les échanges d'oxygène entre le sang maternel oxygéné et le sang fœtal non-oxygéné. Paradoxalement, le placenta se développe dans un environnement pauvre en oxygène, et certaines cellules placentaires restent hypoxiques ($\leq 2\%$ d'oxygène) malgré le flux sanguin maternel oxygéné dans le placenta (Dunwoodie 2009).

L'hypoxie va également contrôler la formation endochondriale des os (**Figure 1**). En effet, de nombreux stades de développement sont dépendants de la présence ou non d'oxygène et des réponses transcriptionnelles de gènes senseurs d'oxygène, telle que la famille des HIF (Hypoxia Inducible Factor).

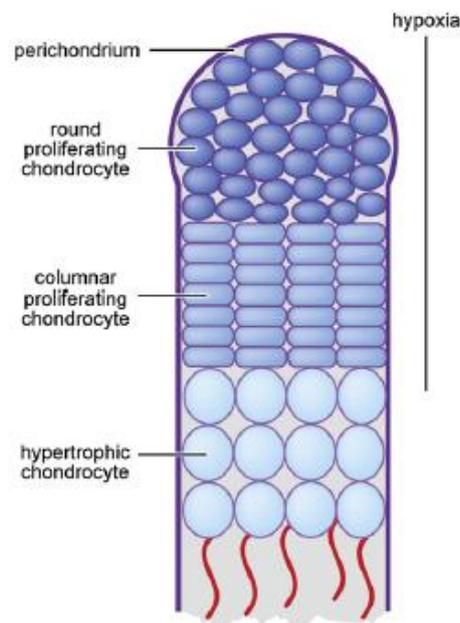


Figure 1- L'Hypoxie dirige la formation endochondriale des os.

Représentation de la prolifération chondrocytaire et de la différenciation des os longs chez le fœtus. Le trait vertical représente la croissance cellulaire due à l'hypoxie. Figure issue de Dunwoodie (2009).

I.1.a.β- Hypoxie physiologique d'adaptation

L'organisme ou certains organes peuvent également faire l'expérience de situations hypoxémiantes. Ces dernières peuvent être aiguës, comme cela est le cas lors d'une augmentation importante et/ou brutale de la demande métabolique (lors d'un effort par exemple), ou chroniques, comme cela est le cas lorsque l'organisme est placé de manière prolongée dans un environnement pauvre en dioxygène (lors d'un séjour en altitude par exemple). On pourra alors assister à des phénomènes d'adaptation physiologique à l'hypoxie.

En altitude, la diminution de la pression atmosphérique implique la diminution de la pression partielle de chacun des gaz qui la composent, dont celle du dioxygène. Ainsi, lors d'une inspiration, cette diminution de PO_2 conduit à une baisse de la pression partielle alvéolaire pulmonaire en oxygène (PAO_2), ce qui va limiter la saturation en oxygène de l'hémoglobine et ainsi réduire les apports en dioxygène aux tissus. Ceci sera très préjudiciable pour les organes comme le cœur qui fonctionnent quasi exclusivement en aérobie et dont l'extraction de l'oxygène artériel est quasi maximale en conditions basales. Dans ces conditions, la diminution de la pression partielle en oxygène induit une réduction de la tension en oxygène au niveau de la mitochondrie qui doit être précisément compensée par une augmentation de la perfusion (**Figure 2**) (Gnaiger, Steinlechner-Maran et al. 1995).

Cette hypoxie d'altitude peut être « bénéfique » durant des stages d'entraînement de certains sportifs, car l'organisme, pour parer à ce manque d'oxygène, va s'adapter et augmenter son taux d'érythropoïétine afin d'augmenter l'hématocrite, et par voie de conséquence, les capacités de transport de l'oxygène (Elliott 2008). Il existe une accélération de la vitesse de resynthèse de la phosphocréatine après un séjour à 2000 m, induisant un effet bénéfique sur la capacité de récupération après un effort musculaire.

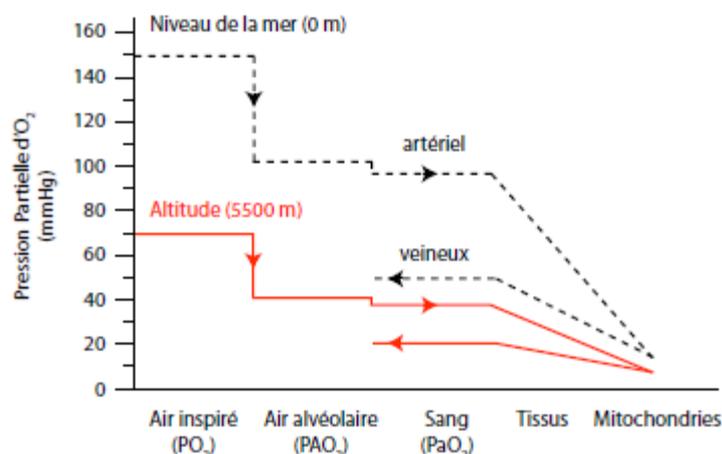


Figure 2- Pression partielle d'oxygène et altitude.

L'oxygénation des tissus dépend des gradients de pression partielle en oxygène. En altitude, ces gradients sont diminués ce qui entraîne une diminution de l'apport d'oxygène aux mitochondries.

I.1.b- Hypoxie pathologique

I.1.b.α- Hypoxie pathologique d'adaptation

Une hypoxie chronique peut également résulter de causes pathologiques. Par exemple, lors de développement tumoraux, des masses de cellules tumorales vont se former, envahir les tissus, augmenter ainsi les distances de diffusion de l'oxygène et engendrer des zones fonctionnant en hypoxie. À ce stade, les possibilités de croissance de ces néoplasmes dépendent de leur capacité à augmenter leurs apports en substrats énergétiques et en oxygène, par le développement de réseaux vasculaires. On parle alors d'angiogénèse tumorale (Khosravi Shahi and Fernandez Pineda 2008). Les cellules tumorales vont sécréter des facteurs de croissance angiogénique, qui vont se fixer sur des récepteurs spécifiques des cellules endothéliales. Cette liaison ligand/récepteur va entraîner la prolifération, migration, invasion et éventuellement la formation de tubes capillaires. Ce processus proangiogénique est régulé par l'activité antiangiogénique de molécules impliquées dans l'homéostasie. Quand la balance penche du côté proangiogénique, de nouveaux vaisseaux sanguins se forment.

L'angiogénèse peut se produire par (1) *sprouting*, induisant la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants (**Figure 3A**) ; ou par (2) *intussusception* induisant la formation des vaisseaux à partir de l'élargissement, division et fusion d'anciens vaisseaux (**Figure 3B**)(Sacewicz, Wiktorska et al. 2009).

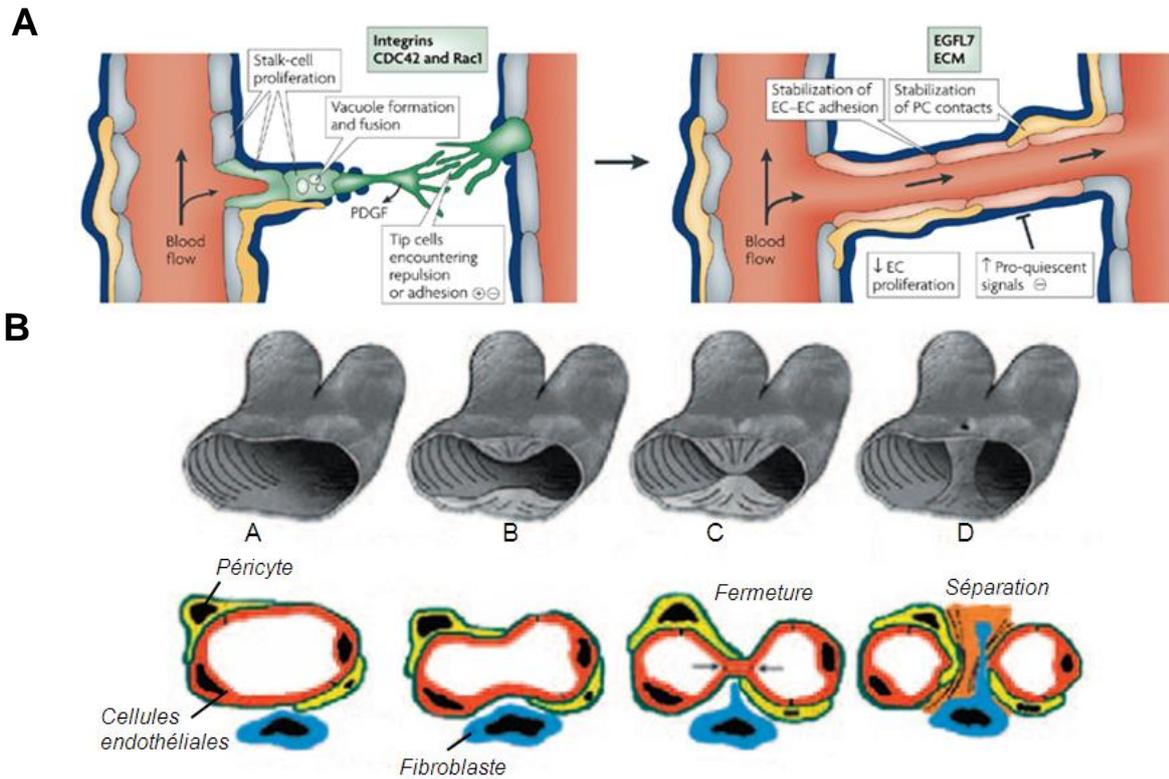


Figure 3- Angiogénèse par sprouting et intussusception.

(A) Angiogénèse par sprouting : Des facteurs angiogéniques de type FGF, VEGF activent les cellules endothéliales, entraînant une dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. Puis la migration orientée des cellules endothéliales est suivie d'une phase proliférative et d'une différenciation en une structure de type capillaire pour former un réseau vasculaire. Figure issue de Adams (2007). **(B) Angiogénèse par intussusception.** Le vaisseau préexistant s'élargie et se sépare pour former deux nouveaux vaisseaux. Figure issue de Sacewicz (2009).

Si l'hypoxie chronique est une situation physiologique rencontrée chez l'homme vivant en altitude, on la retrouve aussi en clinique au cours des maladies broncho-pulmonaires hypoxémiantes comme les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO). Cette affection est caractérisée par une réduction des débits ventilatoires non totalement réversible. La réduction de ces débits est généralement progressive et associée à une réponse inflammatoire anormale des poumons à des particules ou gaz toxiques inhalés. Cette inflammation chronique pulmonaire est caractérisée par une accumulation de macrophages, de lymphocytes T et de polynucléaires neutrophiles, qui peuvent entraîner des dysfonctionnements au niveau musculaire (Pison 2002).

I.1.b.β- L'hypoxie par réduction princeps de la perfusion. Le cas de l'athérosclérose coronaire et de l'ischémie myocardique.

L'infarctus du myocarde demeure la première cause de décès dans le monde, malgré le développement des unités de soins intensifs et des procédures de reperfusion réduisant considérablement sa mortalité précoce. Ses conséquences en termes de morbi-mortalité et de pronostic fonctionnel sont directement liées à la taille de l'infarctus. Celle-ci est essentiellement déterminée par la durée de l'occlusion coronaire et la taille de la zone à risque, elle-même conditionnée par la localisation de l'occlusion coronaire et l'existence éventuelle d'une circulation collatérale. Si la taille de la zone à risque est un paramètre non modifiable, l'organisation des filières de prise en charge des patients présentant un infarctus aigu est guidée par la nécessité de reperfusion le myocarde dans les délais les plus brefs possibles après l'apparition des symptômes. Cependant, les données récentes de la littérature ont maintenant établi que la reperfusion, bien que nécessaire pour éviter que 100% de la zone à risque ne s'infarcisse, induit une accélération transitoire de la mort des cardiomyocytes qu'il est possible de moduler. En l'absence de collatérales ou de traitement rapide (thrombolyse, dilatation percutanée primaire), l'onde de nécrose se propage du sous-endocarde au sous-épicode pour devenir, finalement, transmurale. La plupart des situations cliniques sont toutefois intermédiaires et de nombreux infarctus sont en fait incomplets en rapport avec une reperfusion spontanée ou induite par le traitement thrombolytique ou une angioplastie précoce.

L'ischémie peut avoir plusieurs causes, comme la formation d'une plaque d'athérome déclenchée par une accumulation de cholestérol au niveau des cellules endothéliales lors de l'athérosclérose. Ceci va entraîner un rétrécissement de la lumière artérielle. Si la plaque d'athérome se fissure, l'intérieur de la plaque se retrouve en contact avec le sang et entraîne la formation d'un caillot. Ce thrombus peut ainsi obstruer complètement l'artère (**Figure 4**), stoppant les apports d'oxygène au tissu concerné. Il peut également migrer vers l'aval dans le réseau sanguin et boucher des vaisseaux de diamètres plus fins. Cela peut entraîner des accidents cardio-vasculaires, comme l'infarctus du myocarde, mais également des accidents vasculaires cérébraux et des ischémies de membres (ou d'autres territoires).

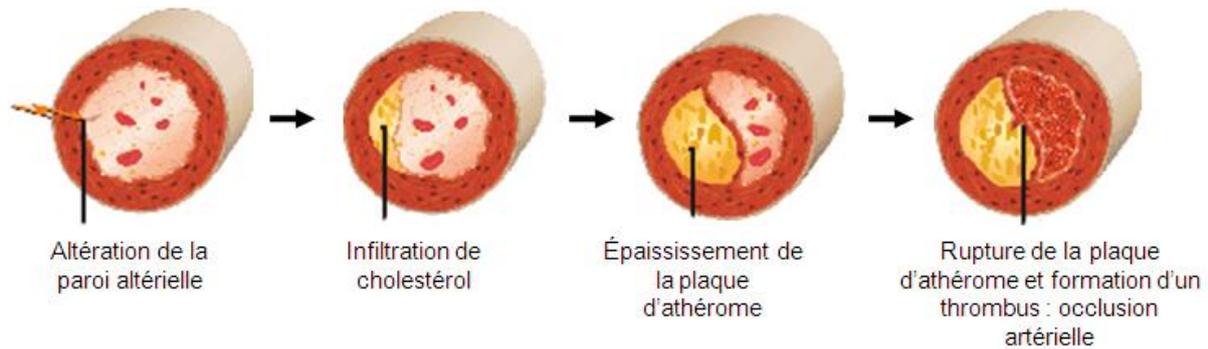


Figure 4- Formation de plaque d'athérome et de thrombus lors d'une athérosclérose.

Après altération de la paroi artérielle, du cholestérol peut s'infiltrer dans la lumière du vaisseau et former une plaque d'athérome.

I.2- Perturbations myocardiques induites par l'ischémie-reperfusion

Afin de rester en cohérence avec les objectifs de notre travail de recherche, nous focaliserons ce chapitre sur les perturbations du métabolisme énergétique, de l'homéostasie calcique intracellulaire et la survenue du stress oxydant.

I.2.a- Préambule

En dépit de recherches acharnées menées depuis plus de 60 ans, les mécanismes précis par lesquels l'ischémie ou l'ischémie-reperfusion altèrent les performances myocardiques demeurent incomplètement élucidés. Ces mécanismes associent des phénomènes de nécrose et de sidération myocardique. C'est dans les années 1970 que le phénomène de sidération myocardique après ischémie-reperfusion a été décrit (Heyndrickx, Millard et al. 1975). Un bref épisode d'ischémie sévère n'engendrant pas d'infarctus est susceptible d'être suivi d'une dysfonction myocardique prolongée malgré le retour à une perfusion normale. Alors que la sidération myocardique associe des altérations de la fonction systolique autant que de la fonction diastolique, sa durée est généralement proportionnelle à la durée de l'épisode ischémique qui l'a causée (Kloner and Przyklenk 1990). Le mécanisme exact responsable de la sidération n'est pas complètement élucidé (Vandeplassche, Hermans et al. 1991). Il associe la persistance d'un certain degré d'acidose locale au niveau des myofilaments, l'accumulation de phosphates inorganiques et l'élévation du sodium et du calcium intracellulaire (Krause, Jacobus et al. 1989; Tani and Neely 1989). La peroxydation

des lipides membranaires, secondaire à l'accumulation de radicaux libres, contribue également à la sidération myocardique (Bolli, Zhu et al. 1987; Koller and Bergmann 1989). La reprise de la fonction contractile d'un cœur isolé et perfusé suite à une ischémie globale est donc une fonction du nombre de myocytes irréversiblement altérés (nécrotique), du nombre de myocytes sidérés et du nombre de myocytes intacts.

I.2.b- Métabolisme énergétique du myocarde

I.2.b.α- Métabolisme énergétique du myocarde en conditions normoxiques

I.2.b.α.1- Généralités

La fonction première du myocarde est d'assurer le pompage du sang non oxygéné vers les poumons, et du sang oxygéné vers les tissus périphériques, en assurant un débit apte à satisfaire leurs besoins métaboliques. Cette fonction, vitale par excellence, est assurée par la contraction rythmique et incessante du myocarde qui fait de cet organe le site d'une activité métabolique intense, susceptible de varier brutalement en fonction des besoins de l'organisme tout entier. Le cœur peut donc être assimilé à une pompe et sa fonction caractérisée par l'activité mécanique qu'il développe.

Le cœur est un organe fonctionnant exclusivement en aérobie. Il tire l'énergie nécessaire à l'accomplissement de ce travail mécanique de l'oxydation de divers substrats énergétiques au premier rang desquels figurent les acides gras, le glucose et le lactate. C'est à cette fin que la circulation coronaire apporte, au niveau des myofibrilles, l'oxygène et des proportions variables de substrats énergétiques.

L'hydrolyse de l'ATP est la source ultime de l'énergie utilisée lors d'un grand nombre de réactions biochimiques se produisant dans différents compartiments de la cellule. En ce qui concerne le cardiomyocyte, les principaux processus consommateurs d'ATP sont :

- La contraction (hydrolyse de l'ATP par la myosine ATPase dans l'espace myofibrillaire).
- Les processus de transport ioniques (hydrolyse de l'ATP par la Na^+/K^+ -ATPase au niveau du sarcolemme, par la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique...).
- La synthèse protéique.

Une caractéristique essentielle du myocarde est sa capacité à modifier de manière brutale et sur une grande échelle son activité mécanique. À titre d'illustration, lors d'un exercice musculaire intense, la consommation en oxygène de l'organisme est plus de dix fois la

consommation au repos, obligeant ainsi le cœur à multiplier son débit par six. Le contrôle de l'utilisation des substrats énergétiques et le contrôle de la phosphorylation oxydative dans les myocytes cardiaques sont donc, peut-être plus qu'ailleurs, des processus essentiels à la vie. Ils permettent une balance précise et instantanée entre vitesse de production et d'utilisation de l'ATP. Comme nous l'avons déjà mentionné, la voie de synthèse de l'ATP quantitativement la plus importante dans le myocarde est la phosphorylation oxydative.

Un calcul simple permet de mieux appréhender l'importance vitale des processus de contrôle et d'intégration de l'utilisation des substrats énergétiques, de la respiration mitochondriale, du métabolisme des phosphates à haute énergie et de l'activité mécanique du myocarde. La vitesse d'utilisation de l'ATP par le myocarde varie entre 0,66mmol/s/g tissu au repos et 2,35mmol/s/g tissu en condition de travail élevé (Kobayashi and Neely 1979). Le contenu intramyocytaire en ATP et en phosphocréatine se situent respectivement, dans les études réalisées dans notre laboratoire comme dans la littérature, aux alentours de 10mM et 25mM. Cela signifie que pour une vitesse moyenne d'utilisation de l'ATP de 1mmol/s/g tissu, le pool d'ATP intracellulaire doit être resynthétisé douze fois par minute (Polimeni and Buraczewski 1988). Même si l'on additionne le pool de phosphocréatine au pool d'ATP, le pool de phosphates à haute énergie est renouvelé 3 à 4 fois par minute par un cœur au «repos». En d'autres termes, les réserves intracellulaires en phosphates à haute énergie ne permettent au cœur de battre que quinze secondes. Ceci illustre pourquoi la synthèse d'ATP doit être contrôlée avec beaucoup de précision. L'existence de cette relation directe, nécessaire, entre le travail mécanique du myocarde (développement d'une pression) et sa production d'énergie chimique (reflétée par la consommation en oxygène) a été montrée expérimentalement il y a plus de quarante ans par les travaux devenus classiques de Neely (Neely, Liebermeister et al. 1967).

Dans ces conditions, la survenue d'une ischémie myocardique, diminuant la capacité de synthèse de l'ATP par le myocarde, va compromettre instantanément la fonction contractile du myocarde, la survie des cardiomyocytes et, *in fine*, celle de l'individu.

La machinerie métabolique cardiaque est complexe et peut être schématiquement segmentée en trois étapes (**Figure 5**).

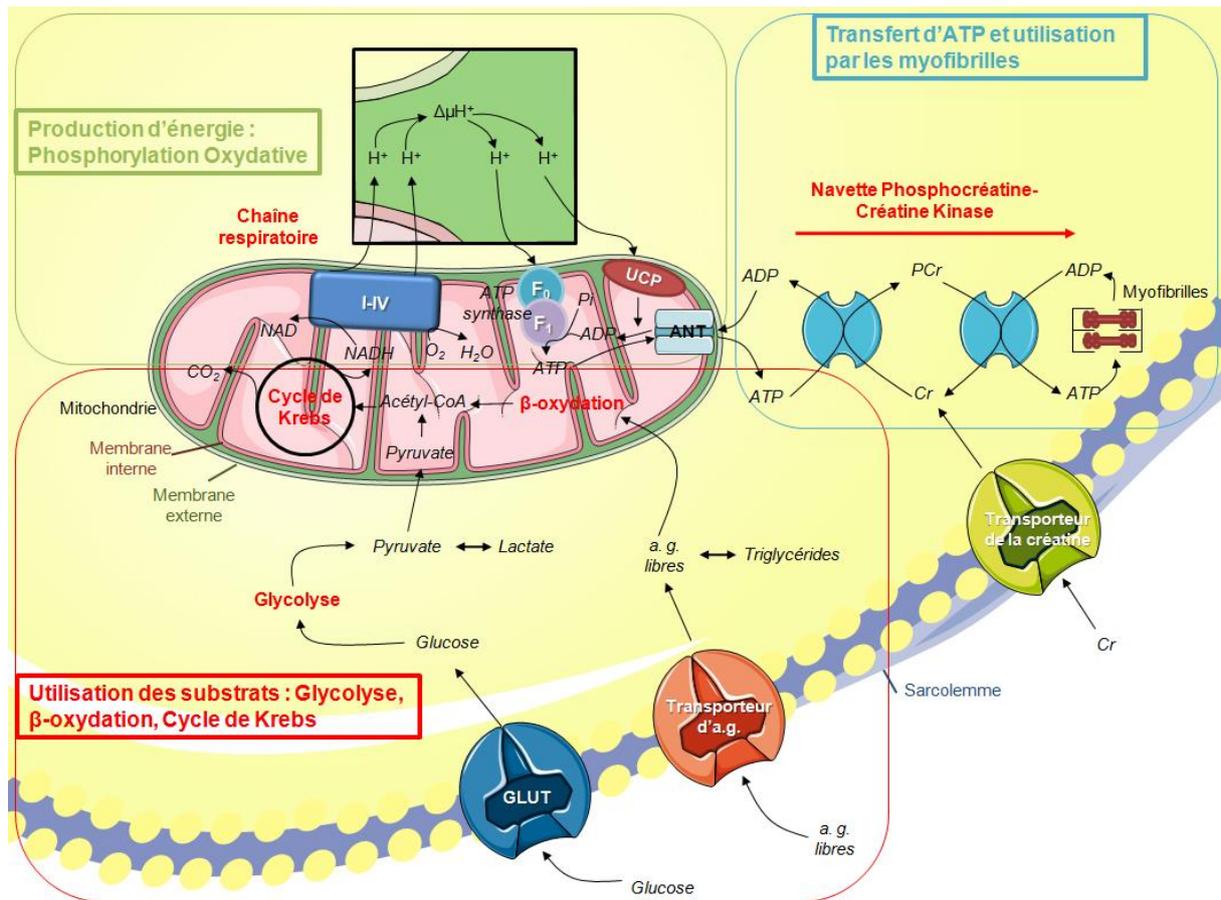


Figure 5- Métabolisme énergétique cardiaque.

Le métabolisme énergétique cardiaque a trois composants : l'utilisation des substrats (cadre rouge), la production d'énergie (cadre vert) et le transfert d'ATP vers les sites de consommation (cadre bleu). a.g., acides gras ; Cr, créatine ; PCr, phosphocréatine.

1.2.b.α.ii- L'utilisation de substrats énergétiques

La connaissance des facteurs contrôlant l'utilisation par le myocarde des substrats énergétiques provient essentiellement des travaux menés dans ce domaine, en grande partie sur cœur isolé, à la fin des années 1960 et dans les années 1970 (Opie 1968; Opie 1969; Opie 1969; Neely and Morgan 1974) et plus récemment grâce à la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (Chance, Seeholzer et al. 1983; Weiss, Chacko et al. 1989).

La régulation *in vivo*, en condition d'oxygénation normale, du métabolisme myocardique des hydrates de carbone est un processus complexe. Elle est étroitement liée à la concentration plasmatique des différents substrats énergétiques, à l'état hormonal et nutritionnel, ainsi qu'au niveau de la performance mécanique développée. Les cardiomyocytes oxydent essentiellement des acides gras provenant du plasma et du catabolisme de triacylglycérol contenu dans le cytoplasme, ainsi que du pyruvate formé à partir de la glycolyse ou du

lactate (**cadre rouge de la Figure 5**). Les flux traversant ces différentes voies du métabolisme intermédiaire sont étroitement liés au travail mécanique développé par le myocarde, lui même directement conditionné par l'apport en oxygène et la vitesse de la phosphorylation oxydative.

1.2.b.α.iii- La phosphorylation oxydative

L'oxydation des substrats énergétiques aboutit dans un premier temps à la formation d'acétyl CoA, secondairement métabolisé dans le cycle de Krebs. Ces différentes étapes aboutissent finalement à la formation d'équivalents réducteurs (NADH₂ et FADH₂) eux-mêmes oxydés par la chaîne respiratoire mitochondriale dont les différents constituants (NADH déshydrogénase, succinate coenzyme Q-réductase, les cytochromes b-c₁ et la cytochrome c oxydase) se situent au niveau de la face interne de la membrane mitochondriale interne, en association avec des transporteurs d'électrons comme l'ubiquinone ou le cytochrome c (**cadre vert de la Figure 5**). L'énergie tirée de ces réactions d'oxydoréduction (transfert d'électrons) est utilisée pour l'extrusion des ions H⁺ hors de la mitochondrie. Un gradient de potentiel électrochimique de protons ($\Delta\mu_{H^+}$) est ainsi créé de part et d'autre de la membrane mitochondriale. Celui-ci a deux composantes :

- un gradient chimique : ΔpH
- un gradient électrique : $\Delta\Psi$

tels que : $\Delta\mu_{H^+} = \Delta\Psi - 2,3 \times RT/F \times \Delta pH$

R : constante des gaz parfaits ; F : constante de Faraday ; T température (°K)

La synthèse d'adénine nucléotide triphosphate (ATP) est alors possible grâce à l'ATP synthétase qui couple la phosphorylation de l'ADP au retour des protons vers la matrice mitochondriale à travers la membrane mitochondriale.

Cependant le rendement de ce système dépend de l'importance des fuites de protons, qu'elles soient dues à la perméabilité naturelle de la membrane interne ou aux protéines découplantes (UCP). Le maintien de ce $\Delta\Psi$ est primordial. En effet, une chute de ce potentiel entraîne rapidement un mauvais fonctionnement de la mitochondrie et de la cellule, pouvant induire nécrose ou apoptose (Aon, Cortassa et al. 2008; Aon, Cortassa et al. 2009).

1.2.b.α.iv- Le transfert énergétique de la mitochondrie aux sites d'utilisation

La dernière étape est le transfert d'ATP et son utilisation par les myofibrilles (**cadre bleu de la Figure 5**). L'ATP synthétisé au niveau de la mitochondrie est « transporté » vers les différents sites d'utilisation par le système Phosphocréatine/créatine kinase qui couple,

au niveau mitochondrial, la respiration à la formation de phosphocréatine (PCr), et au niveau des sites d'utilisation de l'énergie, l'hydrolyse de l'ATP à la synthèse de créatine.

Il est établi depuis maintenant plus de quarante ans que la phosphorylcréatine est le principal « réservoir » en phosphate à haute énergie dans le muscle strié (Cain and Davies 1962). Contrairement à la concentration en ATP, la concentration en PCr varie en fonction du travail ou même du substrat utilisé.

Grâce à la technique de transfert de saturation, la vitesse de la réaction de rephosphorylation de l'ADP à partir de la PCr a pu être mesurée chez plusieurs espèces (Bittl and Ingwall 1985; Neubauer, Hamman et al. 1988). Ces mesures établissent que la vitesse de synthèse de l'ATP par la voie de la CK est environ 10 fois supérieure à la vitesse de synthèse par les autres voies (phosphorylation oxydative + glycolyse + utilisation de nucléobases, nucléotides, ou nucléotides préformés + synthèse *de novo*). Ainsi, par le biais d'une rephosphorylation rapide de l'ADP à partir de la PCr, la concentration en ATP est maintenue constante aux dépens de la concentration en PCr.

Le rôle physiologique joué par la navette phosphocréatine kinase/phosphocréatine au niveau des mécanismes bioénergétiques de la contraction musculaire a été un sujet de débats intenses entre physiologistes et biochimistes (Cain and Davies 1962). L'identification de l'isoenzyme de la créatine kinase (Jacobs, Heldt et al. 1964), la possibilité de stimuler la respiration mitochondriale par la créatine (Bessman and Fonyo 1966) et la proposition d'une compartimentation des nucléotides de l'adénine (Gudbjarnason, Mathes et al. 1970), ont conduit au concept de système de transport de l'énergie par la créatine kinase, baptisé par les anglo-saxons *phosphocreatine shuttle* (navette phosphocréatine) en raison de sa capacité à transférer rapidement les substrats du métabolisme énergétique des sites de production aux sites d'utilisation et inversement (**cadre bleu de la Figure 5**).

Dans ce système de transport (ou de transfert) de l'énergie, l'isoforme mitochondriale de la créatine kinase (mCK), située sur la face externe de la membrane mitochondriale interne, couple la production de phosphocréatine à la phosphorylation oxydative (Jacobus and Diffley 1986). L'ADP ainsi généré, est transporté au niveau de la matrice mitochondriale par la translocase (Gellerich and Saks 1982). À l'autre bout du système de transfert, des isoenzymes de la créatine kinase (MM, MB, BB) sont liés au réticulum sarcoplasmique (Sharov, Saks et al. 1977), au sarcolemme (Saks, Lipina et al. 1977) et à la bande M des myofibrilles (CK_{myo}) (Kuznetsov, Tiivel et al. 1996; Saks, Ventura-Clapier et al. 1996). À ces différents niveaux, l'ADP est rephosphorylé par la créatine kinase pour produire l'ATP nécessaire au processus de transports ioniques et à la contraction.

De ce fait, le ratio PCr / ATP représente un très bon indicateur du métabolisme énergétique cardiaque et a été proposé comme indice pronostique dans certaines cardiopathies. Une valeur inférieure à 1.6 correspond à un fort risque de mortalité chez des patients atteints d'une cardiomyopathie dilatée. L'analyse *in vivo* par la spectroscopie par résonance magnétique au phosphore 31 (^{31}P -RMN) (Conway, Allis et al. 1991) des quantités d'ATP et de PCr dans les tissus reste problématique en raison de l'instabilité de ces molécules.

1.2.b.β- Perturbations du métabolisme énergétique du myocarde en conditions ischémiques

Durant l'ischémie, l'apport en oxygène au niveau de la chaîne respiratoire n'est plus satisfait. L'ischémie myocardique entraîne ainsi d'importantes perturbations du métabolisme des acides gras. On observe en effet une augmentation du contenu intracellulaire en acyl-CoA et en acyl-carnitine associé à une diminution du contenu en acétyl-CoA, avec des conséquences délétères pour le cardiomyocyte. En effet, la dissolution de l'acyl-carnitine dans les membranes cellulaires peut moduler leur fluidité et ainsi altérer les transports ioniques, et constituer le substrat des arythmies cardiaques (Lopaschuk, Hansen et al. 1986; van der Vusse, Glatz et al. 1992).

La réduction du contenu en acétyl-CoA engendre la diminution des équivalents réducteurs disponibles pour la phosphorylation oxydative (Solaini and Harris 2005). On observe alors une accumulation dans le cytoplasme de NADH, avec un ratio NADH/NAD⁺ très élevé (**Figure 6A**).

La poursuite de l'hydrolyse de l'ATP, en l'absence de phosphorylation oxydative, conduit à une chute rapide du contenu en ATP et en phosphocréatine associée à une élévation du contenu en ADP, en phosphates inorganiques et en ions H⁺ (pH=5.5-6 après 30min d'ischémie). L'ensemble de ces phénomènes conduit à une déplétion des réserves énergétiques intracellulaires et à une diminution de l'énergie libre de l'hydrolyse de l'ATP.

On assiste parallèlement à une chute du potentiel électrochimique en protons et à une inversion du fonctionnement de la F₁-F₀ ATPase. Ainsi, en ischémie, la mitochondrie passe du statut de producteur d'ATP à celui de consommateur et participe ainsi à la déplétion des réserves énergétiques intracellulaires (**Figure 6A**).

L'hydrolyse de l'ATP induit également une augmentation de la production d'adénosine (sous-produit de la dégradation de l'ATP) suivie de sa dégradation en inosine et

hypoxanthine. Tous ces sous-produits sont susceptibles de passer dans le milieu extracellulaire et donc de faire défaut lors de la resynthèse ultérieure de l'ATP.

La concentration cytosolique en ATP peut cependant être maintenue, dans certains compartiments et transitoirement, grâce à la glycolyse anaérobie (2 molécules d'ATP fournies par molécule de glucose). Cependant, la survenue de l'acidose durant l'ischémie va rapidement inhiber la glycolyse, et réduire considérablement l'efficacité de cette voie métabolique.

Ces perturbations majeures du métabolisme énergétique myocardique en conditions d'ischémie sont à la base de profondes altérations de la fonction contractile et de la relaxation (phénomènes consommateurs d'ATP) ainsi que de perturbations des échanges ioniques trans-sarcolemmaux rendant le cardiomyocyte incapable de maintenir les gradients ioniques physiologiques.

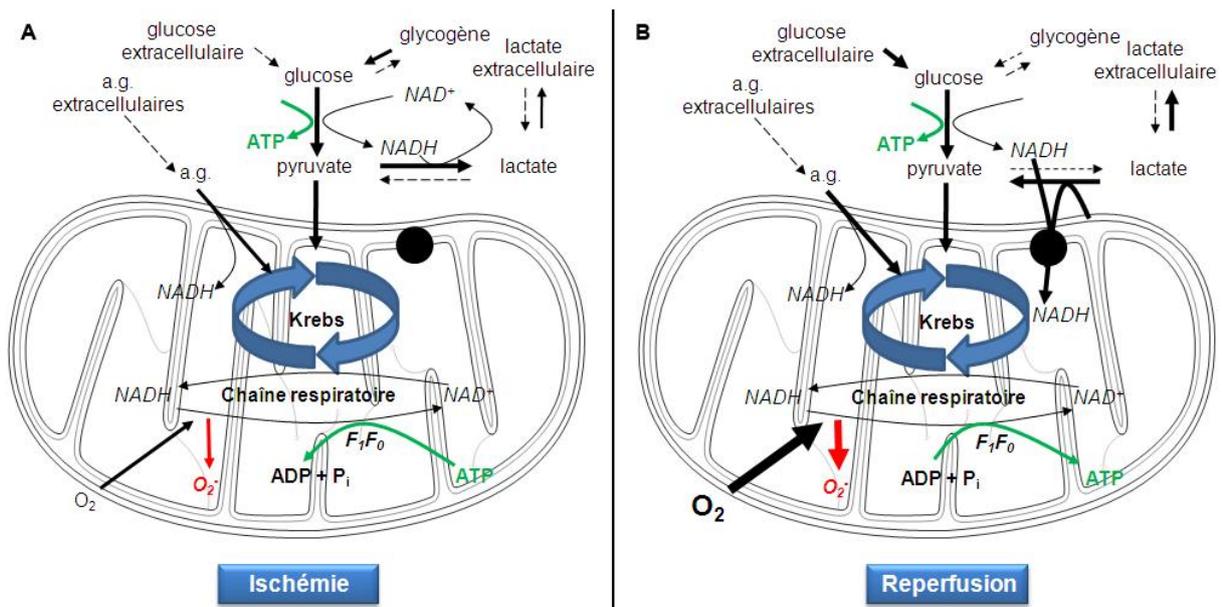


Figure 6- Métabolisme énergétique de la mitochondrie durant (A) l'ischémie et (B) la reperfusion.

Durant l'ischémie, le cycle de Krebs est bloqué et la phosphorylation oxydative ne dispose plus des besoins énergétiques nécessaires. Durant la reperfusion, un très fort stress oxydant se met en place. Figure adaptée de Solaini (2005).

I.2.c- L'homéostasie calcique intracardiomyocytaire et le couplage excitation-contraction

I.2.c.α- L'homéostasie calcique intracardiomyocytaire en conditions normoxiques

Le calcium a un rôle critique dans les propriétés électriques et mécaniques des cardiomyocytes (Shannon, Pogwizd et al. 2003; Bers, Despa et al. 2006). Ainsi, les mouvements calciques jouent un rôle majeur dans le couplage excitation-contraction (CEC), en particulier dans le cas du cœur dont l'activité contractile est constante.

Durant la *systole*, le potentiel d'action (PA) va être le déclencheur du CEC dans les myocytes ventriculaires. La dépolarisation initiale, d'origine majoritairement sodique, va activer des canaux calciques lents entraînant la libération du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique (RS). Ce processus de libération de calcium induite par le calcium (*calcium-induced calcium release*) augmente alors fortement la concentration calcique du cytosol, engendrant la fixation de celui-ci sur les myofilaments au niveau de la troponine C, ce qui active ainsi le raccourcissement des sarcomères et donc la contraction des myofibrilles (**flèches rouges sur Figure 7**).

Durant la *diastole*, le calcium cytosolique doit être exporté afin de permettre sa dissociation de la troponine C, entraînant ainsi la relaxation des myofibrilles. Cette diminution de concentration calcique intracellulaire est due à (**flèches vertes sur Figure 7**) :

- La Ca^{2+} -ATPase sarcoplasmique (SERCA), qui va repomper le calcium cytosolique vers le réticulum sarcoplasmique, en consommant de l'ATP. La SERCA peut être inhibée par le phospholamban (PLB) (Huang, Shan et al. 2006; Curran, Hinton et al. 2007).
- L'échangeur Na^+ - Ca^{2+} sarcolemmal (NCX), qui va faire sortir un ion Ca^{2+} contre l'entrée de trois ions Na^+ .
- La Ca^{2+} -ATPase sarcolemmale, qui va expulser des ions Ca^{2+} hors de la cellule, en consommant de l'ATP.
- L'uniport calcique mitochondrial (MCU) qui va repomper le calcium vers la mitochondrie.

En conditions physiologiques, la SERCA va recapter environ 70% du calcium cytosolique, alors que 30% est expulsé par l'échangeur NCX. Seulement 1% de ce calcium est véhiculé par la Ca^{2+} -ATPase sarcolemmale et le MCU, qui sont considérés comme des mécanismes relativement lents par rapport à la SERCA et au NCX.

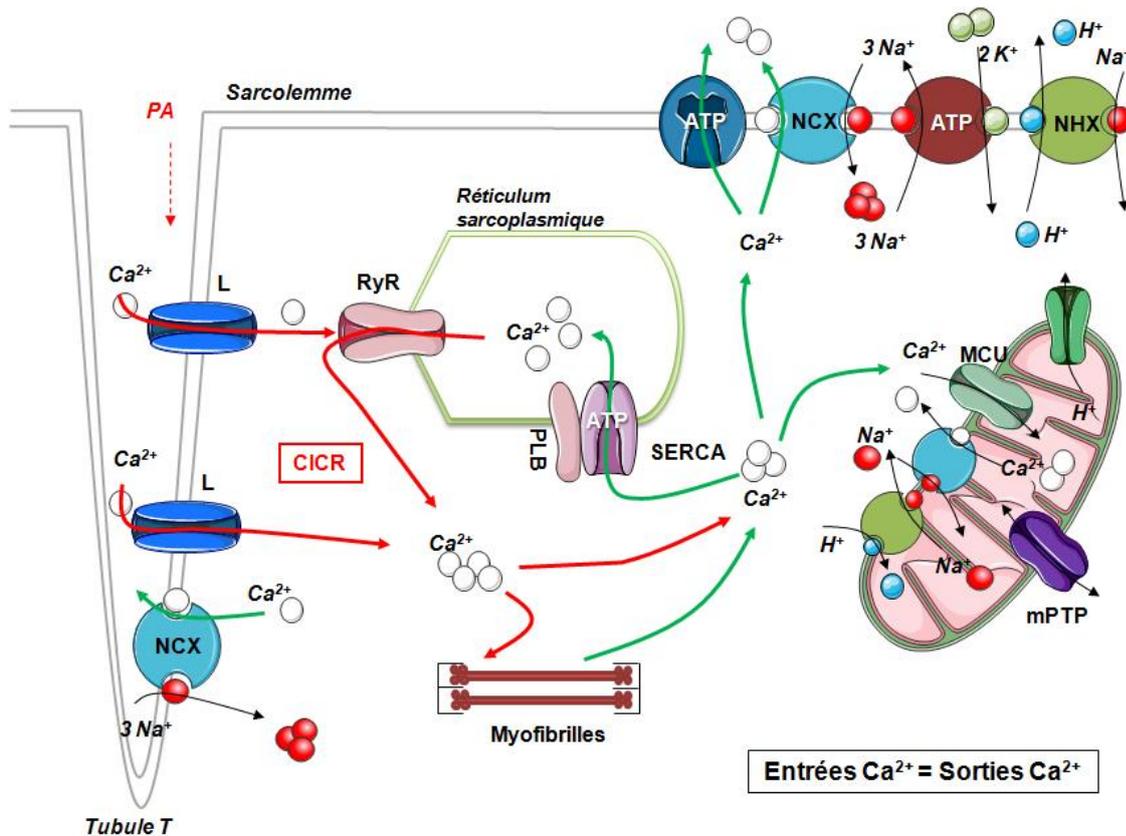


Figure 7- Couplage excitation-contraction : le rôle de l'homéostasie calcique.

Durant la systole (flèches rouges), le calcium est mobilisé à l'intérieur de la cellule, afin de permettre la contraction des myofibrilles. Lors de la diastole (flèches vertes), la majorité du calcium est repompée dans le réticulum sarcoplasmique, ou exportée hors de la cellule *via* des pompes calciques. Figure inspirée de Bers (2006).

Les entrées calciques doivent être égales aux sorties calciques durant le cycle systole/diastole (**Figure 7**) (Lehnart 2007). Cette homéostasie calcique est fortement perturbée en cas d'ischémie myocardique.

1.2.c.β- Perturbations de l'homéostasie calcique du myocarde en conditions ischémiques

On assiste, lors de l'ischémie, à une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} dont l'origine est multifactorielle. En premier lieu, il apparaît que l'activité de la calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et, par voie de conséquence la

vitesse maximale de recapture du calcium, diminuent (Kaplan, Hendrikx et al. 1992). Cette perte d'activité ATPasique est elle-même multifactorielle. Elle peut avoir pour origine une dérégulation du cycle phosphorylation/déphosphorylation (Netticadan, Temsah et al. 2000) ; une altération de l'enzyme liée à la production de radicaux libres de l'oxygène (Kukreja, Kearns et al. 1991) ; des mécanismes thermodynamiques liés à la baisse de l'énergie libre de l'hydrolyse de l'ATP. En second lieu, si dans le cytosol la majorité des ions calciques sont liés à des protéines, l'acidification intracellulaire induite par l'ischémie va favoriser un relargage de ces ions *via* une compétition avec les ions H⁺ (Gambassi, Hansford et al. 1993). Enfin, il apparaît que l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium implique l'échangeur Na⁺/Ca²⁺. Pendant l'ischémie l'augmentation de la concentration intracellulaire en sodium diminue le fonctionnement de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ qui relargue alors moins de calcium dans le milieu extracellulaire (Tani and Neely 1989).

I.2.d- Stress oxydant en conditions d'ischémie

La production d'espèces oxygénées réactives (ROS) pendant l'ischémie a été mise en évidence sur divers modèles expérimentaux allant du cardiomyocytes isolés au cœur isolé-perfusé (Kevin, Camara et al. 2003; Pasdois, Beauvoit et al. 2007; Pasdois, Quinlan et al. 2007; Pasdois, Beauvoit et al. 2008). La production de ROS ne semble donc pas être uniquement associée à la phase de reperfusion du myocarde.

Le mécanisme de cette production de ROS lors de l'ischémie paraît, de toute évidence, multifactoriel. L'origine de ces ROS est principalement mitochondriale (Boveris, Oshino et al. 1972) et plus précisément au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Turrens and Boveris 1980; Solaini and Harris 2005). Les mécanismes de cette production de ROS restent obscurs. Cependant, au niveau du complexe III, le cycle des quinones paraît impliqué dans la mesure où son inhibition partielle par l'antimycine A favorise la production de ROS (Loschen, Azzi et al. 1973) alors que son inhibition complète par le myxothiazol bloque cette production (Ksenzenko, Konstantinov et al. 1983). En ce qui concerne la production de ROS au niveau du complexe I, elle implique vraisemblablement un centre fer/souffre (Lenaz 2001). Enfin, certains travaux impliquent le complexe II de la chaîne respiratoire par un mécanisme d'auto-oxydation des flavoprotéines (Zhang, Yu et al. 1998; McLennan and Degli Esposti 2000).

Cette production de ROS par la mitochondrie peut secondairement induire des effets délétères sur cette dernière. Il apparaît en effet que la diminution de respiration observée

après ischémie est associée à une diminution du taux de cardiolipine, très sensible au stress oxydant, dans la fraction membranaire mitochondriale. Ainsi, il a été proposé que les ROS produits pendant l'ischémie altèrent la composition des membranes mitochondriales et contribuent donc au dysfonctionnement de la cytochrome c oxydase. En effet, les mitochondries isolées à partir de cœur de lapin ayant subi une ischémie globale de 15, 30 ou 45min, présentent une diminution progressive de la respiration, lorsqu'elle est mesurée sur des substrats (TMPD + ascorbate) qui fournissent des électrons à la cytochrome c oxydase (complexe IV) (Lesnefsky, Slabe et al. 2001).

I.2.e- La reperfusion

Outre le phénomène de sidération myocardique, la reperfusion s'accompagne parfois :

- D'un phénomène de *no-reflow* par lequel des altérations de la microcirculation compromettent la restauration du flux sanguin coronaire (Niccoli, Marino et al. 2010).
- D'arythmies de reperfusion, potentiellement à l'origine de mort subite (Birnbaum, Leor et al. 1997).
- De lésions létales de reperfusion entraînant une mort cellulaire. Ce chapitre portera essentiellement sur ce point qui est au centre de notre problématique.

C'est en 1960 que Jennings a émis l'hypothèse de l'existence de lésions de reperfusion (Jennings, Sommers et al. 1960). La preuve de cette « nécrose de reperfusion », qui pourrait dans certaines conditions expérimentales compter pour 50% de la taille finale de l'infarctus, a été apportée par la démonstration que des interventions appliquées au moment de la reperfusion sont capables de réduire considérablement son étendue (**Figure 8**) (Garcia-Dorado and Piper 2006).

En effet, si la nécessité de la reperfusion pour limiter la mort cellulaire causée par une ischémie sévère est bien démontrée, cette dernière engendre néanmoins quelques phénomènes néfastes qui peuvent limiter ses effets bénéfiques. Après reperfusion, les cellules ischémiques développent souvent et brutalement des changements ultra-structuraux indiquant la mort cellulaire : un bombement « explosif » et une désorganisation architecturale (Jennings, Schaper et al. 1985; Steenbergen, Hill et al. 1985). S'il est possible que la plupart des cellules myocytaires pour lesquelles la nécrose, accélérée par la reperfusion, étaient déjà irréversiblement détériorée, on ne peut exclure que la reperfusion puisse être à l'origine d'un processus de mort pour des cellules qui n'étaient pas irréversiblement altérées suite à l'ischémie myocardique (Jennings, Schaper et al. 1985). Les travaux les plus récents sur les

mécanismes de cette mort cellulaire insistent sur le rôle déterminant que jouerait l'ouverture d'un pore de transition de perméabilité, au niveau de la membrane mitochondriale, en réponse à l'élévation brutale du calcium mitochondrial et du stress oxydant.

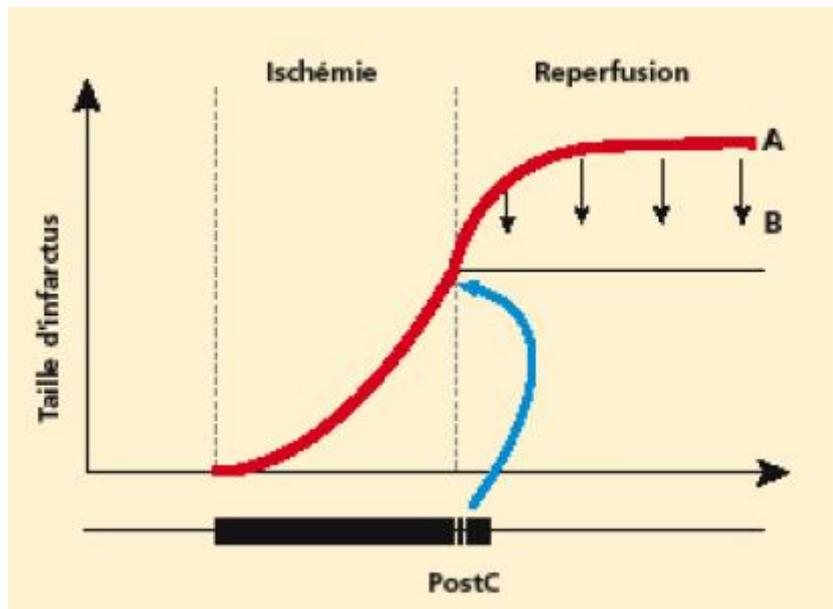


Figure 8- Taille d'infarctus en fonction de la durée d'ischémie et conséquences de la reperfusion.

Durant l'ischémie-reperfusion myocardique, une partie des cardiomyocytes est irréversiblement lésée. Néanmoins, une part importante de l'infarctus est due à des lésions initiées à la reperfusion, touchant du myocarde encore viable à la fin de l'ischémie. Cette nécrose de reperfusion peut être considérablement diminuée par une intervention de type postconditionnement. Figure adaptée de <http://www.consensus-online.fr/spip.php?article832>.

Dès le début de la reperfusion, la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP reprennent, causant au moins trois mécanismes délétères au niveau intracellulaire (**Figure 9**):

- Une *surcharge calcique* cytosolique puis mitochondriale, consécutive aux mécanismes compensateurs de l'excès de protons (**cadre vert de la Figure 9**).
- Un *stress radicalaire intense* correspondant à une production excessive de radicaux libres de l'oxygène (ROS) par une chaîne respiratoire mitochondriale lésée lors de l'ischémie et brutalement soumise à une réoxygénation (**cadre jaune de la Figure 9**).
- Une *rapide correction de cette acidose*, avec même une tendance transitoire à l'alcalose intracellulaire (**cadre bleu de la Figure 9**) (Yellon and Hausenloy 2007).

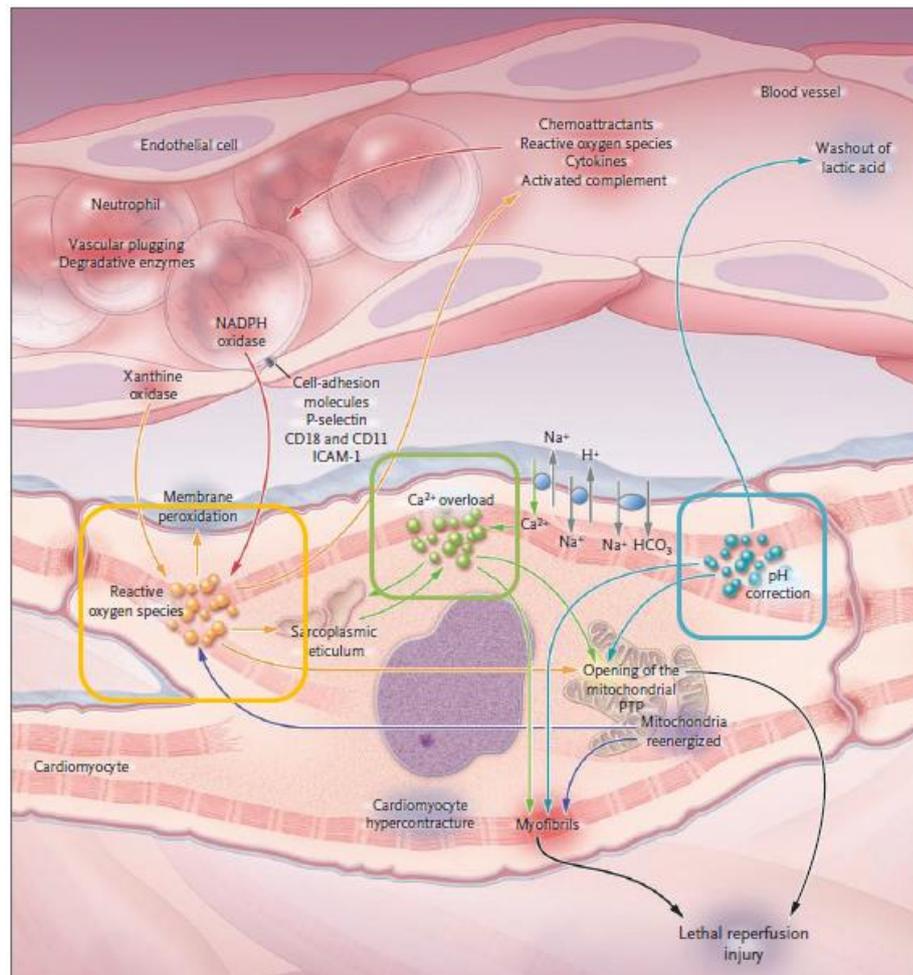


Figure 9- Médiateurs principaux de la mort cellulaire causée par la reperfusion.

Les principaux déclencheurs de cette mort cellulaire liée à la reperfusion sont le stress oxydant, avec une production de ROS importante, une surcharge calcique et une alcalinisation. Figure issue de Yellon et al. (2007).

1.2.e.α- La majoration brutale de la surcharge calcique

Lors de la reperfusion, la correction rapide du pH intracellulaire, par le biais notamment de l'échangeur Na^+/H^+ , est accompagnée par un influx massif de calcium lié à l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Opie 1991). Dans un modèle de cœur isolé, cette augmentation de calcium intracellulaire se caractérise par une hypercontracture des myocytes et une augmentation brutale de la pression diastolique (Dos Santos, Kowaltowski et al. 2002). Celles-ci s'accompagnent d'un relargage important d'enzymes cytosoliques (lactate déshydrogénase, créatine phosphokinase) témoignant des lésions irréversibles causées par la séquence d'ischémie-reperfusion sur l'intégrité physique du sarcolemme (Masini, Giannella et al. 1987).

Dans ce contexte, Bond et al. ont montré que la réoxygénation avec un tampon acide diminue la surcharge calcique en réoxygénation et protège des cardiomyocytes de rats néonataux vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion (Bond, Herman et al. 1991).

1.2.e.β- La majoration brutale du stress oxydant

La reperfusion est associée à une augmentation très forte de la production de ROS (**Figure 6B**), qui doit son origine au complexes I et III de la chaîne respiratoire (Kevin, Camara et al. 2003; Solaini and Harris 2005; Zweier and Talukder 2006). Lorsque la chaîne respiratoire est inhibée par le manque d'oxygène, l'ubiquinone est partiellement réduite en ubisemiquinone, qui peut ainsi réagir avec l'oxygène présent lors de la reperfusion et ainsi produire des ions superoxydes. Ces ions superoxydes vont ensuite être réduits en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase.

Les protéines mitochondriales sont extrêmement sensibles aux dommages induits par les ROS qui peuvent induire un découplage de la chaîne respiratoire (Dos Santos, Laclau et al. 2004; Solaini and Harris 2005), en agissant spécifiquement sur les complexes I et III.

Les ROS peuvent également entraîner l'oxydation du glutathion, qui va alors former des ponts disulfures avec d'autres protéines. Ce type de modification pourrait avoir un effet délétère sur les pompes ioniques. Les ROS peuvent aussi entraîner la peroxydation des acides gras insaturés des phospholipides, et plus spécifiquement des cardiolipines de la membrane interne mitochondriale, aggravant ainsi l'inhibition de la chaîne respiratoire (Petrosillo, Ruggiero et al. 2003).

Au final, les effets combinés des ROS et de la forte concentration calcique jouent un rôle critique dans le degré d'importance des dommages liés à la reperfusion.

1.2.c.γ- Intégrité mitochondriale en situation d'ischémie-reperfusion

Dans les conditions physiologiques normales, la membrane mitochondriale interne est pratiquement totalement imperméable. En revanche, dans des conditions de stress extrême, comme lors d'une ischémie sévère suivie de reperfusion, un pore non spécifique peut s'ouvrir au sein de cette membrane, sous l'influence de la surcharge calcique brutale et du stress oxydant. Il s'agit du pore de transition de perméabilité mitochondrial ou mPTP, qui autorise le passage de molécules de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa.

Lors de la reperfusion plusieurs phénomènes favorisent l'ouverture du mPTP, notamment la surcharge calcique mitochondriale liée à l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, la diminution du potentiel membranaire $\Delta\Psi$, l'augmentation des phosphates inorganiques secondaire à l'hydrolyse de

l'ATP et la production de ROS.

L'ouverture du mPTP est à l'origine de la perte de perméabilité de la membrane interne, qui va avoir plusieurs conséquences délétères pour le cardiomyocyte. Tout d'abord, les protons vont pouvoir diffuser librement à travers la membrane interne et ainsi causer le découplage de la phosphorylation oxydative. Ce découplage va participer à l'inversion du fonctionnement de l'ATP synthase qui va limiter la chute du gradient transmembranaire en H^+ aux dépens d'une hydrolyse d'ATP. Les concentrations en ATP intracellulaires vont alors rapidement diminuer, engendrant une perte de l'homéostasie ionique et métabolique, et l'activation d'enzymes de dégradation, telles que les phospholipases, les nucléases et les protéases. Si le pore n'est pas refermé, ces changements vont causer des dommages cellulaires irréversibles, résultant, *in fine*, en une nécrose.

L'ouverture du mPTP est aussi à l'origine d'un gonflement matriciel pouvant entraîner la rupture des membranes mitochondriales. Ce gonflement est dû à la perte du contrôle de l'homéostasie avec entrée d'eau osmotiquement liée dans la matrice (Solaini and Harris 2005). Une fois rompue, des facteurs proapoptotiques, normalement situés dans l'espace intermembranaire, peuvent être libérés dans le cytosol. C'est le cas du cytochrome c, qui en conditions normales a un rôle de distribution des électrons dans la chaîne respiratoire, mais qui une fois dans le cytosol peut participer à une cascade d'événements conduisant à la mort de la cellule (Halestrap, Clarke et al. 2007).

On comprend ainsi toute l'importance de la mitochondrie, organe indispensable à la vie des cellules eucaryotes, mais ayant aussi lors de la reperfusion un rôle décisif dans l'induction de la mort cellulaire.

II-Mort Cellulaire et Ischémie-Reperfusion

Sommaire

II.1- Apoptose.....	- 39 -
II.1.a- Apoptose	- 39 -
II.1.a.α- La voie extrinsèque de l'apoptose.....	- 39 -
II.1.a.β- La voie intrinsèque de l'apoptose.....	- 40 -
II.1.b- Apoptose et infarctus du myocarde.....	- 42 -
II.1.b.α- Voie extrinsèque de l'apoptose et infarctus du myocarde	- 42 -
II.1.b.β- Voie intrinsèque de l'apoptose et infarctus du myocarde	- 43 -
II.2- Nécrose.....	- 44 -
II.2.a- Nécrose	- 44 -
II.2.a.α- Nécrose par les récepteurs de mort.....	- 44 -
II.2.a.β- Nécrose impliquant le mPTP.....	- 45 -
II.2.a.γ- Nécrose impliquant le calcium et les protéases	- 45 -
II.2.b- Nécrose et infarctus du myocarde	- 46 -
II.3- Autophagie.....	- 47 -
II.3.a- Autophagie	- 47 -
II.3.b- Autophagie et infarctus du myocarde	- 48 -
II.3.b.α- Autophagie et ischémie prolongée.....	- 48 -
II.3.b.β- Autophagie et reperfusion.....	- 49 -

La mort cellulaire consécutive à l'ischémie-reperfusion est susceptible de survenir selon différentes modalités :

- **Apoptose** : Il s'agit d'un processus de mort cellulaire programmée. L'apoptose se définit morphologiquement par la condensation du cytoplasme, la marginalisation de la chromatine sous la membrane nucléaire et l'apparition de bourgeons membranaires contenant des fragments nucléaires donnant naissance à des corps apoptotiques destinés à être phagocytés par des macrophages tissulaires. Sur le plan moléculaire, l'ADN est fragmenté en multiples segments d'environ 180pb par clivage spécifique entre nucléosomes.

Lorsque la cellule et les corps apoptotiques ne sont pas rapidement phagocytés, l'apoptose se transforme en nécrose (de Moissac, Gurevich et al. 2000; Lopez-Neblina, Toledo et al. 2005; Stoka, Turk et al. 2006).

- **Nécrose** : Elle se caractérise par l'altération précoce des membranes, le gonflement des mitochondries, l'homogénéisation du cytoplasme et plus tardivement du noyau. La libération des composants cytoplasmiques qui en découle entraîne une réponse inflammatoire (Whelan, Kaplinskiy et al. 2010).

- **Autophagie** : L'autophagie est un mécanisme physiologique permettant de supprimer les organelles abimées, telles que le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Son rôle lors de l'IR reste malgré tout assez controversé. Certaines études montrent que l'inhibition de l'autophagie durant l'ischémie est néfaste, suggérant un rôle bénéfique de celle-ci durant l'ischémie (Yan, Vatner et al. 2005; Dosenko, Nagibin et al. 2006; Yan, Sadoshima et al. 2006). Au contraire, Tang et al. montrent qu'une diminution de la protéine beclin1 (protéine stimulant l'autophagie) réduit l'autophagie et la mort cellulaire consécutive à l'IR (Takagi, Matsui et al. 2007).

La mort cellulaire suivant l'IR est généralement un mélange d'apoptose, d'autophagie et de nécrose parmi lesquels la mitochondrie semble tenir un rôle très important, puisqu'elle intervient en tant que médiateur et régulateur de chacune de ces morts cellulaires (Murphy and Steenbergen 2008).

II.1- Apoptose

II.1.a- Apoptose

L'apoptose est une forme extrêmement contrôlée de mort cellulaire, régulée par deux voies de signalisation (**Figure 10**).

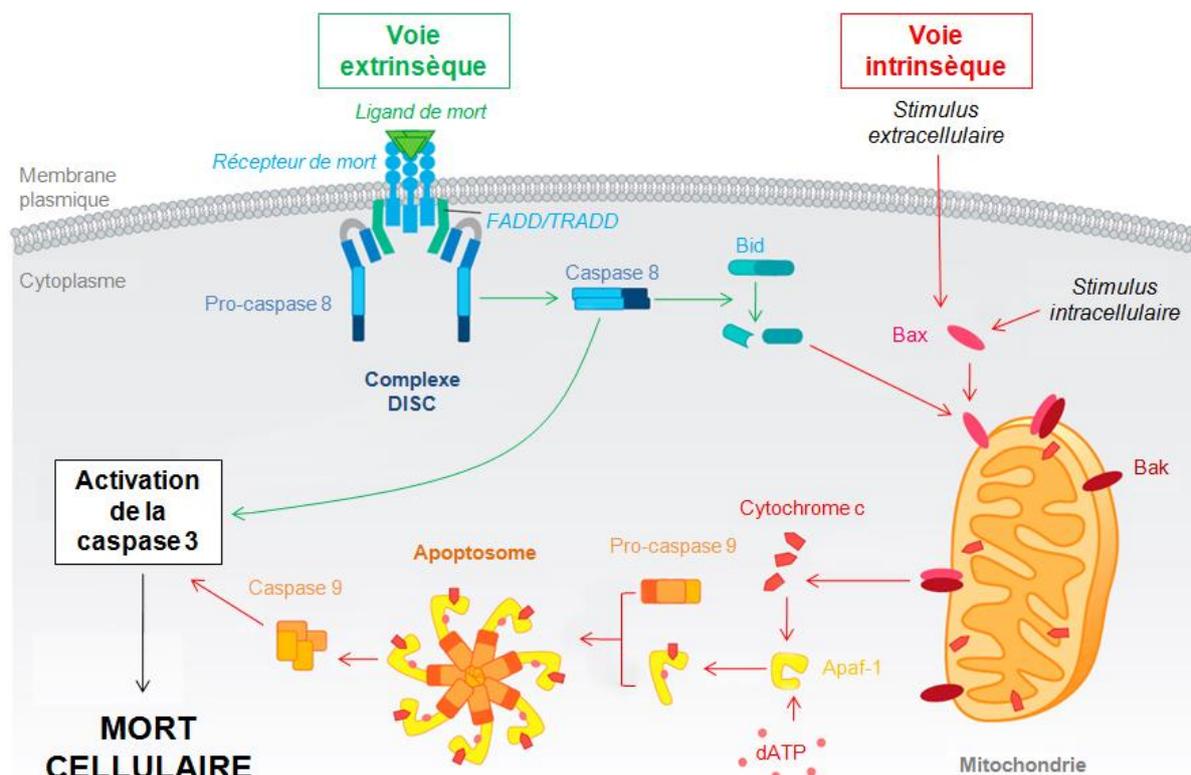


Figure 10- Signalisations de l'apoptose.

L'apoptose est régulée par une voie extrinsèque (en vert), utilisant des récepteurs de mort situés sur la membrane plasmique, et une voie intrinsèque (en rouge) nécessitant la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Figure adaptée de Whelan et al. (2010).

II.1.a.α- La voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose est caractérisée par la liaison de signaux solubles extracellulaires à leurs récepteurs spécifiques, permettant ainsi leur trimérisation (**Figure 11**). Cette polymérisation va entraîner la liaison de protéines adaptatrices (FADD, TRADD) au domaine intracellulaire de ces récepteurs. Cette liaison stimule l'autoclivage protéolytique des pro-caspases 8, 10 et 2 qui vont s'activer (Lopez-Neblina, Toledo et al. 2005). Le

complexe multiprotéique DISC (death-inducing signaling complex) ainsi formé va pouvoir activer, par clivage, les pro-caspases 3, 6 et 7, qui sont déjà dimérisées (**Figure 10**). Ces caspases vont pouvoir cliver des centaines de protéines structurales et régulatrices, mais aussi amplifier la réponse apoptotique en activant des médiateurs proapoptotiques, tels que Bid.

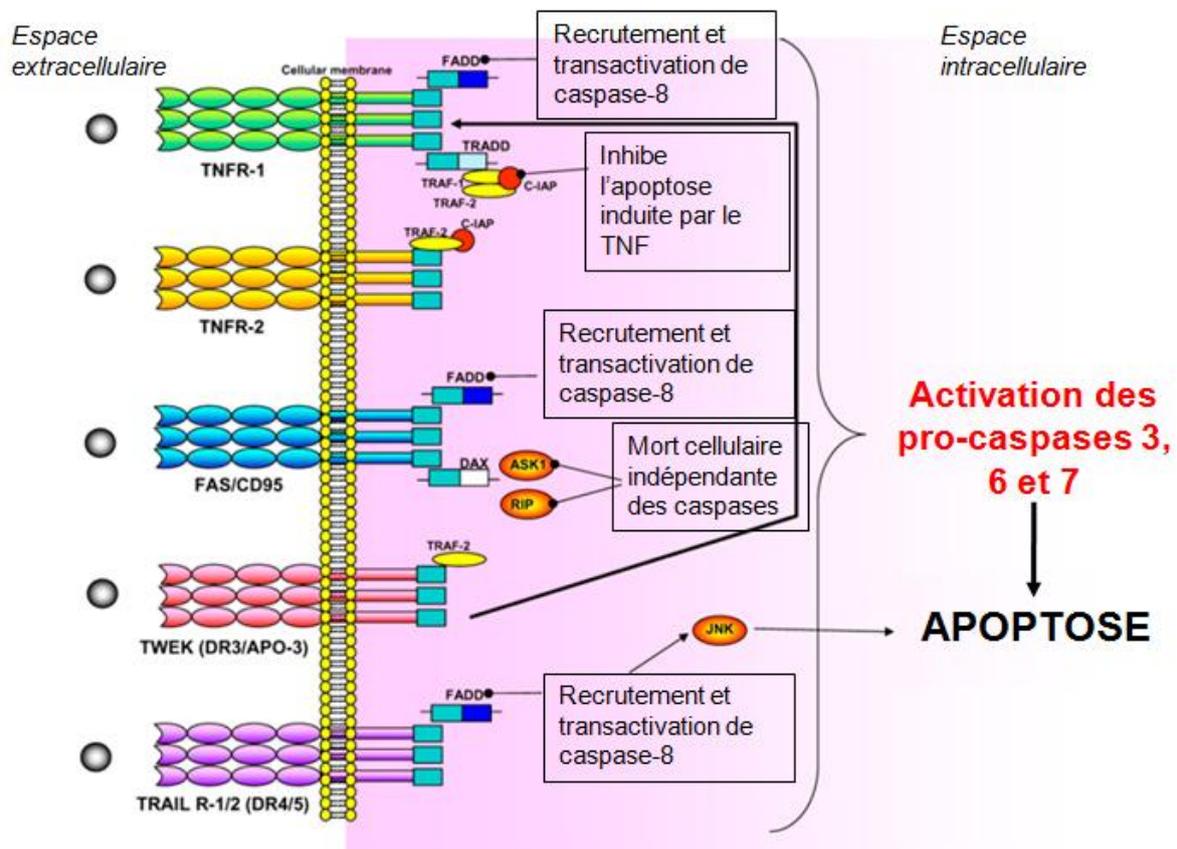


Figure 11- Éléments impliqués dans la voie extrinsèque de l'apoptose.
L'apoptose est ici dépendante de la liaison ligand/récepteur, engendrant l'activation des caspases. Schéma adapté de Lopez-Neblina et al. (2005).

II.1.a.β- La voie intrinsèque de l'apoptose

Contrairement à la voie extrinsèque, la voie intrinsèque de l'apoptose converge (1) sur la mitochondrie afin de permettre la libération de protéines apoptogènes et (2) sur le réticulum endoplasmique (RE) pour entraîner le relargage calcique.

Les signaux de mort sont transmis à la mitochondrie et au RE par deux classes de protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 : Bax (Bcl-2-associated X protein), une protéine proapoptotique à multidomaine et les protéines BH3 (Bcl-2 homology domain 3). Dans les

cellules saines, on retrouve un pool de protéines Bax dans le cytosol, en conformation inactive. Lors de stimuli apoptotiques, Bax change de conformation, devient active et se transloque à la mitochondrie et au RE. À l'opposé de Bax, les protéines BH3 ne transduisent les signaux apoptotiques que de manière stimulus-spécifique (Lomonosova and Chinnadurai 2008).

La relocalisation de Bax et des BH3 à la mitochondrie entraîne le relargage d'apoptogènes mitochondriaux *via* une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale due à l'ouverture du mPTP (**Figure 12**). Cette perméabilisation est régulée par Bax et par Bak, une autre protéine à multidomains constitutivement ancrée à cette membrane externe, et vont pouvoir entrer en interaction par homo- ou hétéro-dimérisation. Les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L peuvent bloquer le relargage d'apoptogènes en entrant en interaction avec Bax et Bak (Kang and Reynolds 2009). Les protéines BH3 contribuent également à cette oligomérisation.

Les apoptogènes ainsi relargués dans le cytosol comprennent le cytochrome c qui va se lier à la protéine adaptatrice Apaf-1, entrainer son oligomérisation et permettre le recrutement de la pro-caspase 9. Le complexe heptamérique ainsi formé, appelé apoptosome, permet l'activation de la pro-caspase 9 par autoclivage qui va ensuite pouvoir activer la pro-caspase 3 et entraîner l'apoptose.

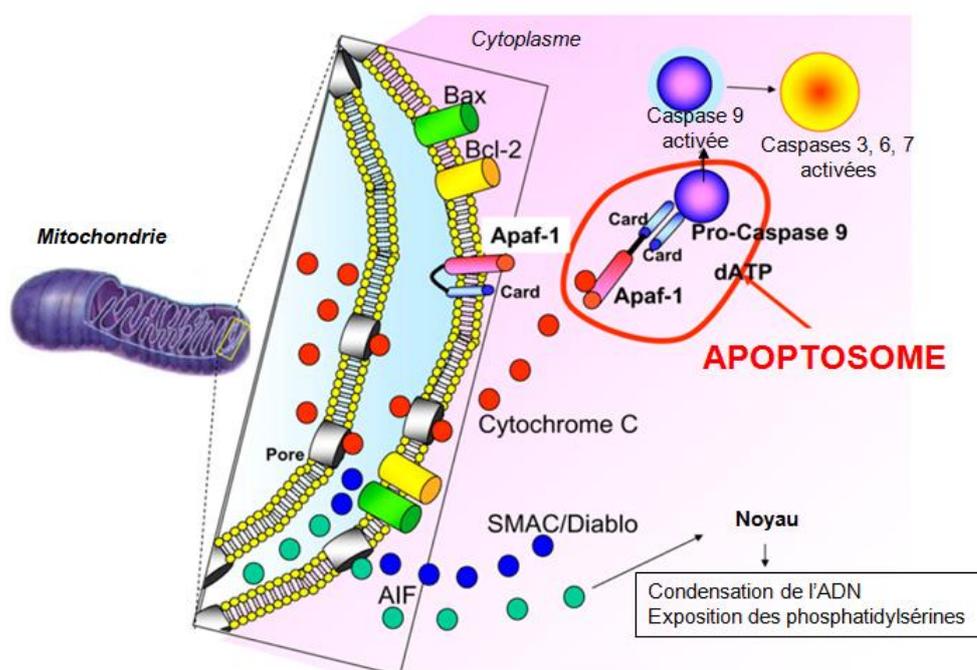


Figure 12- Éléments impliqués dans la voie intrinsèque de l'apoptose.

La mitochondrie joue un rôle primordial dans cette voie intrinsèque *via* le relargage d'éléments apoptogènes activateurs des caspases. Les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L peuvent bloquer ce relargage. Schéma adapté de Lopez-Neblina (2005).

II.1.b- Apoptose et infarctus du myocarde

Il a été démontré que les deux voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose ont un rôle critique dans l'infarctus du myocarde.

II.1.b.α- Voie extrinsèque de l'apoptose et infarctus du myocarde

Lee et al ont observé *in vivo* que les souris délétées pour le gène *Fas* (souris *lpr*) présentent une taille d'infarctus consécutive à l'IR nettement réduite par rapport aux souris sauvages (Lee, Sata et al. 2003). Des résultats similaires ont été retrouvés sur cœurs isolés perfusés de cette même souche, montrant que la perte de ligand Fas au niveau myocardique est responsable de cette diminution d'apoptose après IR (Figure 13A). La présence de ligand Fas dans le perfusat a également été observée, suggérant que cette signalisation se ferait de manière paracrine (Jeremias, Kupatt et al. 2000).

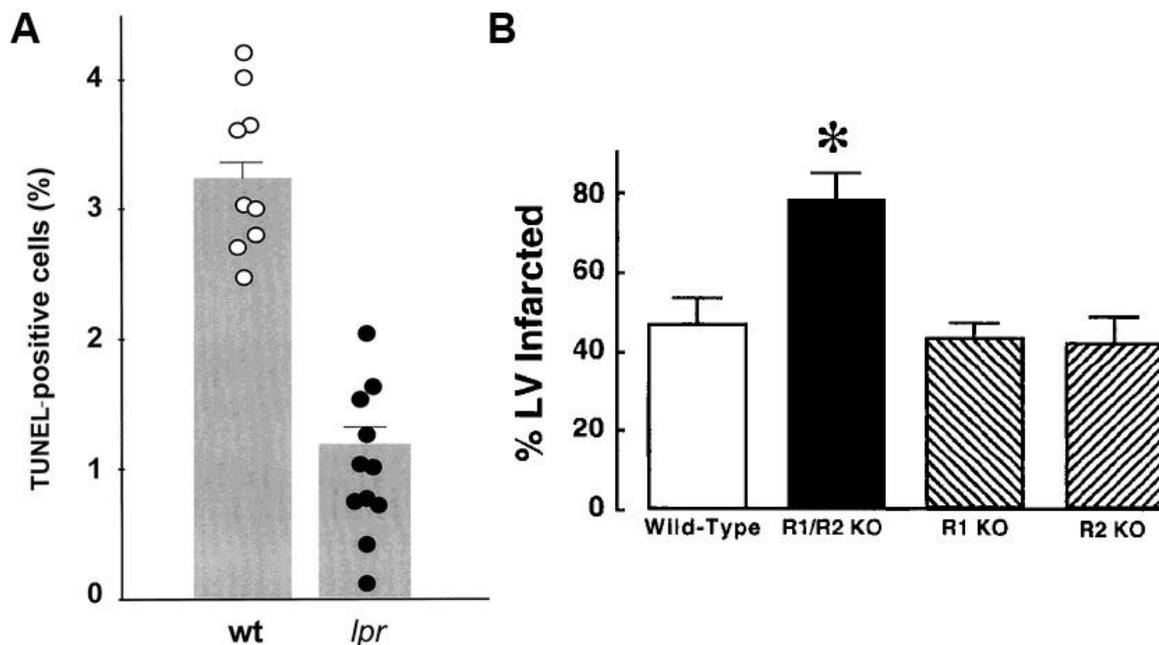


Figure 13- Mort cellulaire consécutive à l'ischémie-reperfusion chez (A) les souris *lpr* et (B) les souris TNFR1/TNFR2 KO.

Le ligand Fas ainsi que les récepteurs au TNF jouent un rôle important lors de la mise en place de l'apoptose. Figures issues de Jeremias et al. (2000) et Kurrelmeyer et al. (2000).

Kurrelmeyer et al. ont également montré que les souris délétées pour les récepteurs TNFR1/TNFR2 présentent un infarctus beaucoup plus important après occlusion coronaire,

avec une augmentation de l'apoptose mais pas de la nécrose (**Figure 13B**). Les souris simple KO TNFR1 KO ou TNFR2 KO ne présentent pas de différence de taille d'infarctus par rapport aux contrôles, suggérant une complémentarité de ces deux récepteurs (Kurrelmeyer, Michael et al. 2000).

II.1.b.β- Voie intrinsèque de l'apoptose et infarctus du myocarde

La voie intrinsèque de l'apoptose a également un rôle très important dans l'infarctus du myocarde. En effet, Chen et al. ont montré que des souris surexprimant Bcl-2 au niveau myocardique présentent une diminution de taille d'infarctus consécutives à l'IR, ainsi qu'une diminution de la réponse apoptotique des myocytes et une amélioration des dysfonctions myocardiques (**Figure 14A**) (Chen, Chua et al. 2001). Des résultats similaires ont été observés après inhibition pharmacologique de différentes caspases (**Figure 14B**) (Holly, Drincic et al. 1999; Huang, Radinovic et al. 2000).

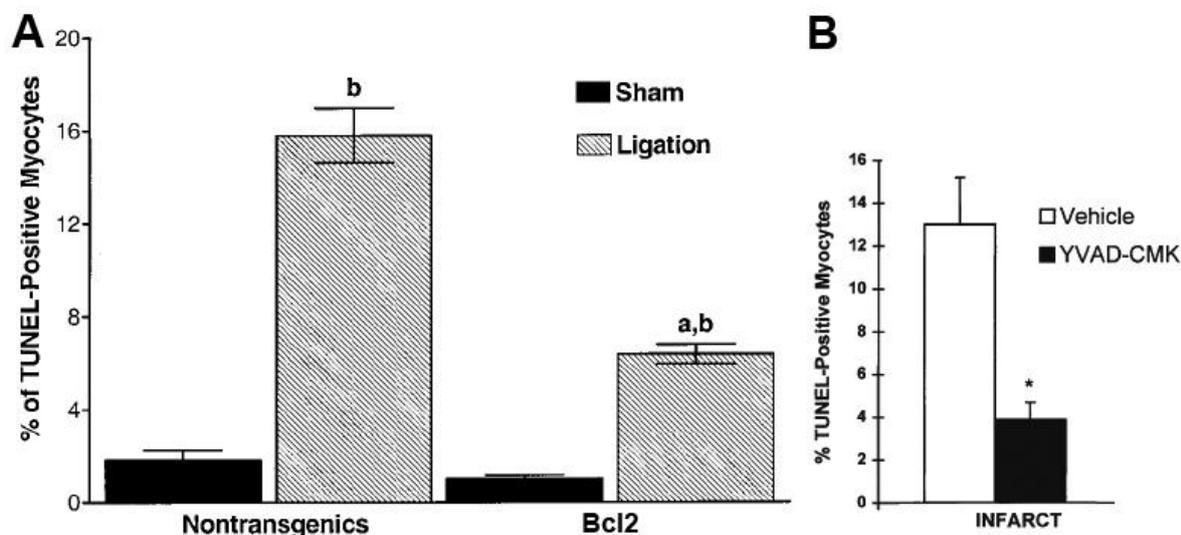


Figure 14- Atténuation de la mort cellulaire après IR chez (A) des souris surexprimant Bcl-2 et (B) chez des souris après traitement à l'YVAD-CMK, un inhibiteur de la caspase 2.

La surexpression de Bcl-2, facteur antiapoptotique, ou l'inhibition de la caspase 2 entraînent une diminution de la taille d'infarctus après ischémie-reperfusion. Figures issues de Holly et al. (1999) et Chen et al. (2001).

II.2- Nécrose

II.2.a- Nécrose

Durant la nécrose, la membrane plasmique perd son intégrité et on observe une forte déplétion de l'ATP intracellulaire. La cellule et ses organelles prennent alors un aspect gonflé (différent de l'aspect rétréci des cellules apoptotiques). Contrairement à l'apoptose, qui reste un phénomène de mort cellulaire relativement « propre », le relargage du contenu intracellulaire durant la nécrose engendre une réponse inflammatoire.

Contrairement à l'apoptose, extrêmement régulée, il a longtemps été admis que la nécrose était une forme de mort cellulaire passive et non-réglée. De récentes études montrent que la nécrose serait en partie régulée, et aurait un rôle très important lors de l'infarctus du myocarde.

II.2.a.α- Nécrose par les récepteurs de mort

L'activation des récepteurs de mort durant le processus apoptotique peut également générer une réponse de survie, de prolifération et de nécrose. Des expériences ont montré que le traitement de cellules avec du TNF, lorsque les caspases sont inhibées, induit la mort cellulaire par nécrose (Holler, Zaru et al. 2000). Deux complexes distincts seraient impliqués (**Figure 15**).

- Le *complexe I*, impliqué dans la survie cellulaire. La liaison du TNF sur son récepteur TNFR1 stimule la formation du complexe I, comprenant TRADD, la sérine/thréonine kinase RIP1, TRAF2 et les inhibiteurs d'apoptose cIAP1 et cIAP2 qui possèdent une activité E3-ubiquitine ligase (**Figure 11**). Ce complexe I va activer NF-κB, un facteur de transcription qui va stimuler l'expression de nombreux gènes de survie.
- Le *complexe II* résulte de l'endocytose du complexe I découlant de sa dissociation du récepteur TNFR1. Il va ainsi recruter FADD et la pro-caspase 8. Ce complexe II peut entraîner une augmentation du catabolisme et une production importante de ROS ce qui engendrerait de la nécrose.

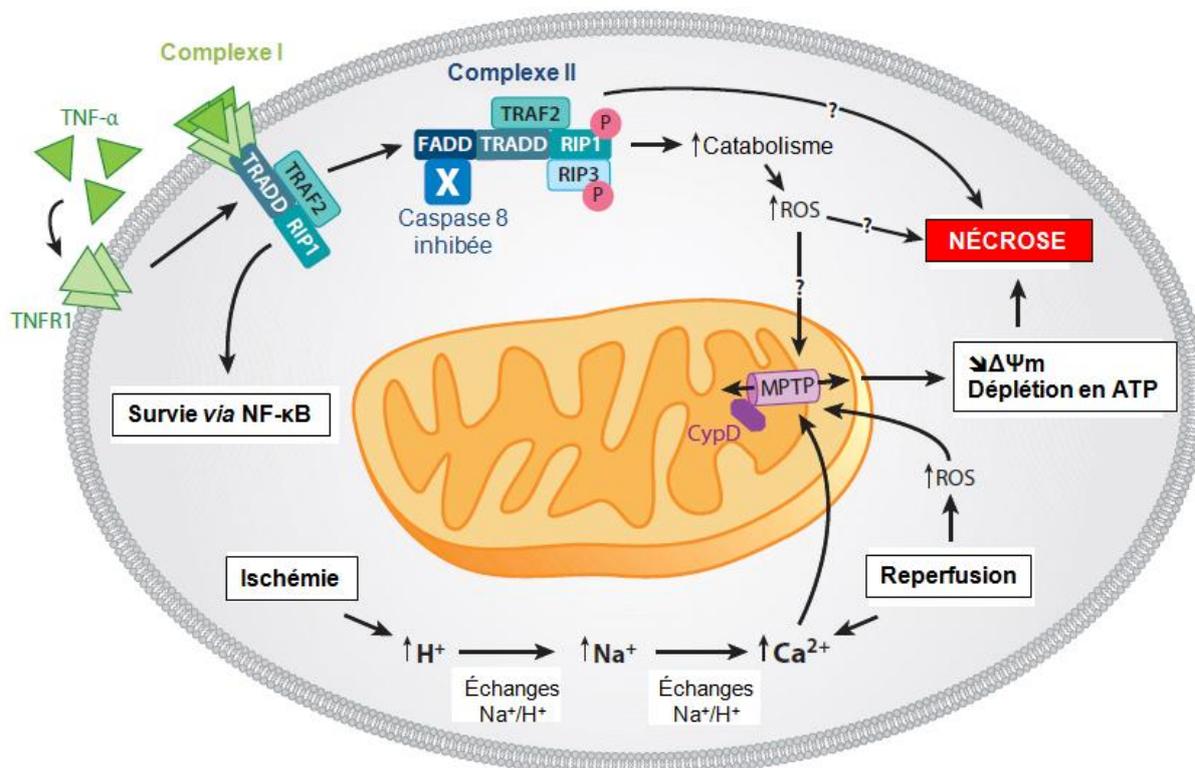


Figure 15- Voies de signalisation de la nécrose.

Deux complexes distincts sont impliqués lors de la nécrose : Le *complexe I* impliqué dans la survie cellulaire, *via* l'activation de NF- κ B ; et le *complexe II* résultant de l'endocytose du complexe I et entraînant une forte production de ROS. Figure adaptée de Whelan et al. (2010).

II.2.a.β- Nécrose impliquant le mPTP

Un autre mécanisme de la nécrose implique le pore de transition de perméabilité mitochondrial. L'ouverture de ce pore peut être régulée par le calcium matriciel, le stress oxydant, la concentration en phosphate et le taux d'ATP. L'ouverture du pore entraîne une diminution du potentiel électrique ($\Delta\Psi$) qui résulte en une déplétion d'ATP. Une fois le mPTP ouvert, on observe une équilibration des solutés de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, entraînant un flux d'eau dans la mitochondrie et son gonflement. La rupture des membranes mitochondriales libère alors des apoptogènes dans le cytosol.

II.2.a.γ- Nécrose impliquant le calcium et les protéases

Comme nous avons pu le voir, le calcium matriciel peut entraîner l'ouverture du mPTP, mais il peut également activer des protéases, les calpaïnes et les cathepsines. Des

expériences de perte de fonction menées chez *C. elegans* ont montré que ces protéases seraient impliquées dans la nécrose (Syntichaki, Xu et al. 2002).

II.2.b- Nécrose et infarctus du myocarde

Le mPTP joue un rôle clé dans la mise en place de la nécrose durant l'ischémie myocardique prolongée suivie de reperfusion. Des événements se produisant durant l'ischémie et durant la reperfusion peuvent entraîner l'ouverture de ce pore. L'hypoxie consécutive à l'ischémie va imposer un métabolisme anaérobie et une acidose intracellulaire. En réponse, les protons vont être expulsés de la cellule *via* l'échangeur Na^+/H^+ et les ions sodiques entrant vont être ré-expulsés *via* l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La concentration calcique intracellulaire va donc augmenter engendrant ainsi une réponse de type Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release du réticulum sarcoplasmique. La reperfusion stimule également le stress oxydant et une rapide normalisation de l'acidose intracellulaire, toutes les deux dépendantes de l'ouverture du mPTP.

La cyclophiline D est un régulateur important de l'ouverture du mPTP. En effet, des souris KO pour la cyclophiline D présentent une taille d'infarctus consécutive à l'IR fortement réduite par rapport à des souris contrôles (**Figure 16**) (Baines, Kaiser et al. 2005).

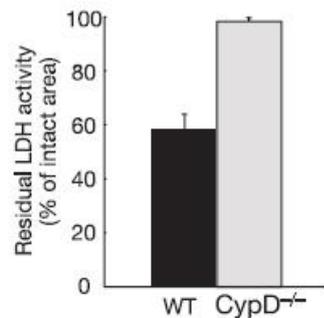


Figure 16- Prévention des dommages cardiaques dus à l'IR chez les souris cyclophiline D^{-/-}.

Les souris Cyp D^{-/-} présentent une activité lactate déshydrogénase bien plus élevée après IR que les souris contrôles. Figure issue de Baines et al. (2005).

II.3- Autophagie

II.3.a- Autophagie

Contrairement à l'apoptose et à la nécrose, l'autophagie est avant tout un mécanisme de survie cellulaire. Elle consiste en un processus de recyclage des organelles, protéines et lipides, catabolisées par dégradation lysosomale. Elle permet de fournir aux cellules des acides aminés, des acides gras et de l'énergie en cas de déplétion en nutriments. Elle permet également de réguler la quantité et la qualité des protéines et des organelles dans les cellules.

L'autophagie consiste en la formation d'une vésicule à double membrane, appelée autophagosome, qui va englober le matériel à dégrader. Cet autophagosome fusionne avec le lysosome pour former un autophagolysosome, aboutissant à la dégradation lysosomale du contenu (**Figure 17**)(Levine and Kroemer 2008).

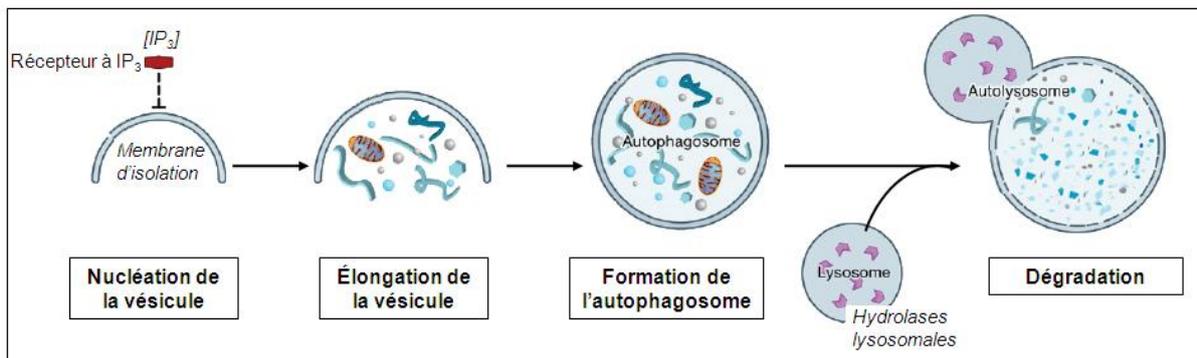


Figure 17- Formation de l'autophagolysosome au cours de l'autophagie.

La vésicule formée va fusionner avec les lysosomes, permettant ainsi la dégradation de son contenu. Figure adaptée de Levine et al. (2008).

L'autophagie est régulée par deux voies principales, la voie mTOR (mammalian Target of Rapamycin) et la voie Beclin-1 (**Figure 18**)(Glick, Barth et al.).

- *mTOR*. En conditions normales (présence de nutriments), mTOR inhibe l'autophagie par phosphorylation et inactivation des protéines Atg, protéines impliquées dans la formation et l'élongation de l'autophagosome. En cas de déprivation en nutriments, la voie de signalisation PI3K-Akt diminue l'activité de mTOR, résultant en une perte d'inhibition de l'autophagie.

- *Beclin-1*. L'autophagie est également régulée positivement par la protéine Beclin-1, membre de la famille des protéines BH3, qui va faciliter la formation de l'autophagosome. Beclin-1 peut être régulé, par la liaison sur son domaine BH3, par des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L, entraînant ainsi l'inhibition de l'autophagie.

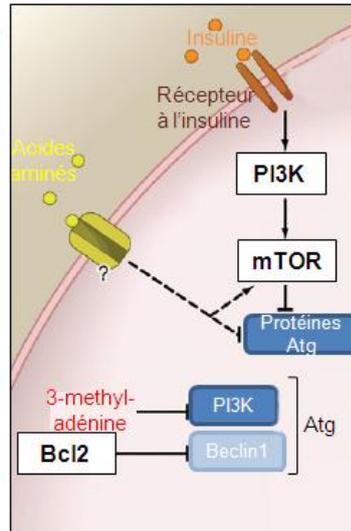


Figure 18- Régulation de l'autophagie par les voies mTOR et Beclin1.

En conditions ischémiques, on observe une diminution de l'activité de mTOR et une activation de Beclin-1. Figure adaptée de Levine et al. (2008).

II.3.b- Autophagie et infarctus du myocarde

L'autophagie semble jouer un rôle différent selon la phase de l'ischémie-reperfusion. En effet, elle aurait un rôle protecteur durant la période d'ischémie, et un rôle délétère durant la reperfusion.

II.3.b.α- Autophagie et ischémie prolongée

Takagi et al. ont montré que durant l'ischémie myocardique, on observe une activation d'AMPK, un régulateur négatif de mTOR, qui résulte dans la mise en place de l'autophagie. Chez des souris surexprimant une AMPK non-fonctionnelle, l'autophagie est inhibée et la taille d'infarctus est augmentée après 90min d'ischémie (**Figure 19**). Ces résultats suggèrent que l'autophagie aurait alors un rôle protecteur durant une ischémie prolongée (Takagi, Matsui et al. 2007).

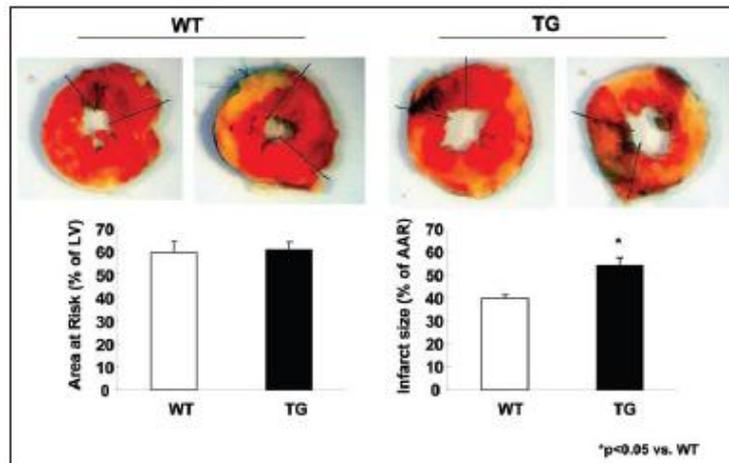


Figure 19- Effets de l'ischémie prolongée sur la taille d'infarctus chez les souris DN-AMPK.

L'inhibition de l'autophagie chez les souris DN-AMPK entraîne une augmentation de la taille d'infarctus après ischémie. L'autophagie aurait alors un rôle protecteur en cas d'ischémie prolongée. Figure issue de Takagi et al. (2007).

II.3.b.β- Autophagie et reperfusion

Durant la reperfusion, l'autophagie serait activée par une autre voie que l'AMPK, impliquant une augmentation de Beclin-1. Matsui et al. ont observé que l'autophagie serait cytotoxique durant la reperfusion (Matsui, Takagi et al. 2007). En effet, chez des souris KO hétérozygotes pour Beclin-1 (*beclin 1^{+/-}*), ils observent une diminution de la taille d'infarctus après 20min d'ischémie suivie de 20min de reperfusion (Figure 20).

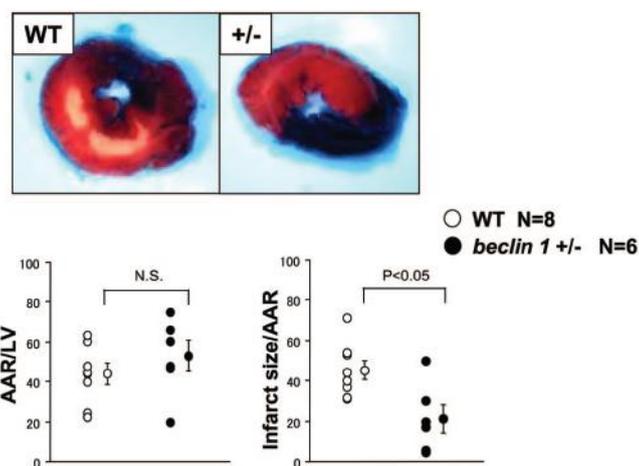


Figure 20- Effets de l'ischémie-reperfusion chez les souris *beclin 1^{+/-}*.

Après ischémie-reperfusion, on observe une diminution de l'infarctus chez les souris *beclin 1^{+/-}*, suggérant un rôle cytotoxique de l'autophagie durant la reperfusion. Figure issue de Matsui et al. (2007).

III-La Cardioprotection

Sommaire

Sommaire.....	- 51 -
III.1- Le préconditionnement.....	- 53 -
III.1.a- Le préconditionnement ischémique.....	- 53 -
III.1.a.α- Historique et concept de l'IPC.....	- 53 -
III.1.a.β - Signalisation intracellulaire de l'IPC.....	- 55 -
III.1.a.β.I – PI3K.....	- 56 -
III.1.a.β.II – Akt.....	- 58 -
III.1.a.β.III – GSK-3β.....	- 59 -
III.1.a.β.IV – Les MAPK.....	- 60 -
III.1.a.β.V – La voie Wnt/Frizzled.....	- 62 -
III.1.a.β.VI – mTOR.....	- 68 -
III.1.a.β.VII –p70S6K.....	- 71 -
III.1.a.β.VIII –4E-BP1.....	- 73 -
III.1.a.β.IX –PKC.....	- 73 -
III.1.a.β.X –NOS.....	- 75 -
III.1.a.β.XI –Le mitoK _{ATP}	- 77 -
III.1.a.β.XII –Les ROS.....	- 78 -
III.1.a.β.XIII –Le mPTP.....	- 78 -
III.1.b- Le préconditionnement pharmacologique.....	- 81 -
III.1.b.α – PPC par les cytokines.....	- 81 -
III.1.b.β – PPC par les ligands des GPCR.....	- 83 -
III.1.b.γ– Peptides natriurétiques.....	- 84 -
III.1.b.δ – Anesthésiques volatils.....	- 84 -
III.1.b.ε – Statines.....	- 85 -
III.1.b.ζ– Angiotensine II.....	- 85 -
III.1.b.η– Donneurs de NO.....	- 85 -
III.1.b.θ– Les KCO.....	- 86 -
III.1.b.ι– La cyclosporine A.....	- 87 -

III.2- Le postconditionnement	- 88 -
III.2.a- Le postconditionnement ischémique	- 88 -
III.2.a.α- Historique	- 88 -
III.2.a.β- Signalisation intracellulaire du postconditionnement ischémique	- 90 -
III.2.b- Le postconditionnement pharmacologique	- 92 -
III.2.b.α– PPC par les cytokines.....	- 93 -
III.2.b.β– PPC par les ligands des GPCR	- 93 -
III.2.b.γ– Anesthésiques volatils	- 94 -
III.2.b.δ– Les KCO	- 94 -
III.1.b.ε– La cyclosporine A.....	- 94 -

La mort cellulaire consécutive à l'ischémie-reperfusion est la première cause de morbidité et de mortalité dans les pays occidentaux (Murray and Lopez 1997). La reperfusion reste la solution la plus utilisée pour diminuer la taille d'infarctus même si paradoxalement, elle participe à cette mort cellulaire (**Figure 8**).

Depuis plusieurs dizaines d'années, il est devenu clair que la réponse à l'IR peut être et doit être modulée pour retarder les dommages lié à l'IR, ce qui a énormément motivé les recherches sur la cardioprotection. Le but : diminuer, voire supprimer les effets délétères de l'ischémie, et limiter l'extension de l'infarctus après occlusion coronarienne.

Différentes techniques pour protéger le cœur ont vu le jour, que ce soit en amont de l'ischémie, lors du Préconditionnement, ou au moment de la reperfusion, lors du Postconditionnement. En raison de l'importance de la mitochondrie dans le métabolisme énergétique du myocarde, et son rôle dans la mort cellulaire, il n'est pas étonnant de la retrouver également au cœur de la cardioprotection.

III.1- Le préconditionnement

III.1.a- Le préconditionnement ischémique

III.1.a.α- Historique et concept de l'IPC

Le Préconditionnement Ischémique (IPC) a été décrit pour la première fois en 1986 par Murry (Murry, Jennings et al. 1986). Les chercheurs ont montré, sur un modèle canin d'occlusion de coronaire, que des occlusions coronariennes brèves (trop courtes pour provoquer une nécrose myocytaire), réalisées avant une occlusion prolongée (de durée suffisante pour provoquer un infarctus myocytaire), réduisaient de manière très importante la taille finale de l'infarctus (29.4% de taille d'infarctus par rapport à la zone à risque pour les contrôles contre 7.3% pour le groupe préconditionné, soit une protection de l'ordre de 75%) (Figure 21).

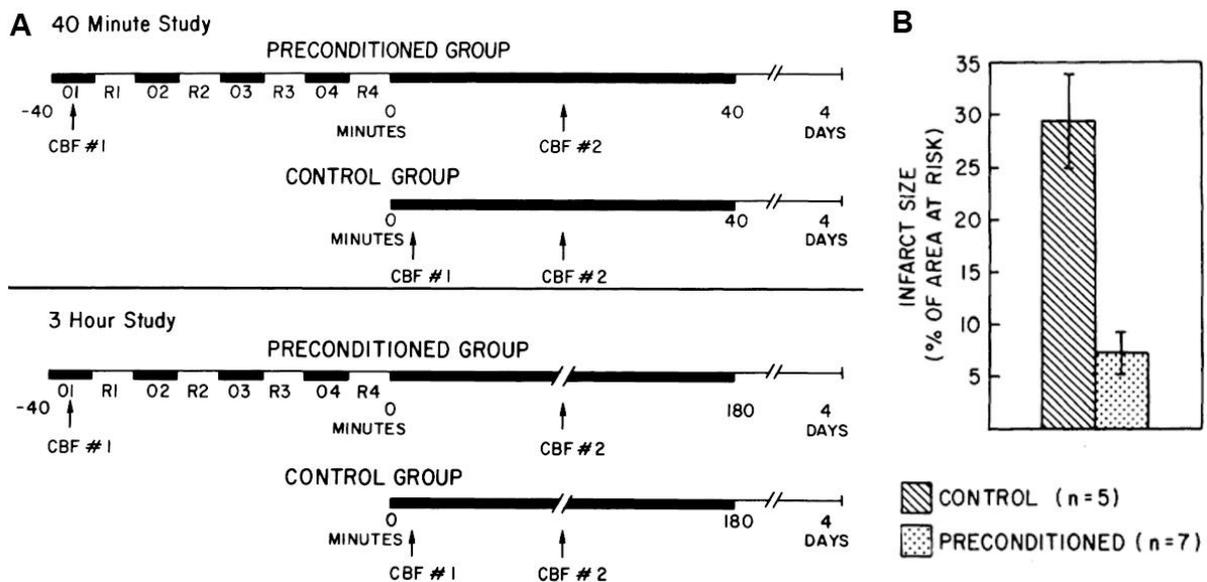


Figure 21- Premières expériences de Préconditionnement Ischémique par Murry.

(A) Protocoles d'IPC sur un modèle d'occlusion coronaire canine. **(B)** Diminution de taille d'infarctus chez le groupe préconditionné. Figures issues de Murry et al. (1986).

Le fait de rendre le myocarde brièvement ischémique induirait une protection endogène, qui s'exprimerait lors d'une ischémie prolongée consécutive. Il s'agit d'un phénomène d'adaptation au stress. Le préconditionnement ischémique constitue donc un traitement préventif de la lésion myocardique.

La cardioprotection par IPC est plus bénéfique que celle obtenue par les traitements actuels, et ne se limite pas à empêcher l'extension de la nécrose myocardique, mais limite également l'apoptose myocardique induite par l'IR (Piot, Padmanaban et al. 1997). De plus, l'IPC améliore la récupération contractile post-ischémique, de par la limitation de nécrose.

Yellon et al. ont été les premiers à démontrer la faisabilité de l'IPC sur le cœur humain durant une intervention chirurgicale cardiaque. Sur un petit nombre de patients (n=7 par groupe) opérés pour un pontage coronarien, le cœur a été soumis à deux périodes d'ischémie (par clampage) de 3min, séparées par 2min de reperfusion. Les cœurs ont ensuite été soumis à 10min d'ischémie. Des biopsies myocardiques ont été obtenues avant et à la fin du protocole d'IPC et après les 10min d'ischémie, afin d'étudier les niveaux d'ATP comme index de protection. L'IPC a significativement préservé les niveaux d'ATP du myocarde, ce qui suggère une plus grande tolérance du cœur vis-à-vis de l'IR (Yellon, Alkhulaifi et al. 1993). Depuis cette étude, les propriétés cardioprotectrices de l'IPC ont été démontrées dans de nombreuses interventions chirurgicales cardiovasculaires, allant du pontage coronarien à la transplantation cardiaque (Crisostomo, Wairiuko et al. 2006; Granfeldt, Lefer et al. 2009).

L'IPC possède néanmoins plusieurs limites :

- Une *limite temporelle*. Même si la protection se met en place très rapidement durant l'IPC, elle n'est efficace que si le myocarde infarcté est reperfusé suffisamment tôt. Plus l'ischémie est longue et plus les cardiomyocytes meurent (**Figure 8**).

D'autre part, le stimulus protecteur ne doit pas être réalisé trop tôt avant l'ischémie.

En 1993, Kuzuya et Marber, dans deux études distinctes, ont pu observer que l'IPC possède en fait deux fenêtres d'activité (Kuzuya, Hoshida et al. 1993; Marber, Latchman et al. 1993; Sanada and Kitakaze 2004). Une première, immédiatement après le préconditionnement, appelée *préconditionnement ischémique précoce*, et une seconde, qui s'exerce 24h après le préconditionnement (*préconditionnement ischémique tardif*). Ils ont ainsi pu montrer que l'IPC tardif est tout aussi efficace que l'IPC précoce mais qu'au-delà de 24h, cette protection est perdue. La protection induite par l'IPC est transitoire, mais peut être réinduite si l'on répète l'IPC. Ces deux fenêtres auraient des mécanismes intracellulaires différents (Sanada and Kitakaze 2004).

- *Il reste très peu applicable*. En effet, étant donné que la survenue d'un infarctus est un événement en général imprévisible, le préconditionnement n'est pas réalisable en

condition d'infarctus aigu. Les deux conditions envisageables pour son utilisation sont la chirurgie cardiaque, où l'on peut prévoir les risques d'ischémies, et l'angioplastie coronaire.

Afin de parer à certaines de ces limites, Przyklenk et ses collègues ont développé l'idée d'un préconditionnement à distance (Przyklenk, Bauer et al. 1993), ayant pour but de réaliser un préconditionnement sur un organe éloigné du cœur, afin d'éviter des dommages tissulaires produits lors de l'IPC sur des coronaires fragilisées. Cet IPC à distance s'est révélé efficace et entraîne une protection sur de multiples organes (cœur, cerveau, rein, poumons). Il peut être réalisé sur différents organes, comme le rein (Lang, Elsasser et al. 2006), l'intestin (Gho, Schoemaker et al. 1996) ou un membre. Cet IPC à distance partagerait les mêmes mécanismes intracellulaires que l'IPC standard, et posséderait également deux fenêtres d'activité, précoce et tardive (Kharbanda, Nielsen et al. 2009).

De part ses limites importantes, il est clair que l'intérêt de l'IPC n'est pas de l'appliquer en tant que tel en clinique, mais d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la cardioprotection, afin de définir de nouvelles cibles pharmacologiques, menant secondairement au développement de médicaments cardioprotecteurs (Argaud and Ovize 2004).

III.1.a. β - Signalisation intracellulaire de l'IPC

Le préconditionnement ischémique active de nombreuses voies de signalisation capables d'interagir entre elles.

L'IPC engendre la libération d'agonistes (Cohen, Baines et al. 2000; Cohen, Yang et al. 2001), tel que l'adénosine, l'acétylcholine, la bradykinine, les catécholamines, l'angiotensine II ou les opioïdes, qui vont se fixer sur des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (**Figure 22**).

Ces récepteurs vont activer les cascades de voies cardioprotectrices, comprenant la voie RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinases), PI3K/Akt, GSK-3 β , mais aussi mTOR, PKC, l'oxyde nitrique NO, les espèces dérivées de l'oxygène ROS et des cibles mitochondriales telles que le canal potassique mitochondrial ATP sensible (mitoK_{ATP}) et le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) (Murphy and Steenbergen 2008).

III.1.a.β.1 – PI3K

Les phosphatidylinositols (PI) sont des phospholipides composées d'un phosphoglycéride estérifié lié par une liaison esther au groupement hydroxyle d'un alcool cyclique, l'inositol, et peuvent être phosphorylés et déphosphorylés sur de nombreux résidus par des lipides kinases et des phosphatases. Le phosphatidylinositol-4,5-phosphate (PI(4,5)P₂) est le précurseur principal pour la biosynthèse des PI(3,4,5)P₃ par les enzymes PI3K de classe I qui peuvent être activées par de nombreux agonistes (Foster, Traer et al. 2003). Le PI(3,4,5)P₃ est dégradé par les lipides phosphatases PTEN et SHIP2, pour générer le PI(4,5)P₂ et PI(3,4)P₂ respectivement. La PI3K et PTEN sont les régulateurs principaux des niveaux de PI(3,4,5)P₃ et de PI(3,4)P₂ qui peuvent ainsi cibler et activer différents effecteurs en se liant à des domaines sélectifs PH (Pleckstrin Homology).

Il existe différentes classes de PI3K, basées sur leur spécificité de substrats, leur mode d'activation et leur structure moléculaire. Les classes I_A et I_B sont des enzymes hétérodimériques composées d'une sous-unité régulatrice couplée à une sous-unité catalytique :

- Classe I_A : la sous-unité catalytique comprend p110α, p110β et p110δ et la sous-unité adaptatrice p85α, p85β et p85γ. L'isoforme p85α est prédominant dans le cœur (Vanhaesebroeck, Leever et al. 2001).
- Classe I_B : la sous-unité catalytique est composée de p110γ, associée à l'adaptateur p101.

Ces PI3K de classe I phosphorylent le PI, PI(4)P et le PI(4,5)P₂ pour former le PI(3)P, le PI(3,4)P₂ et le PI(3,4,5)P₃ *in vitro*, respectivement. *In vivo*, c'est la phosphorylation du PI(4,5)P₂ en PI(3,4,5)P₃ qui est prédominante en réponse à une stimulation (Wymann, Zvelebil et al. 2003).

Toutes les sous-unités catalytiques des PI3K de classe I contiennent quatre domaines d'homologie (HD) : De la région N- à la région C-terminale, on retrouve le domaine Ras-binding (RBD ou HR4), le domaine C2 (HR3), le domaine hélicoïdal PIK (HR2) et le domaine kinase (HR1). Le domaine RBD lie la protéine G monomérique Ras alors que les domaines C2 et PIK sont impliqués respectivement dans la liaison à la membrane et les interactions protéine/protéine. La sous-unité p110γ (exprimée dans les cardiomyocytes) contient également deux sites de liaison avec les protéines G_{βγ}, impliqués lors de la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. Après activation de ces récepteurs, p110γ et les protéines G_{βγ} se relocalisent du cytosol à la membrane cellulaire, et active l'activité

catalytique. Cette activation de $p110\gamma$ par les GPCR est amplifiée par la liaison simultanée des protéines $G_{\beta\gamma}$ à la sous-unité adaptatrice p101 (Oudit and Penninger 2009).

L'activation de la PI3K est associée à une cytoprotection et à une réduction de l'apoptose. Son inhibition pharmacologique par la wortmannine ou le LY294002 bloque les effets protecteurs de l'IPC (Tong, Chen et al. 2000; Uchiyama, Engelman et al. 2004); (Si, Tao et al. 2010). La régulation de PTEN et SHIP (qui s'opposent à l'activation de PI3K) pourrait également être impliquée dans la protection de l'IPC. En effet, durant celui-ci, PTEN est dégradé entraînant l'augmentation de phosphorylation d'Akt (Cai and Semenza 2005).

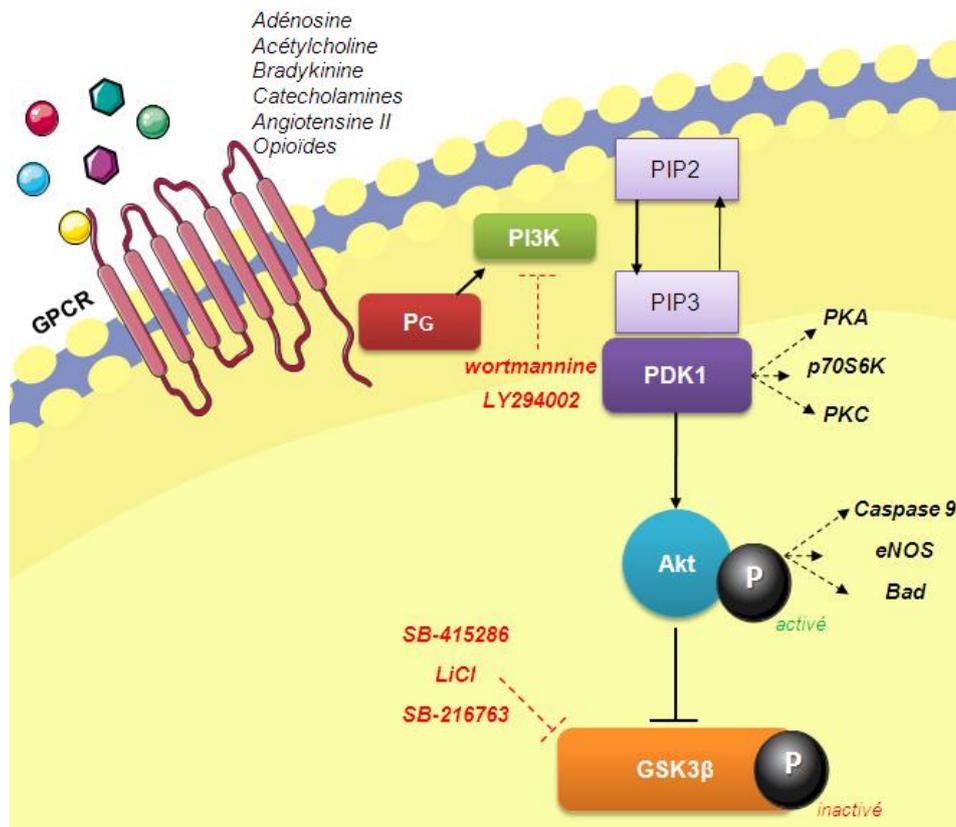


Figure 22- Signalisation intracellulaire du preconditionnement ischémique (I) – De l'activation des récepteurs GPCR à l'inhibition de GSK-3 β .

Lors de l'IPC, des agonistes libérés se fixent sur des récepteurs GPCR, activant ainsi la voie PI3K. Le PIP₂ est phosphorylé en PIP₃ et permet la phosphorylation des substrats de PDK1 comprenant PKA, p70S6K, PKC et Akt. L'activation d'Akt permet d'inhiber GSK-3 β par phosphorylation. En rouge : différents inhibiteurs pouvant agir sur PI3K ou GSK-3 β .

Le PI(3,4,5)P₃ généré par la PI3K va faciliter la phosphorylation des substrats de PDK1. Ces substrats comprennent Akt, p70S6K, PKC et PKA (Williams, Arthur et al. 2000). La délétion

de PDK1 au niveau cardiaque entraîne une diminution de taille des cardiomyocytes aboutissant à des cardiomyopathies dilatées (Chan, Rittenhouse et al. 1999).

Le PI(3,4,5)P₃ entraîne également le recrutement d'Akt à la membrane, modifiant sa conformation pour faciliter sa phosphorylation par PDK1 (**Figure 22**).

III.1.a.β.11 – Akt

Akt/PKB est une sérine/thréonine kinase comprenant un domaine N-terminal PH, un domaine catalytique central et un domaine régulateur au niveau C-terminal (Hanada, Feng et al. 2004). L'activité d'Akt est principalement contrôlée par PI3K et PTEN, *via* la modulation des niveaux de PI(3,4,5)P₃. Dans les cellules, l'activation d'Akt se produit en deux étapes : Akt est d'abord recruté à la membrane plasmique où elle s'associe au PI(3,4,5)P₃ par son domaine PH, puis est phosphorylée sur la thr308 du domaine catalytique (Mora, Davies et al. 2003) par PDK1, et sur la ser473 du domaine régulateur par PDK2 (Miura, Tanno et al. 2010). Akt peut également être activée par l'insuline et par différents facteurs de croissance et de survie. Cette kinase peut également être directement inactivée par déphosphorylation de ces sites de régulation par la sérine-thréonine phosphatase PP2A (Brazil, Park et al. 2002).

Akt contrôle une grande variété de réponses cellulaires, incluant l'inhibition de l'apoptose, la régulation de la prolifération cellulaire, le métabolisme et l'hypertrophie liée au stress (Brazil, Park et al. 2002; Cantley 2002; Hanada, Feng et al. 2004). Une fois activée, Akt est libérée de la membrane plasmique et peut agir sur différentes cibles localisées dans le cytosol, le noyau et la mitochondrie. La translocation d'Akt à la mitochondrie en réponse à la stimulation de récepteurs a été démontrée dans des cellules non-cardiaques et dans des cardiomyocytes. Bijur et al. ont été les premiers à montrer que la stimulation de PI3K/Akt par l'insuline, dans des lignées de cellules non-cardiaques, entraîne une augmentation d'Akt activée dans les fractions mitochondriales (Bijur and Jope 2003). Dans une autre étude, le traitement de myocytes ventriculaires de rats néonataux avec du LIF (leukemia inhibitory factor) entraîne une augmentation des niveaux d'Akt totale et de phospho-Akt (ser473) dans la fraction mitochondriale (Miyamoto, Murphy et al. 2008).

Akt peut phosphoryler/inhiber la GSK-3β, phosphoryler/activer la NO synthase endothéliale (eNOS) qui va augmenter la production de NO (Tong, Chen et al. 2000), phosphoryler/inhiber Bad (membre proapoptotique de la famille Bcl-2), dont l'action sera bloquée suite à sa fixation à la protéine 14-3-3, et phosphoryler/inhiber l'activation de la caspase 9 (directement impliquée dans la mort cellulaire) (**Figure 22**).

Uchiyama et al. ont montré, sur un modèle de cultures primaires de myocytes ventriculaires de rat, que l'expression d'un dominant négatif d'Akt bloque la protection apportée par l'IPC. Des résultats similaires ont été observés à la suite d'une inhibition pharmacologique d'Akt sur un modèle d'oreillette droite humaine. De plus, la surexpression d'une Akt constitutivement activée protège de l'apoptose engendrée par l'anoxie-réoxygénation (Uchiyama, Engelman et al. 2004).

III.1.a.β.iii - GSK-3β

La Glycogène Synthase Kinase 3, ou GSK3, est une sérine/thréonine kinase qui a tout d'abord été identifiée comme régulateur du métabolisme glucidique, en modulant l'activité de la glycogène synthase. Il existe deux isoformes de GSK3, tous deux exprimés dans le cœur, GSK-3α (51 kDa) et GSK-3β (47kDa), codés par deux gènes différents. Bien que le domaine kinase soit hautement conservé entre les deux isoformes (98% d'identité), les protéines ne présentent que 36% d'identité au niveau C-terminal (Woodgett 1990).

Normalement, les isoformes de GSK3 sont constitutivement activés dans la plupart des types cellulaires, et sont régulés par phosphorylation/inhibition. L'activité de la GSK3 est réduite de façon significative lorsqu'elle est phosphorylée dans la région N-terminale sur la sérine 21 pour GSK-3α et la sérine 9 pour GSK-3β. Plusieurs stimuli, incluant l'EGF, le PDGF ou l'insuline, conduisent à l'inactivation de la GSK3 par le biais de l'activation de différentes kinases comme Akt, PKA, PKC ou encore ILK (Ho and Bendeck 2009). La GSK-3β peut phosphoryler de nombreux substrats autres que la glycogène synthase, parmi lesquels la cycline D1, c-jun, HIF-1α, Bad, Bcl-2, ANT, VDAC... ainsi que différentes protéines de la voie Wnt canonique, régulant leur activité et/ou leur stabilité (Doble and Woodgett 2003; Miura and Miki 2009; Xu, Kim et al. 2009). La régulation de la phosphorylation de ses substrats se fait principalement au travers de l'inactivation de la GSK3 ou bien en modifiant l'accessibilité des substrats par des mécanismes contrôlant la localisation subcellulaire de la GSK3. Cette enzyme qui est principalement retrouvée dans le compartiment cytoplasmique peut parfois être localisée dans le noyau ou les mitochondries. Ainsi Miura et al. ont montré que la GSK-3β peut se relocaliser à la mitochondrie dès les premières minutes de reperfusion après ischémie (Miura and Tanno 2010).

La GSK3 peut également être activée par déphosphorylation. Il semble que ce mode d'activation implique la déphosphorylation/inactivation en amont de la kinase Akt par la phosphatase PP2A. Il s'agirait là d'un mécanisme indirect d'activation de la GSK3 par déphosphorylation de la ser21 (Brazil, Park et al. 2002). Des travaux plus récents suggèrent

que les protéines phosphatases PP2A et PP1 sont capables de déphosphoryler GSK-3 α (ser21) et GSK-3 β (ser9), respectivement (Hernandez, Langa et al. 2010).

La GSK-3 β est l'isoforme majoritairement exprimé dans le myocarde et joue un rôle primordial en physiopathologie. Sa surexpression au niveau cardiaque est associée à une diminution de l'hypertrophie induite par surcharge en pression, suggérant qu'elle fonctionne comme régulateur négatif de l'hypertrophie *in vivo* (Antos, McKinsey et al. 2002). La phosphorylation/inhibition de la sérine 9 de GSK-3 β par Akt, en réponse à l'activation des GPCR, engendre divers effets incluant une amélioration de la survie cellulaire (**Figure 22**). Son inhibition a été plusieurs fois suggérée comme jouant un rôle antiapoptotique lors de la protection par IPC (Tong, Imahashi et al. 2002; Juhaszova, Zorov et al. 2004). Juhaszova et al. ont montré que l'inhibition de GSK-3 β pourrait empêcher l'ouverture du mPTP par un mécanisme encore méconnu. La GSK-3 β peut également être bloquée pharmacologiquement par le chlorure de lithium, le SB-216763 et le SB-415286, ce qui a pour effet de mimer les effets cardioprotecteurs de l'IPC (Tong, Imahashi et al. 2002). Wong et al. ont aussi démontré que l'inhibition pharmacologique de GSK-3 β entraîne des modifications du protéome mitochondrial, dont certaines sont identiques à celles observées après IPC (Wong, Aponte et al. 2010).

Néanmoins, des études récentes utilisant le modèle de souris transgéniques GSK3 KI (GSK3 constitutivement activée) suggèrent que l'inhibition de GSK-3 β ne serait pas nécessaire lors du préconditionnement et du postconditionnement (Nishino, Webb et al. 2008). Son rôle lors de l'IPC demeure controversé.

III.1.a. β .iv - Les MAPK

Les MAPK (mitogen-activated protein kinase) jouent un rôle important dans la régulation des voies de transductions du signal. Chez les mammifères, on retrouve trois groupes de MAPK : ERK, p38 et JNK (Schaeffer and Weber 1999). Comme de nombreuses autres protéines kinases, l'activation des MAPK requiert la phosphorylation d'une boucle flexible appelée boucle d'activation. Ces phosphorylations induisent des modifications conformationnelles qui ouvrent cette boucle d'activation, facilitant la liaison aux substrats.

- **ERK**

Il existe deux isoformes ERK1 et ERK2 (aussi appelés p44 et p42 respectivement). Ce sont des enzymes impliquées dans l'amplification et la transduction des signaux de la membrane cellulaire au noyau. Elles sont activées par une cascade de phosphorylations séquentielles. Après activation du récepteur, la GTPase Ras, liée à la membrane, recrute et active la kinase Raf. Raf peut alors phosphoryler deux résidus sérine des MAPKK MEK1 et MEK2, qui vont activer ERK1/2 par phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine de la boucle d'activation (Ramos 2008; Cagnol and Chambard 2010).

Selon la fenêtre d'activation et sa localisation subcellulaire, ERK contrôle une grande variété de réponses cellulaires, telles que la prolifération, la migration, la différenciation et la mort cellulaire (Murphy and Blenis 2006). On notera notamment que durant la reperfusion, l'activation de ERK conduit à l'inhibition du mPTP (Ping, Zhang et al. 1999). De plus, ERK peut phosphoryler la protéine proapoptotique Bad, libérant ainsi la protéine antiapoptotique Bcl-2. L'activation de ERK peut également moduler l'activité des facteurs de transcription, ce qui pourrait avoir un rôle important dans la phase tardive du préconditionnement. Le préconditionnement augmente la phosphorylation de ERK par PKC (Baines, Zhang et al. 2002).

- **p38**

Les p38 MAPK, sérine/thréonine kinases, sont activées par double phosphorylation de la boucle d'activation sur la séquence Thr-Gly-Tyr. En réponse à des stimuli appropriés, les résidus thréonine et tyrosine peuvent être phosphorylés par les trois MAPKK : MKK6, MKK3 et MKK4 (Cuadrado and Nebreda 2010).

L'implication de p38 dans l'IPC et la cardioprotection est controversée. Il existe des études suggérant que l'inhibition de p38 serait cardioprotectrice (Mackay and Mochly-Rosen 1999; Schneider, Chen et al. 2001). Par ailleurs, d'autres études contradictoires proposent que son inhibition bloquerait les effets cardioprotecteurs du préconditionnement (Weinbrenner, Liu et al. 1997; Nakano, Baines et al. 2000). Enfin, certains travaux montrent que l'inhibition de p38 n'affecterait pas l'IPC (Schneider, Chen et al. 2001).

- **JNK**

La protéine JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) est codée par trois gènes. Les gènes *Jnk1* et *Jnk2* sont exprimés ubiquitairement alors que *Jnk3* possède un profil d'expression plus limité et est exprimé majoritairement dans le cerveau, le cœur et les testicules. Ces trois gènes subissent un épissage alternatif aboutissant à la synthèse de dix isoformes JNK

(Gupta, Barrett et al. 1996). Les transcrits issus de ces trois gènes codent pour des protéines contenant éventuellement une extension C-terminale, formant ainsi des isoformes de 46 kDa et 55 kDa. La différence fonctionnelle entre ces deux isoformes reste encore obscure.

Les protéines JNK sont activées par phosphorylation sur Thr et Tyr, situés au niveau de la boucle d'activation de JNK, par MKK4 et MKK7, deux membres des MAPKK. JNK peut alors se lier au domaine d'activation N-terminal de c-Jun et phosphoryler les résidus ser63 et ser73, ce qui entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle. JNK est également impliquée durant l'apoptose. En effet, JNK peut phosphoryler les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L et ainsi réguler le relargage du cytochrome c (Gross, McDonnell et al. 1999). JNK est aussi impliquée dans la voie Wnt non-canonique, où Dishevelled activerait JNK de façon β -caténine indépendante.

De nombreuses études rapportent que JNK est activée durant le préconditionnement, mais il existe des désaccords quant à son rôle. Sato et al. montrent que l'inhibition de JNK bloque les effets protecteurs de l'IPC tandis que Iliodromitis et al. proposent qu'elle serait sans effet (Sato, Cordis et al. 2000; Iliodromitis, Gaitanaki et al. 2002). De plus, sur trois différents modèles de souris possédant une activité JNK réduite, il a été observé une diminution des dommages vis-à-vis de l'IR, associée à une inhibition de l'apoptose. Par ailleurs, il a été montré que l'activation prolongée de JNK dans des souris surexprimant MKK7 entraîne une protection vis-à-vis de l'IR (Kaiser, Liang et al. 2005).

Les observations contradictoires concernant l'implication de p38 ou de JNK dans l'IPC pourraient être liées à leurs fenêtres d'activation, au type d'isoforme impliqué (Saurin, Martin et al. 2000) ou à leurs localisations intracellulaires (Steenbergen 2002).

III.1.a. β .v - La voie Wnt/Frizzled

Nous avons montré, dans le laboratoire, que la voie Wnt/Frizzled joue un rôle dans la signalisation intracellulaire de l'IPC en relation avec la GSK-3 β , acteur central de cette voie de développement (Ding, Chen et al. 2000; Logan and Nusse 2004; McManus, Sakamoto et al. 2005). En effet, l'IPC est inhibé par la surexpression d'un antagoniste de la voie Wnt, dans un modèle d'infarctus *in vivo* de souris. Dans ce contexte, la GSK-3 β ne serait plus inhibée par l'IPC, conduisant à une perte de la cardioprotection (Barandon, Dufourcq et al. 2005).

La signalisation Wnt/Frizzled met en jeu des glycoprotéines sécrétées Wnt qui agissent en tant que ligands pour activer des voies de signalisation, et ce, par le biais de récepteurs transmembranaires Frizzled (Frz). Depuis plusieurs années, les fonctions de ce système ont été l'objet d'intenses investigations. Ce système est impliqué dans le contrôle de divers processus cellulaires tels que la croissance et la différenciation cellulaire, l'adhésion et la migration par des voies autocrines et paracrines (McMahon and Bradley 1990; Danielian and McMahon 1996; Lilien and Balsamo 2005). La signalisation Wnt serait notamment requise pour la différenciation des cellules souches embryonnaire humaines en cardiomyocytes (Paige, Osugi et al. 2010). La voie Wnt/Frz joue un rôle physiologique dans le développement embryonnaire, en contrôlant l'organisation fonctionnelle polarisée de la cellule et l'organisation tissulaire (Nusse and Varmus 1992; Danielian and McMahon 1996; Peifer and Polakis 2000). Elle serait de plus impliquée dans le renouvellement ou la régénération tissulaire notamment par son action sur les cellules souches (Leroux, Descamps et al. 2010). La dérégulation de cette voie est impliquée dans de nombreuses maladies humaines, telles que le cancer, l'ostéoporose, les maladies angiogéniques et les maladies cardiovasculaires (Polakis 2000; Suzuki, Watkins et al. 2004; Clevers 2006; Luo, Chen et al. 2007; Dejana 2010; Kongkham, Northcott et al. 2010).

Le système Wnt/Frz active plusieurs voies de signalisation (Huelsenken and Birchmeier 2001), mettant en jeu 19 membres de la famille Wnt et 10 membres de la famille Frz. Certains Wnt sont supposés activer la voie de signalisation Wnt canonique, tandis que d'autres activeraient des voies de signalisation dites non-canoniques (voie de polarité planaire et voie calcium dépendante).

- La **voie canonique** fait intervenir la GSK-3 β et est dépendante de la β -caténine.

Dans cette voie, la β -caténine s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF et régule la transcription de gènes qui ont un rôle dans la prolifération, la survie ou encore la détermination cellulaire. Cette voie de signalisation est initiée par la liaison du ligand Wnt au récepteur Frz et au corécepteur LRP 5/6.

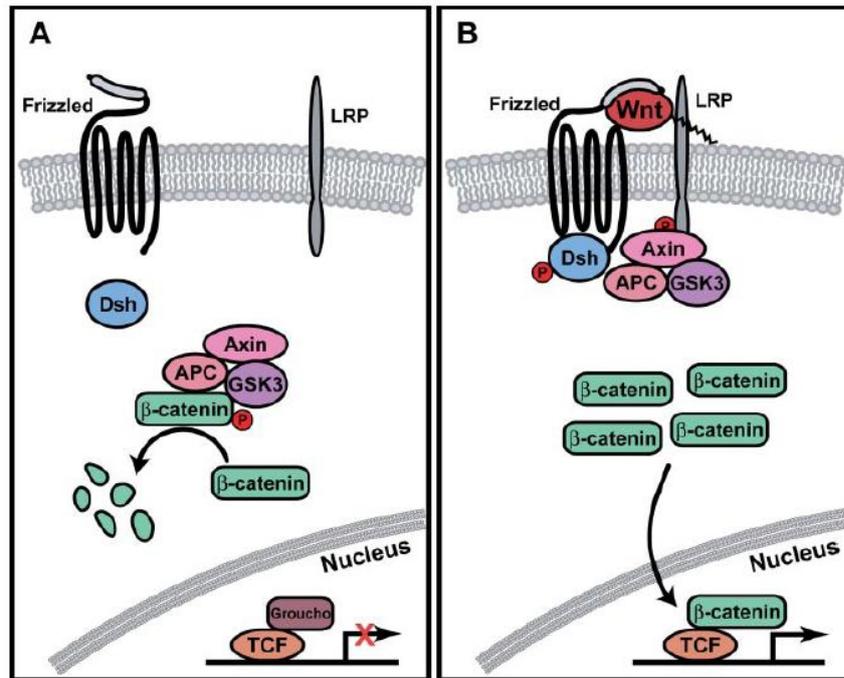


Figure 23- Voie canonique Wnt/Frizzled.

(A) En absence de ligand Wnt, la β -caténine cytosolique est recrutée dans un complexe qui va permettre sa dégradation. **(B)** En présence de ligand Wnt, le complexe est dégradé et la β -caténine est libérée. Elle peut ainsi être transloquée dans le noyau pour activer l'expression de gènes cibles. Figure issue de Gordon et al. (2006).

- En l'absence de ligand Wnt (**Figure 23A**), la β -caténine cytosolique est recrutée dans un complexe qui va permettre sa dégradation. Ce complexe est constitué de l'Adenomatous Poliposis Coli (APC), de l'axine et de la GSK-3 β qui va favoriser la phosphorylation de la β -caténine. Ceci conduit à l'ubiquitination de la β -caténine et donc à son ciblage vers le protéasome qui va assurer sa dégradation.

- En présence de ligand Wnt (**Figure 23B**), la protéine Dishevelled (Dvl) est activée par sa phosphorylation. L'activation et le recrutement à la membrane de cette protéine permettent vraisemblablement le recrutement de l'axine (et du reste du complexe de dégradation) à la membrane qui peut alors interagir avec la queue intracytoplasmique de LRP 5/6. L'axine est alors dégradée, ce qui favorise la destruction du complexe de dégradation et protège la β -caténine cytosolique (Tolwinski and Wieschaus 2004). L'activation de Dvl permet aussi l'inhibition de la GSK-3 β , ce qui à nouveau permet de diminuer la phosphorylation de la β -caténine et sa dégradation. Ainsi, l'activation de la voie canonique permet une stabilisation post-traductionnelle de la β -caténine par une dégradation de l'axine et une inhibition de la GSK-3 β , qui sont dépendantes des Wnt. À mesure que le

taux de β -caténine cytosolique augmente, celle-ci peut être transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs TCF/LEF liés à l'ADN et transactiver l'expression de gènes cibles.

- **Les voies non canoniques.**

La recherche dans le domaine de la signalisation Wnt/Frz a longtemps été centrée sur une seule voie de signalisation Wnt, la voie canonique dépendante de la β -caténine. Cependant, depuis une quinzaine d'années, un nombre croissant de travaux viennent démontrer l'implication de voies non canoniques, souvent indépendantes de la β -caténine. Elles peuvent être divisées en deux branches distinctes, la voie de polarité planaire cellulaire (PCP) et la voie calcium-dépendante (Wnt/Ca²⁺).

La voie de signalisation PCP a émergé d'études génétiques réalisées chez la drosophile. Des mutations de Frz et de Dvl l'ont impliquée dans l'orientation des structures épithéliales (Fanto and McNeill 2004). Par le biais d'interactions spécifiques avec certains récepteurs Frz, les membres de la classe Wnt5A sont susceptibles de médier ces effets par l'activation des voies non canoniques. L'activation de ces voies fait intervenir différents types de médiateurs intracellulaires (**Figure 24**). Des études récentes montrent que les GTPases de la famille Rho sont des acteurs de la voie PCP. Il a été montré que Rho, Rac1 et Cdc42 sont des cibles de la protéine Dishevelled, une protéine centrale dans la voie PCP (Schlessinger, McManus et al. 2007). Rac1 et Cdc42 peuvent alors activer JNK, qui peut être impliqué dans la régulation de l'expression génique. Plusieurs études ont montré que Cdc42 et RhoA sont capables de moduler la phosphorylation de GSK-3 β pour contrôler la stabilité des microtubules et la polarisation cellulaire (Etienne-Manneville and Hall 2003; Harwood and Braga 2003; Kim and Kimmel 2006). Ceci suggère que la voie PCP pourrait impliquer la GSK-3 β .

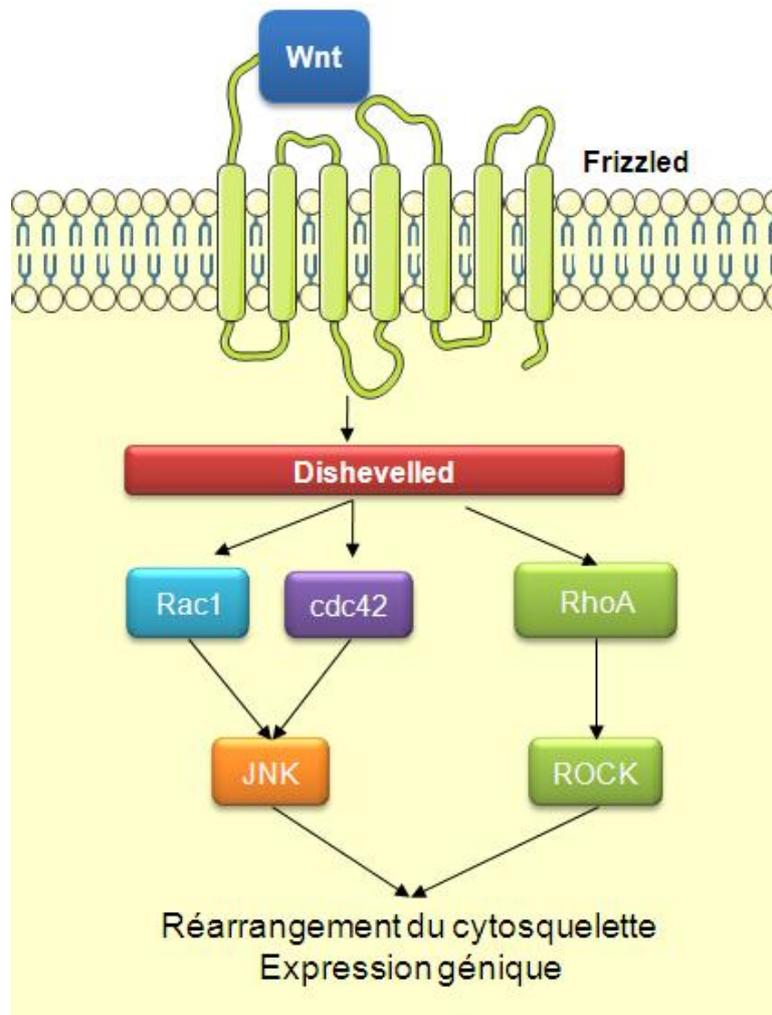


Figure 24- Modèle d'activation des protéines Rac1, cdc42 et RhoA dans la signalisation Wnt/Frizzled/Dishevelled.

- **sFRP, modulateurs de la voie Wnt**

Les voies de signalisation Wnt/Frizzled sont contrôlées par un grand nombre de modulateurs extracellulaires qui se lient soit directement sur les Wnt, soit sur les récepteurs des Wnt. La plupart du temps, ces modulateurs agissent en tant qu'antagonistes et constituent quatre grandes familles : les sFRP (secreted Frizzled Related Proteins), WIF-1 (Wnt Inhibitory Factor-1), Cerberus et Dickkopf (Dkk). Les trois premières familles peuvent se lier aux facteurs Wnt tandis que les protéines de la famille Dkk se lient au corécepteur LRP 5/6. Ces régulateurs sécrétés jouent des rôles majeurs dans l'embryogénèse et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Jones and Jomary 2002; Suzuki, Watkins et al. 2004).

Les sFRP représentent les médiateurs extracellulaires les plus puissants du système Wnt et sont les régulateurs les mieux étudiés. Le génome humain comporte 5 gènes sFRP dont les orthologues ont été identifiés chez plusieurs vertébrés, et il existe en tout 8 membres dans cette famille. La nomenclature actuelle s'accorde pour utiliser les termes sFRP1, 2, 3 (ou FrzB), 4, 5. Les sFRP sont des protéines sécrétées présentant un domaine riche en cystéine (CRD) homologue à celui des protéines Frz, mais ne possédant pas de domaine transmembranaire (Rattner, Hsieh et al. 1997). Ils peuvent lier les Wnt ou les récepteurs Frz (Dufourcq, Leroux et al. 2008) et agir ainsi en tant que modulateur de la signalisation Wnt. Dans certains cancers, il est apparu que la perte d'inhibition de la voie Wnt pourrait aussi être liée à une inactivation épigénétique des gènes *sFRP* et constituerait un mécanisme additionnel capable d'aboutir à un excès de signalisation Wnt dans ces pathologies (Suzuki, Watkins et al. 2004; Kongkham, Northcott et al. 2010).

L'un des membres de cette famille, sFRP1, cloné au laboratoire, est fortement exprimé dans le système cardiovasculaire, dès les premiers stades du développement embryonnaire chez la souris et au stade adulte (Jaspard, Couffinhal et al. 2000). Il a été montré que la surexpression cardiaque de sFRP1 bloque la cardioprotection engendrée par l'IPC sur un modèle murin d'infarctus du myocarde *in vivo*. Ceci s'accompagne d'une inhibition de la phosphorylation de GSK-3 β et de l'activation de PKC ϵ tandis que les taux de phosphorylation d'Akt, de JNK et de β -caténine sont inchangés (Barandon, Dufourcq et al. 2005).

- **Voie Wnt et pathologies cardiovasculaires**

L'implication du système Wnt/Frz en physiologie cardiovasculaire, notamment lors du développement cardiaque est maintenant démontrée. En effet, Wnt-3A et Wnt-8 sont capables de bloquer le développement du cœur, tandis que Wnt-11 le stimule dans un modèle d'explants de poulet (Eisenberg and Eisenberg 1999). La voie Wnt est notamment impliquée en pathologie et joue un rôle dans la néovascularisation après ischémie. Ainsi, sFRP1, un antagoniste de la voie Wnt, contrôle la croissance des cellules vasculaires *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'ischémie de la patte (Ezan, Leroux et al. 2004). Toujours chez la souris, Barandon et al. suggèrent l'implication de sFRP1 dans le contrôle de la réparation après infarctus du myocarde notamment grâce à ses potentialités angiogéniques (Barandon, Couffinhal et al. 2003). De plus, comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, la surexpression cardiaque de cet antagoniste de la signalisation Wnt bloque la cardioprotection engendrée par l'IPC sur un modèle d'infarctus *in vivo*. Enfin, Wnt est vraisemblablement impliqué dans certaines cardiomyopathies, comme le suggère le travail

de Schumann et al. qui ont observé une forte expression de sFRP3 et sFRP4 chez des patients atteints de cardiomyopathie ischémique et/ou dilatée (Schumann, Holtz et al. 2000).

- **Lien entre les voies Wnt et mTOR**

Inoki et al. ont démontré un lien entre la voie Wnt et la voie mTOR dans différents modèles *in vivo* de surexpression ou d'inactivation des acteurs de la voie Wnt (Inoki, Ouyang et al. 2006). Ils ont observé que des souris surexprimant Wnt-10b au niveau des ostéoblastes présentent un fort taux de phosphorylation de la protéine S6, indiquant que Wnt-10b peut activer la voie mTOR *in vivo*. Ils ont également observé que les souris mutées pour le corécepteur LRP 5/6 (LRP 5/6^{-/-}) présentent un taux de phosphorylation de p70S6K inférieur aux souris sauvages. La GSK-3 β serait impliquée dans cette interaction Wnt/mTOR. Cette activation de la voie mTOR serait également indépendante de la β -caténine, étant donné que Wnt-3a peut stimuler la phosphorylation de p70S6K et de S6 dans des MEFS exprimant une β -caténine mutée. Les auteurs en concluent donc que la voie Wnt pourrait bifurquer au niveau de GSK-3 β pour réguler la traduction par la voie mTOR et la transcription par la voie β -caténine. Dans d'autres travaux, Gao et al. ont décrit que l'autophagie, faisant intervenir mTOR, peut réguler négativement la voie Wnt en induisant une dégradation de Dishevelled (Gao, Cao et al. 2010).

III.1.a. β .vi - mTOR

mTOR (pour mammalian target of rapamycin) est une sérine/thréonine kinase de 289kDa, faisant partie de la famille des phosphatidylinositol kinase related kinases. Les membres de cette famille sont impliqués dans une grande variété de fonctions cellulaires, incluant la progression et le contrôle du cycle cellulaire, la réparation et les recombinaisons de l'ADN.

mTOR possède au niveau de la région C-terminale un domaine kinase capable de moduler l'activation de p70S6K et de 4E-BP1. Il possède également un domaine FRB (FKBP12-rapamycin binding) de 11kDa situé en amont du domaine kinase, dont la sérine 2035 est impliquée dans la liaison à la rapamycine, inhibiteur de mTOR. La mutation de cette sérine, empêche la fixation de la rapamycine, rendant mTOR insensible à cet inhibiteur (Vilella-Bach, Nuzzi et al. 1999).

mTOR est au cœur de deux complexes catalytiques : TOR complex 1 et 2 (TORC1 et TORC2). La rapamycine inhibe l'assemblage de TORC1 mais pas celui de TORC2, cependant ces mécanismes d'inhibition restent encore obscurs. La rapamycine pourrait affaiblir l'interaction entre mTOR et Raptor, un partenaire de TORC1, et ainsi réduire l'activité kinase de TORC1 (Soliman, Acosta-Jaquez et al. 2010). La rapamycine est d'ores et déjà utilisé en clinique comme agent immunosuppresseur ou en cardiologie, notamment sur les prothèses endocoronaires pour la restenose intra-stent. Il est à noter que l'on retrouve une activité mTOR aberrante lors de la progression de nombreux néoplasmes, notamment dans les tumeurs apparaissant dans les cas de scléroses tubéreuses (Guertin and Sabatini 2009).

Les deux complexes TORC1 et 2 contiennent mTOR, mLST8/GβL et deptor. mLST8/GβL se lie au domaine kinase de mTOR dans les deux complexes, mais apparaît comme étant critique uniquement dans l'assemblage de TORC2 et sa signalisation. Deptor fonctionne comme un inhibiteur de ces deux complexes. Les autres partenaires protéiques permettent de distinguer les deux complexes (**Figure 25**):

- **TORC1**

TORC1 contient exclusivement Raptor et PRAS40. Raptor fonctionne comme une protéine d'échafaudage qui lie le domaine kinase de mTOR aux substrats de TORC1, afin d'assurer sa signalisation. La fonction de PRAS40 est encore controversée, il pourrait agir comme inhibiteur de TORC1 (Dunlop and Tee 2009).

TORC1 intègre diverses signalisations extra- et intracellulaire impliquées dans les processus cellulaires. Les facteurs de croissance et les nutriments stimulent la synthèse protéique dépendante de TORC1, la croissance, la prolifération et le métabolisme cellulaire (Dunlop and Tee 2009). En cas d'insuffisance de ces facteurs ou de stress métabolique, l'action de TORC1 est bloquée pour maintenir un taux de synthèse approprié pour des conditions cellulaires suboptimales. Une diminution de l'activité TORC1 induit également l'autophagie, afin d'améliorer la survie cellulaire en cas de diminution de la disponibilité en nutriments (Chang, Juhasz et al. 2009). TORC1 induit également la transcription des ARN ribosomiaux et la synthèse des protéines (Inoki, Ouyang et al. 2005).

Raptor peut se lier directement sur le site TOS des cibles de mTOR, incluant p70S6K et 4E-BP1, et permet ainsi de les rapprocher du domaine kinase de mTOR (Dunlop and Tee 2009). Ce motif TOS est requis pour la phosphorylation de la thr389 de p70S6K par mTOR sur un motif hydrophobe, et pour la phosphorylation de 4E-BP1 sur de nombreux sites (thr37/46, thr70, ser65). Une mutation du domaine N-terminal de Raptor empêche sa liaison avec 4E-BP1 et bloque sa phosphorylation par mTOR. Ces deux substrats de TORC1, p70S6K et 4E-

BP1 sont tous les deux impliqués dans la traduction. La p70S6K inactivée s'associe au complexe d'initiation de la traduction eIF3 au niveau de la coiffe 5'-méthylguanosine des ARNm. Quand il est activé, TORC1 est recruté au complexe eIF3, où il phosphoryle directement p70S6K pour induire la traduction (Ma and Blenis 2009). Durant cette activation, TORC1 demeure au niveau de cette coiffe des ARNm où il peut phosphoryler 4E-BP1 sur de multiples sites. Quand il est hypophosphorylé, 4E-BP1 fonctionne comme un répresseur traductionnel se liant à eIF4E, un facteur d'initiation situé au niveau de la coiffe. La phosphorylation de 4E-BP1 par mTOR induit sa dissociation d'eIF4E, permettant à eIF4G et eIF4A de s'assembler avec eIF4E pour former le complexe eIF4F qui va initier la traduction de ces ARNm.

Ce complexe TORC1 est également impliqué dans la bioénergétique de la cellule. Il entraînerait une augmentation de la consommation d'oxygène de la mitochondrie ainsi qu'une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial (Schieke, Phillips et al. 2006).

- **TORC2**

En plus de mTOR, mLST8/GβL et deptor, TORC2 contient Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 et PRR5/protor. Rictor et mSin1 permettent l'assemblage et la signalisation de TORC2 tandis que la fonction de PRR5/protor reste obscure. La sérine/thréonine kinase Akt est le premier substrat identifié de ce complexe. TORC2 phosphoryle également les motifs hydrophobes de SGK1 (ser422) et de PKCα (ser657) (Alessi, Pearce et al. 2009).

Ce complexe est impliqué dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Sarbassov, Ali et al. 2004) mais aussi dans la croissance et le cycle cellulaire (Rosner, Fuchs et al. 2009). Il permet également de diminuer la consommation d'oxygène de la mitochondrie (Schieke, Phillips et al. 2006).

mTOR a un rôle très important dans le fonctionnement cardiaque. Son inhibition par la rapamycine bloque l'hypertrophie induite par une surcharge en pression *in vivo* (Boluyt, Li et al. 2004). Shen et al. ont démontré que des souris délétées en mTOR possèdent des fonctions cardiaques altérées (Shen, Chen et al. 2008). En effet, cette délétion de mTOR dans le myocarde de souris adultes résulte en une cardiomyopathie dilatée létale, caractérisée par de l'apoptose, de l'autophagie, une altération de la structure mitochondriale et une accumulation de 4E-BP1 (Zhang, Contu et al. 2010). mTOR est également impliquée dans la signalisation intracellulaire de l'IPC. En effet, son inhibition par la rapamycine bloque les effets cardioprotecteurs du préconditionnement dans un modèle d'infarctus *in vivo* de rat (Gross, Hsu et al. 2004). Si et al. ont également montré que la rapamycine inhibe

l'expression de la survivine, une protéine inhibitrice de l'apoptose. Ils observent aussi que le prétraitement avec du LY294002, un inhibiteur de PI3K, abolie la phosphorylation de mTOR et p70S6K après preconditionnement (Si, Tao et al. 2010).

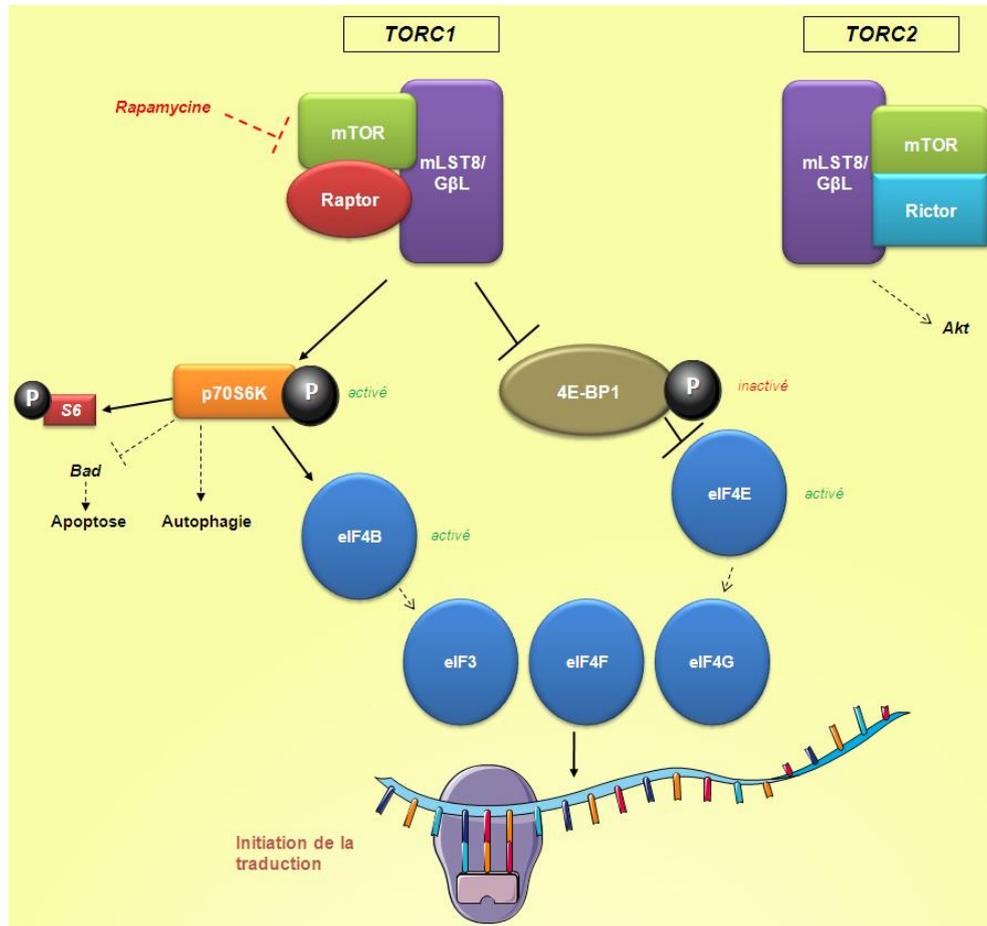


Figure 25- Voie de signalisation de mTOR

Il existe deux complexes impliquant mTOR : TORC1 et TORC2. La phosphorylation de mTOR, dans le complexe I, permet l'activation de p70S6K et l'inhibition de 4E-BP1, tous les deux impliqués dans l'initiation de la synthèse protéique.

III.1.a.β.vii -p70S6K

S6K est une MAP sérine/thréonine kinase, dont il existe deux isoformes, p70S6K et p85S6K, provenant du gène *p70S6K* ayant subi un épissage alternatif. p85S6K contient une extension de 23 acides aminés comprenant une séquence de six arginines impliquée dans sa localisation nucléaire. p70S6K, plus court au niveau N-terminal, est localisé dans le cytoplasme.

Cette kinase possède de nombreux sites de phosphorylation. De ce fait, de nombreuses voies (PKC, ERK, mTOR, Akt, PDK1) sont impliquées dans la phosphorylation et l'activation

de p70S6K, ce qui lui donne un rôle d'intégration de ces différentes signalisations. Chacun des quatre sites de phosphorylation ser411, ser418, thr421 et ser424 situé à l'extrémité C-terminale sont suivis d'un résidu proline. Ces sites sont partiellement phosphorylés dans les cellules quiescentes et sont tous rapidement phosphorylés lors de l'activation de p70S6K (Ferrari, Bannwarth et al. 1992). Quand ces résidus sont mutés en acides asparagiques ou en acides glutamiques, la kinase devient active à l'état basal, mais une activité plus importante peut être mesurée en présence de sérum (Han, Pearson et al. 1995). S'ils sont mutés en alanines, p70S6K présente une activité basale bien plus faible (Han, Pearson et al. 1995). La phosphorylation de ces quatre résidus facilite la phosphorylation de thr389 et ser404, situé dans la région linker de la protéine, ce qui permet le dépliement de la protéine. La phosphorylation de thr229 par PDK1 permet d'activer complètement la p70S6K. Les kinases impliquées dans la phosphorylation des autres sites seraient PKC, ERK, Akt, PDK1. mTOR phosphoryle le résidu thr389 (Ma and Blenis 2009), de ce fait, p70S6K est sensible à la rapamycine. La wortmannine, un inhibiteur de PI3K, bloque les phosphorylations de thr229, thr389, ser404 et ser411 (Han, Pearson et al. 1995). Des analyses ont révélé que la mutation de thr389 en alanine entraîne une perte de l'activité catalytique de p70S6K.

La cible principale de p70S6K est la protéine S6 de la sous-unité ribosomale 40S, impliquée dans le contrôle traductionnel des ARNm 5'-TOP (5'-oligopyrimidine tract, **Figure 25**). S6 devient alors rapidement phosphorylée sur cinq sérines situées dans la région C-terminale. Cette phosphorylation de S6 est étroitement liée à la synthèse protéique. Ce rôle de p70S6K dans la synthèse protéique est aussi confirmé par des études de disruption du gène *p70S6K* dans un modèle de cellules souches murines embryonnaires (Kawasome, Papst et al. 1998).

p70S6K serait aussi impliquée dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire (Lane, Fernandez et al. 1993). L'injection d'un anticorps neutralisant p70S6K dans des cellules bloque la progression du cycle en G1. De plus, les souris déficientes en p70S6K sont significativement plus petites, un effet encore plus marqué durant l'embryogénèse (Shima, Pende et al. 1998).

p70S6K peut également phosphoryler eIF4B, au niveau de la sérine 422, augmentant ainsi l'interaction d'eIF4B au facteur d'initiation de la traduction 3 (eIF3) (Shahbazian, Roux et al. 2006). Cette initiation de la traduction pourrait jouer un rôle important lors de l'IPC tardif. Enfin, p70S6K peut phosphoryler Bad et par la même pourrait inhiber son rôle pro-apoptotique (Harada, Andersen et al. 2001) mais est aussi capable de réguler positivement l'autophagie (Scott, Schuldiner et al. 2004).

III.1.a.β.viii – 4E-BP1

Les 4E-BP (eIF4E-binding proteins) sont une famille de trois petits peptides qui peuvent inhiber la traduction dépendante de la coiffe 5'-méthylguanosine, en empêchant la liaison de eIF4G à cette coiffe (Gingras, Raught et al. 1999). Les 4E-BP entrent en compétition avec eIF4G pour la liaison à eIF4E (Marcotrigiano, Gingras et al. 1999). Cette liaison des 4E-BP à eIF4E est réversible. Lorsqu'elles sont hypophosphorylées, les 4E-BP se lient à eIF4E alors que cette liaison est rompue par leur hyperphosphorylation (**Figure 25**).

De nombreux types de stimuli extracellulaires, incluant le sérum, les facteurs de croissance, les mitogènes, les cytokines, les agonistes des GPCR, sont capables d'induire l'hyperphosphorylation de 4E-BP1. L'activation de PI3K ou d'Akt entraîne également cette hyperphosphorylation (inhibée en présence de wortmannine ou de LY294002). Cette hyperphosphorylation est également inhibée en présence de rapamycine, qui inhibe la signalisation sous-jacente de mTOR.

La phosphorylation des sites de 4E-BP1 doit se faire de manière séquentielle. En effet, Gingras et al. ont démontré que la phosphorylation *in vivo* de thr37/thr46 est suivie par celle de la thr70 puis par celle de la ser65. Les phosphorylations sur ser65 et thr70 seules sont insuffisantes pour bloquer la liaison à eIF4E, indiquant que la combinaison de plusieurs phosphorylation est nécessaire pour dissocier 4E-BP1 d'eIF4E (Gingras, Raught et al. 2001).

Zhang et al. ont montré que des souris déplétées en mTOR possèdent une réponse hypertrophique perturbée dans un modèle de surcharge en pression. Les souris KO pour mTOR et 4E-BP1 présentent une amélioration de la fonction cardiaque et de la survie cellulaire. 4E-BP1 joue donc un rôle important dans la régulation de la viabilité des cardiomyocytes (Zhang, Contu et al. 2010).

III.1.a.β.ix – PKC

La famille des protéines PKC est impliquée dans une multitude de signaux engendrant l'hydrolyse des lipides. PKC est un polypeptide comprenant une région régulatrice N-terminale (d'environ 20-40 KDa), quatre domaines conservés (C1-C4) et une région catalytique C-terminale (45 KDa). Il existe onze isozymes PKC, classés en trois groupes, basés sur leurs structures et leurs régulations par des co-facteurs (Newton 1995):

- Les *PKC conventionnelles* : on distingue PKC β _I, PKC β _{II} et PKC γ . Cette classe est régulée par le calcium, *via* le domaine C2.
- Les *nouvelles PKC* : il s'agit de PKC δ , ϵ , η , θ et μ . Ces PKC sont structurellement similaires aux PKC conventionnelles, mais leur domaine C2 ne fixe pas le calcium.
- Les *PKC atypiques* : on y retrouve PKC ξ et λ . Elles ne possèdent pas la même structure que les deux premières classes et ne répondent pas au calcium. Il a été montré qu'un complexe impliquant la PKC ξ et Par-6 serait impliqué dans la régulation de GSK-3 β par Cdc42 (Etienne-Manneville and Hall 2003).

C'est l'isoforme PKC ϵ qui serait impliqué dans la cardioprotection (Kim, Kim et al. 2006; Costa and Garlid 2008). Les travaux de Korge et al. ont montré que l'utilisation d'un activateur isoforme spécifique de la PKC ϵ empêche l'ouverture du mPTP consécutive à l'anoxie-réoxygénation, protégeant ainsi la cellule (Korge, Honda et al. 2002).

En 2006, un très beau travail d'Alexandre Costa et al. a démontré l'existence de deux pools de PKC ϵ dans la mitochondrie, tous deux impliqués dans la cardioprotection (Costa, Jakob et al. 2006). Grâce à l'utilisation de ψ ϵ RACK, un activateur spécifique de PKC ϵ , ils observent que cet activateur a deux effets différents sur le gonflement mitochondrial induit par la présence de ROS, en présence ou non de potassium dans le milieu. Ils en déduisent donc qu'il existerait un premier pool de PKC ϵ (PKC ϵ ₁), non sensible à la concentration en K⁺ et situé en amont du mitoK_{ATP}, et un second pool (PKC ϵ ₂), sensible au K⁺, situé en aval du mitoK_{ATP}, qui serait responsable de la fermeture du mPTP durant l'IPC (**Figure 26**). Des expériences de co-immunoprécipitation ont d'ailleurs montré que PKC ϵ peut interagir avec le VDAC, ANT et l'hexokinase II, tous trois composants du mPTP.

Dans cette même étude, ils démontrent, par des fractionnements cellulaires et des préparations de mitoplastes, que PKC ϵ serait transloquée quand elle est activée au niveau de la surface extérieure de la membrane interne et/ou dans la matrice mitochondriale. Cette activation aurait au moins deux origines :

- Une activation par le NO : Des expériences utilisant des donneurs de NO montrent une translocation de PKC ϵ à la mitochondrie. Ceci serait dû à l'activation de l'eNOS, elle-même activée par Akt mais aussi par l'activation potentielle de la guanylate cyclase par le NO (Ping, Takano et al. 1999). Cette implication de PKG reste malgré tout controversée (Cohen, Yang et al. 2010).
- Une activation par les ROS générés durant les brèves périodes d'ischémie et reperfusion de l'IPC (Baines, Goto et al. 1997).

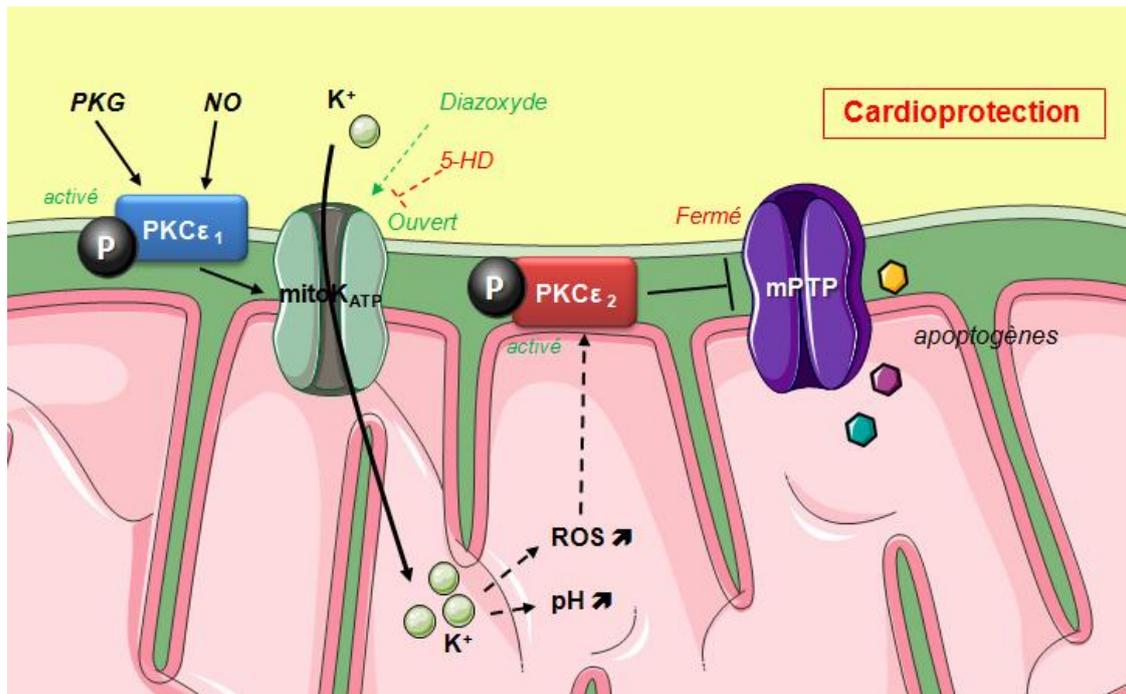


Figure 26 - Signalisation intracellulaire du preconditionnement ischémique (II) - De la translocation de PKCε au maintien de la fermeture du mPTP.

Il existerait deux pools de PKCε impliqués dans la cardioprotection. Le premier pool, en amont du mitoK_{ATP}, activé par la PKG et le NO, et le second pool, activé indirectement par l'ouverture du mitoK_{ATP} résultant en l'inhibition d'ouverture du mPTP.

III.1.a.β.x-NOS

L'oxyde nitrique synthétase (NOS) catalyse la conversion de la L-arginine en L-citrulline et en oxyde nitrique (NO). Dans le cœur, on retrouve trois isoformes de la NOS : la NOS neuronale (nNOS), l'endothéliale (eNOS) et l'inductible (iNOS). La nNOS et l'eNOS sont constitutivement présentes et leur activité enzymatique est calcium-dépendante. L'iNOS, dont l'activité est calcium-indépendante, est absente dans le cœur sain, mais son expression peut être induite durant l'inflammation (Wang and Marsden 1995; Huang 2009; Umar and van der Laarse 2010). Néanmoins, certaines études montrent que l'iNOS serait exprimée au niveau cardiaque et aurait un rôle crucial lors du preconditionnement à l'aide de donneurs de NO (Guo, Stein et al. 2005; West, Rokosh et al. 2008).

Le NO produit ne diffuse pas librement dans le cardiomyocyte. Il possède deux actions principales : (1) le NO stimule l'activité de la guanylate cyclase, une enzyme qui produit le GMP cyclique à partir du GTP ; (2) le NO peut nitrosyler les tyrosines et les groupements thiol

des cystéines modifiant ainsi les propriétés des canaux Ca^{2+} de type L, de la SERCA et du récepteur à la ryanodine de type 2 (RyR2) (Sun, Picht et al. 2006). Cette nitrosylation peut également inhiber les caspases 3 et 9 mais aussi JNK et l'activité transcriptionnelle de c-jun (Park, Yu et al. 2004).

En conditions de stress oxydant, la production d'ions superoxydes O_2^- augmente. Ces ions réagissent avec le NO pour former le peroxy-nitrite OONO^- . De ce fait, l' O_2^- capte le NO et celui-ci n'est plus disponible pour exercer ses fonctions physiologiques. L'eNOS ainsi découplée participe au stress oxydant (Beckman and Koppenol 1996; Umar and van der Laarse 2010).

Le NO aurait un rôle important lors de la cardioprotection. Il peut être généré par l'eNOS, qui est phosphorylée et activée par Akt, mais il peut aussi être généré durant l'ischémie par les déoxy-myoglobines ou les xanthines oxydoréductases (Li, Samouilov et al. 2003).

Le NO pourrait également être généré par l'iNOS. Des études sur souris surexprimant l'iNOS au niveau cardiaque (sous contrôle du promoteur de la chaîne lourde de l' α -myosine cardiaque) ont montré une diminution de taille d'infarctus après 30min d'occlusion coronarienne suivie de 24h de reperfusion. Cette protection a également été retrouvée sur ces mêmes souris dans un modèle de cœur isolé perfusé. De plus, les auteurs ont observé chez ces souris, après IR, une amélioration des performances contractiles du cœur et une diminution du relargage du cytochrome c et de la production de ROS au niveau de la mitochondrie, en comparaison avec des souris sauvages. En contrepartie, les souris iNOS KO ne présentent pas de protection après préconditionnement à l'aide de donneurs de NO, suggérant que l'iNOS serait bien exprimée au niveau myocardique, avec un rôle potentiellement important lors du préconditionnement (West, Rokosh et al. 2008).

Ce NO peut activer $\text{PKC}\epsilon$, entraînant ainsi sa relocalisation à la membrane mitochondriale (Costa, Jakob et al. 2006). Sur un modèle de cœur isolé de lapin, Cohen et al. ont montré que le NO intervenait durant l'IPC, dans une signalisation en aval d'Akt et ERK, indépendante de PKG (Cohen, Yang et al. 2010).

III.1.a.β.xi - Le mitoK_{ATP}

Les premières études sur l'IPC ont montré que des inhibiteurs de canaux potassiques ATP-sensibles peuvent bloquer la protection de l'IPC. De plus, l'activation pharmacologique de ces canaux mime l'action de l'IPC.

Pour distinguer quel canal K_{ATP} est impliqué lors de l'IPC, un inhibiteur spécifique du canal K_{ATP} sarcolemmal a été utilisé (HMR1098). Celui-ci ne semble pas avoir d'effet sur la cardioprotection lors de l'IPC (Ardehali and O'Rourke 2005). C'est en 1991 que Inoue et al. ont montré pour la première fois l'existence d'un canal potassique mitochondrial ATP sensible, le mitoK_{ATP} (Inoue, Nagase et al. 1991). Ce canal est impliqué dans la régulation du volume matriciel mitochondrial, les influx de potassium résultant en un gonflement mitochondrial (Dos Santos, Kowaltowski et al. 2002; Garlid, Dos Santos et al. 2003; Garlid and Paucek 2003). L'utilisation de diazoxide et de 5-hydroxydécanoate (5-HD), respectivement ouvreuse et inhibiteur de ce canal, ont prouvé son importance lors de la cardioprotection. En effet, l'ouverture par le diazoxide permet d'obtenir une protection comparable à celle observée après un IPC. De plus, le 5-HD, en bloquant l'ouverture du mitoK_{ATP}, inhibe la protection de l'IPC.

La structure moléculaire de ce canal reste pour le moment inconnue. Selon Ardehali et al., il serait composé de la succinate déshydrogénase, d'un transporteur de phosphate, de la translocase des nucléotides adényliques (ANT), d'une ATP synthase et de l'ATP binding cassette protein 1 (Ardehali, Chen et al. 2004).

Lors du préconditionnement, son ouverture serait due à la PKCε, activée par le NO (Ping, Takano et al. 1999; Costa, Jakob et al. 2006), mais le mécanisme reste encore obscur. Son ouverture/activation permet de diminuer légèrement le potentiel membranaire mitochondrial, ce qui diminue l'influx de Ca²⁺ dans la matrice durant l'ischémie. Il y a également une entrée de K⁺ dans la mitochondrie, qui induit une légère alcalinisation contribuant à une production de ROS. Ces ROS vont pouvoir maintenir l'activation de PKCε et ainsi entretenir le signal de protection (**Figure 26**) (Costa, Jakob et al. 2006).

III.1.a.β.xii - Les ROS

Voir également **I.2.b.β- Perturbations du métabolisme énergétique du myocarde en conditions ischémiques.**

De nombreuses études montrent que les ROS ne sont pas toujours délétères, mais peuvent jouer un rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire (Thannickal and Fanburg 2000; Droge 2002; Fruehauf and Meyskens 2007). Cette balance est liée à leur quantité, leur taux de production, leur lieu de production et leur site de relargage (Stowe and Camara 2009).

La signalisation induite par les ROS implique en général deux mécanismes : des altérations d'oxydoréduction et des modifications oxydatives des protéines. Les ROS régulent une grande variété de voies de signalisation, mais leurs cibles demeurent obscures. Ils jouent un rôle important lors du préconditionnement. Ces ROS peuvent activer la prolifération cellulaire en inhibant par exemple la tyrosine phosphatase 1B (van Montfort, Congreve et al. 2003), activer et transloquer la PKC (Novalija, Kevin et al. 2003), activer la famille des MAPK (ERK, p38, JNK) et activer le facteur de transcription NF-κB (Thannickal and Fanburg 2000). La perfusion de 2-mercaptopropionyl glycine (MPG), un scavenger de ROS, abolit la protection apportée par le HMR1098 sur un modèle de cœur isolé de rat (Pasdois, Beauvoit et al. 2007).

III.1.a.β.xiii - Le mPTP

Crompton et al. ont été les premiers à définir en partie la composition moléculaire du mPTP. Cependant, la structure du mPTP est complexe et demeure l'objet d'un gros effort de recherche. Le modèle faisant consensus associe la porine ou canal à anions voltage dépendant (VDAC) localisé sur la membrane mitochondriale externe, la translocase des nucléotides adényliques (ANT) localisée sur la membrane mitochondriale interne, la cyclophiline D (CypD) localisée dans la matrice mitochondriale, ainsi que d'autres protéines comme le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), l'héxokinase (HK), la créatine kinase (mCK), la protéine proapoptotique Bax et la protéine antiapoptotique Bcl-2 (**Figure 27**). Cependant, le rôle des différents composants pressentis du mPTP reste débattu.

En effet, Baines et al. ont montré, sur un modèle de mitochondries déficientes en VDAC 1 et VDAC 3, ainsi que sur fibroblastes exprimant un VDAC 2 KO, que le VDAC n'est pas indispensable à l'occurrence de la mort cellulaire liée à la mitochondrie (**Figure 28A**) (Baines, Kaiser et al. 2007). De plus, Kokoszka et al. ont montré que l'ANT n'est pas nécessaire au

fonctionnement du mPTP, à l'aide de souris KO pour ANT 1 et 2 (**Figure 28B**) (Kokoszka, Waymire et al. 2004).

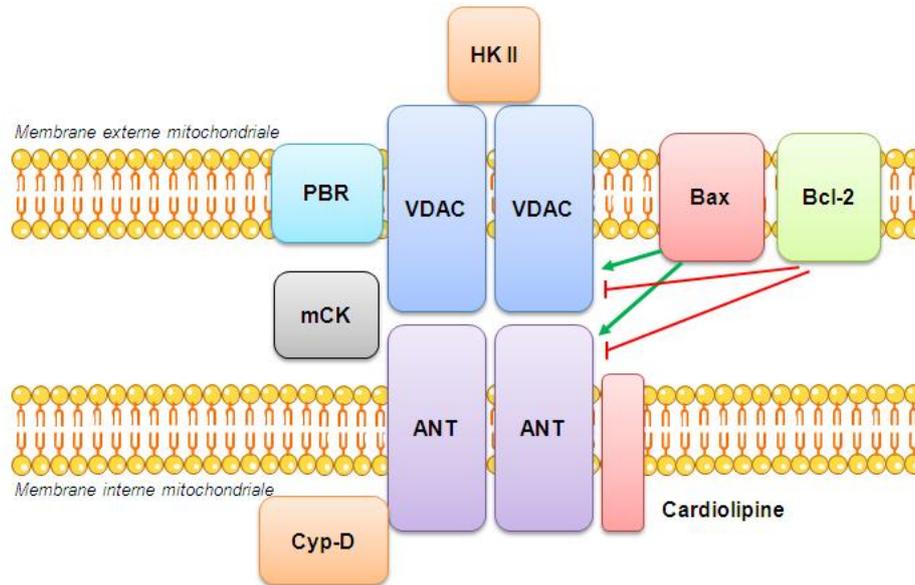


Figure 27- Architecture moléculaire hypothétique du pore de transition de perméabilité mitochondrial mPTP.

HK II, Héxokinase II ; PBR, récepteur périphérique aux benzo diazépines ; VDAC, canal à anions voltage dépendant ; mCK, Créatine Kinase mitochondriale ; Cyp-D, Cyclophiline D ; ANT, translocase des nucléotides adényliques. Figure adaptée de Zamzami et al. (2001).

En revanche, il a été montré *in vivo* et *in vitro* sur des souris transgéniques que la déficience en CypD augmente la résistance vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion, de la surcharge calcique et du stress oxydant. Parallèlement, d'autres études ont également montré que l'inhibition de la Cyp-D par la cyclosporine A (CsA) diminue la susceptibilité d'ouverture du mPTP et protège le cœur vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion (Nazareth, Yafei et al. 1991 ; Piot, Croisille et al. 2008 ; Gomez, Li et al. 2009 ; Ivanov, Rioufol et al. 2010 ; Newton, Croisille et al. 2010). L'ensemble de ces travaux met en exergue le rôle primordial de la Cyp-D dans la structure et la fonction du mPTP (**Figure 28C**).

Durant l'IPC, on assiste à une inhibition de l'ouverture du mPTP, qui pourrait être due au deuxième pool de PKC ϵ et au maintien de son activation par la petite quantité de ROS générée suite à l'ouverture du mitoK_{ATP} (**Figure 26**) (Costa, Jakob et al. 2006). Le mPTP, maintenu fermé, empêche donc la perturbation de l'homéostasie ionique engendrant la rupture de la membrane externe de la mitochondrie et la libération d'apoptogènes mitochondriaux (cytochrome *c*, AIF (Apoptosis Inducible Factor))(Javadov and Karmazyn 2007) (voir aussi **Chapitre II – Mort cellulaire et ischémie-reperfusion**). Sa fermeture va

également préserver les transferts d'énergie de la mitochondrie aux sites utilisateurs d'ATP (Laclau, Boudina et al. 2001).

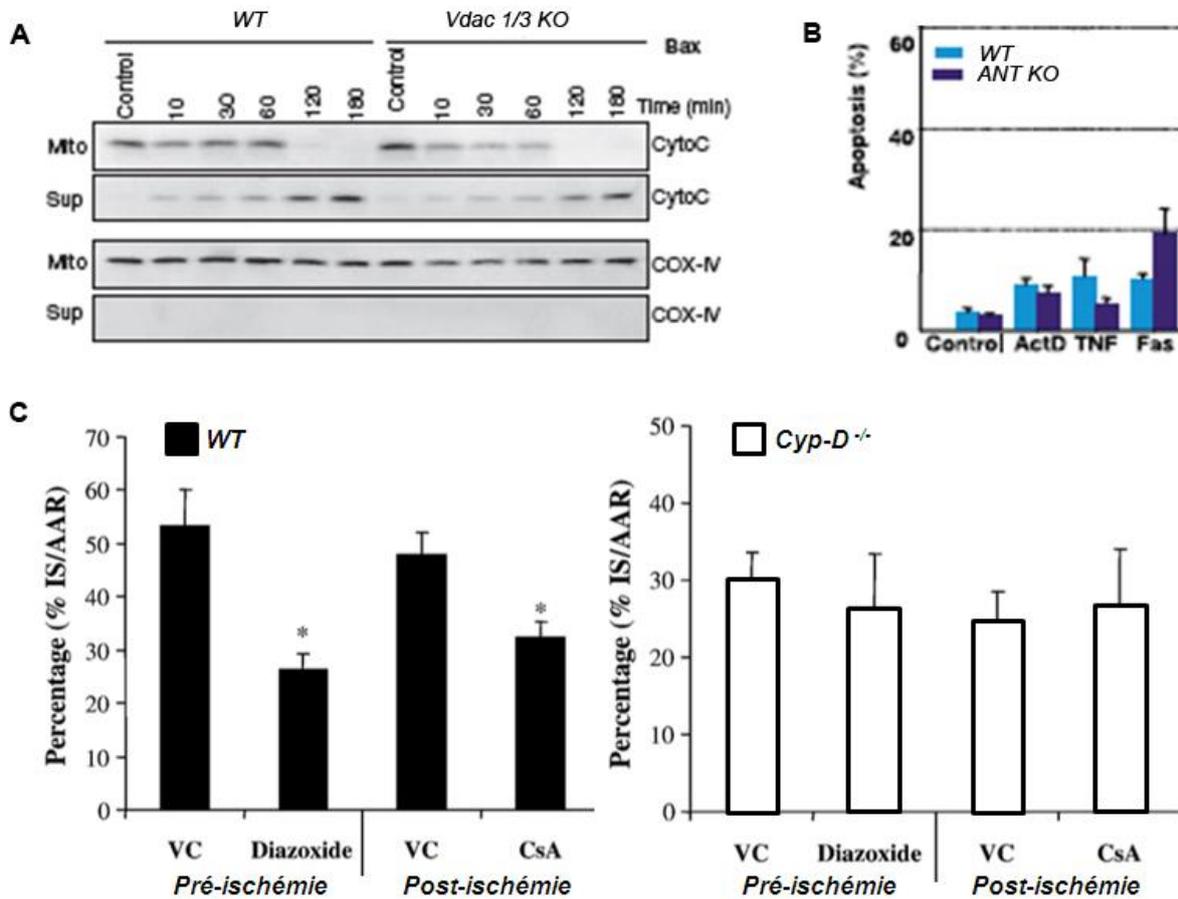


Figure 28- Étude des composants du mPTP.

Les KO de VDAC (**A**) et d'ANT (**B**) n'ont pas d'effet lors de la mort cellulaire impliquant la mitochondrie. Figures issues de Baines et al. (2007) et Kokoszka et al. (2004) respectivement. (**C**) Le KO de Cyp-D engendre une cardioprotection similaire à un préconditionnement, un postconditionnement ou l'injection de cyclosporine A. Figure issue de Lim et al. (2007).

III.1.b- Le préconditionnement pharmacologique

Malgré d'importantes limites dans son exploitation clinique, l'étude de l'IPC s'est avérée fondamentale pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la cardioprotection vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion. Les travaux réalisés dans ce domaine ont permis d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques pour le développement de nouveaux médicaments cardioprotecteurs ou de nouvelles stratégies de prise en charge de situations cliniques comportant un syndrome d'ischémie-reperfusion (Argaud and Ovize 2004).

L'objectif est ici de mimer l'IPC de manière pharmacologique, en ciblant un ou plusieurs protagonistes de la voie de signalisation, diminuant ainsi les risques d'effets secondaires délétères mais aussi la mise en place d'un protocole lourd comme lors de l'IPC. On parle ainsi de Préconditionnement Pharmacologique, ou PPC.

III.1.b.α - PPC par les cytokines

On va retrouver ici principalement des facteurs de croissance.

- *Transforming Growth Factor-β1 (TGF- β1)*

Le TGF-β1 est une cytokine impliquée dans la croissance et la différenciation cellulaire, ainsi que dans la modulation de l'apoptose. Baxter et al. ont montré qu'un préconditionnement de myocytes ventriculaires de rats par l'administration de TGF-β1 engendre une réduction de la mort cellulaire (diminution du nombre de cellules TUNEL et annexine V positives). Ils observent également, sur cœur isolé perfusé de rat, une diminution de la taille de l'infarctus après préconditionnement au TGF-β1. Cette protection est bloquée par le PD98059, un inhibiteur des MAPK (Baxter, Mocanu et al. 2001).

- *Insuline*

L'insuline, administrée en tant qu'agent préconditionnant sur un modèle de cœur isolé perfusé, entraîne une diminution significative de la taille d'infarctus. Cet effet est bloqué par le HIMO, un inhibiteur d'Akt, et la rapamycine, un inhibiteur de mTOR. Cette cardioprotection passe donc par l'activation d'Akt et de mTOR (Fuglesteg, Tiron et al. 2009).

- *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)*

Un préconditionnement par l'IGF-1 prévient la nécrose sur un modèle de cœur isolé perfusé de rat, comme en témoignent l'amélioration de la récupération des fonctions du ventricule gauche et la diminution du relargage de la créatine kinase durant la reperfusion. Le traitement à l'IGF-1 diminue également le nombre de myocytes apoptotiques. Cette protection est supportée par une augmentation de Bcl-x_L et une diminution de Bax. De plus, les mitochondries prétraitées à l'IGF-1 présente une amélioration significative de la synthèse d'ATP (Yamamura, Otani et al. 2001).

- *Cardiotrophine-1 (CT-1)*

Membre du groupe des interleukines-6 (IL-6), elle est impliquée dans la croissance hypertrophique des cardiomyocytes mais aussi dans la cardioprotection. La cardiotrophine-1 exerce des effets antiapoptotiques sur cultures de myocytes ventriculaires de rats nouveau-nés. La transfection du dominant négatif MEK1 (membre des MAPKK) ou la présence de PD098059 (inhibiteur de MAPK) bloquent la protection apportée par la CT-1. La survie myocardique induite par la cardiotrophine-1 passe donc par l'activation d'une voie antiapoptotique qui requiert les MAP kinases (Sheng, Knowlton et al. 1997).

- *Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2)*

Jiang et al., sur un modèle d'occlusion coronaire chez le rat, ont montré que l'injection de FGF-2 dans le ventricule gauche entraînait une diminution des dommages liés à l'IR et une amélioration de la pression développée, comparé aux rats contrôles. Ces effets perdurent 6 semaines après l'infarctus (Jiang, Padua et al. 2002). L'injection de FGF-2 muté, caractérisé par une affinité plus faible pour le récepteur tyrosine kinase FGFR1, n'est pas cardioprotectrice.

Sur un modèle de cœur isolé perfusé de rat, l'administration de FGF-2 s'avère également protectrice. Cette protection est ici associée à l'activation de PKC, comme en témoigne son abolition en présence de chélérythrine.

La protection par FGF-2 requiert donc une liaison au récepteur FGFR1 et serait médiée par PKC (Jiang, Padua et al. 2002).

- *Erythropoïétine (EPO)*

Dans un modèle de cœur isolé perfusé de rat, Hanlon et al. ont montré que l'EPO entraînait une amélioration significative de la pression développée par le ventricule gauche et une diminution de la taille d'infarctus après 20min d'ischémie suivie de 40min de reperfusion. La

perfusion de U0126, un inhibiteur de MEK, abolit la phosphorylation de ERK induite par l'EPO sans avoir d'effet sur la protection.

Le traitement à l'EPO induit la translocation de PKC ϵ à la mitochondrie. La chélérythrine et la wortmannine bloquent la protection par l'EPO (Hanlon, Fu et al. 2005).

III.1.b. β – PPC par les ligands des GPCR

Plusieurs molécules, se liant aux récepteurs couplés aux protéines G, sont cardioprotectrices. Elles vont ainsi entraîner la transactivation des récepteurs à activité tyrosine kinases, qui vont pouvoir activer PI3K-Akt et aussi Erk1/2.

- *Urocortine*

L'urocortine est un peptide de la famille de l'hormone hypothalamique corticotrophin-releasing factor (CRF). Il possède des récepteurs dans le cerveau, mais aussi dans les tissus périphériques, dont le cœur. L'urocortine protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire quand il est administré avant l'hypoxie. De plus, l'urocortine est capable d'induire la phosphorylation de ERK (Brar, Jonassen et al. 2000). Schulman et al. ont montré un effet cardioprotecteur de l'urocortine sur cœur isolé de rat, mais aussi sur un modèle *in vivo* d'occlusion coronaire de rat. Cette protection est associée à l'activation de ERK, comme le montre son inhibition par le PD98059 (Schulman, Latchman et al. 2002).

- *Adénosine, bradykinine, opioïdes*

Sur un modèle de cœur isolé perfusé de souris, Peart et al. ont montré que l'adénosine diminuait, de façon dose-dépendante, la dysfonction myocardique après reperfusion ainsi que la nécrose. Ils ont également montré que la réduction de la nécrose implique l'ouverture du mitoK_{ATP}, comme en témoigne son abolition par le 5-HD, mais est indépendante de PKC et du NO, comme en témoigne l'absence d'effet de la chélérythrine ou du L-NAME (Peart and Headrick 2003). En revanche, la protection vis-à-vis de la sidération myocardique est inhibée par le 5-HD et la chélérythrine. Elle implique donc le mitoK_{ATP} et PKC (Cohen and Downey 2008).

La bradykinine, administrée en tant qu'agent préconditionnant, offre une cardioprotection comparable à l'IPC sur un modèle de cœur isolé de rat. La perfusion de 5-HD, L-NAME et chélérythrine bloque cette protection. Cette cardioprotection implique donc le NO, la PKC et le mitoK_{ATP} (Yoshida, Kusama et al. 2005).

Les opioïdes exercent également un rôle protecteur. Sur un modèle de cœurs isolés de rats, Fräßdorf et al. ont obtenu une diminution de taille d'infarctus de l'ordre de 50% après traitement à la morphine, comparable à celle obtenue après IPC (Frassdorf, Huhn et al. 2010).

III.1.b.γ- Peptides natriurétiques

L'ANP (A-type Natriuretic Peptide) et le BNP (B-type Natriuretic Peptide) peuvent se fixer sur le récepteur A des peptides natriurétiques et engendrer une cardioprotection.

La perfusion d'ANP dans des cœurs isolés de rats engendre une diminution de la taille d'infarctus après 20min d'ischémie suivie de 120min de reperfusion. Cette protection est abolie par la perfusion de L-NAME, de chélérythrine et de 5-HD, témoignant de l'implication du NO, de PKC et du canal mitoK_{ATP} (Okawa, Horimoto et al. 2003).

Des premières études cliniques prometteuses ont été réalisées. La perfusion d'ANP chez des patients ayant eu un infarctus améliore la fraction d'éjection du ventricule gauche et prévient le remodelage délétère du ventricule gauche (Hayashi, Tsutamoto et al. 2001; Deschepper 2005).

III.1.b.δ - Anesthésiques volatils

Le préconditionnement par administration d'anesthésiques (APC) active de nombreuses cibles intracellulaires impliquées dans l'IPC (Pagel 2009).

L'APC stimule la production d'une petite quantité de ROS qui peuvent activer la PKC, le mitoK_{ATP} et d'autres composants d'une cascade de signalisation aboutissant à la cardioprotection (Zaugg, Lucchinetti et al. 2003). Des piègeurs de ROS bloquent la translocation de PKC induite par l'isoflurane dans le cœur de rat *in vivo* (Ludwig, Weihrauch et al. 2004). La bisindolylmaleimide et la chélérythrine, deux inhibiteurs non-sélectifs de PKC, bloquent les effets cardioprotecteurs de l'APC dans le myocarde de chien et de lapin (Cope, Impastato et al. 1997; Toller, Montgomery et al. 1999). L'APC induit également une augmentation de l'activité de ERK1/2, bloquée par la chélérythrine et le 5-HD, ce qui suggère que l'activation de PKC, l'ouverture du mitoK_{ATP} et la production de ROS sont en amont de l'activation de ERK1/2.

L'activation des GPCR joue aussi un rôle important durant l'APC. L'utilisation d'un antagoniste du récepteur à l'adénosine A₁ atténue partiellement les effets protecteurs de l'isoflurane sur le myocarde de chien (Kersten, Orth et al. 1997).

III.1.b.ε – Statines

Les statines, ou inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase, peuvent induire une cardioprotection (Lee, Lin et al. 2007; Merla, Daher et al. 2007).

L'oxyde nitrique joue un rôle clé dans la cardioprotection et les autres effets pleiotropiques des statines. Des études expérimentales ont montré que les statines stabilisent l'ARNm de l'eNOS, active l'eNOS et augmente la production de NO (Scalia, Gooszen et al. 2001). Les mécanismes conduisant à cet effet sont encore obscurs mais il semblerait qu'ils impliquent la voie PI3K-Akt-eNOS (Bell and Yellon 2003). En effet, la protection par administration d'atorvastatine est inhibée en présence d'un inhibiteur de PI3K et chez les souris eNOS^{-/-}.

III.1.b.ζ- Angiotensine II

L'angiotensine II est une hormone peptidique impliquée dans la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose, en plus de son rôle classique dans la régulation de la pression artérielle (Leung 2004).

L'administration d'angiotensine II, avant l'ischémie, active la protéine PKC (Sharma and Singh 2000) et est susceptible d'entraîner l'ouverture du canal mitoK_{ATP} et la production de ROS qui en découle (Kimura, Zhang et al. 2005). De plus, sur des cardiomyocytes en culture, l'angiotensine II entraîne la phosphorylation/activation de ERK1/2, JNK et p38 (Kudoh, Komuro et al. 1997). Cette implication des MAPK lors du préconditionnement à l'angiotensine II a été confirmée sur un modèle d'infarctus de rat *in vivo* (Wu, Laplante et al. 2004).

III.1.b.η- Donneurs de NO

Sur un modèle d'infarctus murin, Guo et al. ont montré que trois différents donneurs de NO étaient capables d'induire une diminution de taille d'infarctus après ischémie. En effet, ils observent une diminution de l'ordre de 50% de la taille de l'infarctus après prétraitement avec du diéthylentriamine/NO, de la nitroglycérine ou du S-nitroso-N-acétyl-penicillamine (Guo, Stein et al. 2005). West et al. ont également montré que le donneur de NO NOC-22 diminue la susceptibilité de l'ouverture du mPTP sur des mitochondries isolées. La protection offerte par tous ces donneurs de NO est bloquée chez des souris iNOS KO. La NOS inductible serait donc primordiale lors du préconditionnement par des donneurs de NO (Guo, Stein et al. 2005; West, Rokosh et al. 2008).

III.1.b.θ- Les KCO

Les KCO, ou ouvreurs de canaux potassiques, peuvent agir en tant que cardioprotecteurs (Garlid, Dos Santos et al. 2003). Il existe deux grands types de canaux potassiques ATP-sensibles au niveau du cardiomyocyte, le canal potassique ATP sensible sarcolemmal (sarck_{ATP}, situé sur la membrane du myocyte) et le mitoK_{ATP}, non cloné, localisé sur la membrane mitochondriale interne. Seul le mitoK_{ATP} serait impliqué dans la cardioprotection (Ardehali and O'Rourke 2005). Les KCO peuvent avoir plusieurs cibles (**Tableau 1**), et seuls le diazoxide, le nicorandil et le BMS191095 affichent une bonne spécificité vis-à-vis du mitoK_{ATP}.

	mitoK _{ATP}	mitoK _{ATP} + sarck _{ATP}	sarck _{ATP}
Ouvreur	Diazoxide Nicorandil BMS 1910095	Cromakalim Pinacidil P-1060 Sildenafil Isoflurane AMD60480 Aprikalim Minoxidil sulfate KRN2391 Levosimendan	P-1075 MCC-134
Bloqueur	5-hydroxydécanoate MCC-134	Glibenclamide Glipizide	HMR 1098 Glimepiride

Tableau 1- Modulateurs des canaux K_{ATP} et leurs spécificités.

Tableau adapté de Ardehali et al. (2005).

Des travaux ont montré que la diminution de taille de nécrose myocardique était comparable suite à un préconditionnement ischémique ou un préconditionnement pharmacologique par le diazoxide. De plus, en présence d'un inhibiteur sélectif du canal mitoK_{ATP}, le 5-hydroxydécanoate (5-HD), les deux types de préconditionnement sont inhibés, montrant ainsi des similitudes entre les deux voies impliquées. Des travaux de Sollott et al. ont montré, sur cardiomyocytes en culture, un effet du diazoxide sur l'inactivation de GSK-3β (Juhaszova, Zorov et al. 2004).

Dans une étude récente, Cui et al. démontrent que le prétraitement au diazoxide de cellules souches mésenchymateuses les protège du stress oxydant, en augmentant la phosphorylation d'Akt mais aussi l'expression du basic FGF (Fibroblast Growth Factor) et de

l'HGF (hepatocyte growth factor), et en diminuant le relargage du cytochrome c dans le cytosol (Cui, Wang et al. 2010).

III.1.b.1- La cyclosporine A

La cyclosporine A (CsA) est un inhibiteur spécifique du mPTP. Utilisée comme agent préconditionnant, elle empêche son ouverture et donc la rupture des membranes mitochondriales et le relargage des agents apoptogènes (Nazareth, Yafei et al. 1991; Piot, Croisille et al. 2008; Gomez, Li et al. 2009; Ivanes, Rioufol et al. 2010; Mewton, Croisille et al. 2010).

III.2- Le postconditionnement

L'exploitation clinique du concept de préconditionnement se heurte à une limite majeure. En effet, elle requiert, par définition, d'intervenir avant l'ischémie qui, le plus souvent, est un événement imprévisible. Ce talon d'Achille est particulièrement problématique dans le contexte de la prise en charge de l'infarctus du myocarde à la phase aiguë qui constitue le principal domaine d'application de la cardioprotection. C'est la raison pour laquelle, la première description, en 2003, du phénomène de postconditionnement ischémique (Zhao, Corvera et al. 2003) a considérablement stimulé la recherche dans ce domaine.

III.2.a- Le postconditionnement ischémique

III.2.a.α- Historique

Il y a plus de dix ans, Zhi-Qing Zhao a eu l'idée de décaler le stimulus préconditionnant à la première minute de reperfusion, espérant ainsi atténuer les processus délétères liés à la reperfusion (Vinten-Johansen, Yellon et al. 2005).

Il a tout d'abord adapté le protocole d'IPC à la reperfusion, réalisant ainsi, sur un modèle *in vivo* de chien, plusieurs cycles de 5min ischémie / 5min reperfusion juste après la phase d'ischémie prolongée. Ce protocole n'a apporté aucune cardioprotection.

Le concept a alors été mis de côté, et ce n'est qu'en 2003 que Zhao et al. ont découvert que les algorithmes d'ischémie/reperfusion jusqu'alors utilisés pour le postconditionnement n'étaient pas adaptés. En effet, les dommages arrivant à la reperfusion sont des réactions très rapides, ne nécessitant que quelques minutes pour se mettre en place (stress oxydant lié à la reperfusion, activation des neutrophiles, lésions de l'endothélium cardiovasculaire, perturbations calciques). Ils utilisent alors un algorithme de 30sec ischémie / 30sec reperfusion sur un modèle d'occlusion coronaire canin et observent une diminution de la taille d'infarctus (44% de diminution par rapport au contrôle), de l'œdème tissulaire, et de la dysfonction endothéliale, comparables à celles observées lors d'un préconditionnement ischémique (**Figure 29**) (Zhao, Corvera et al. 2003).

Le concept de postconditionnement ischémique (IPost) renaissait.

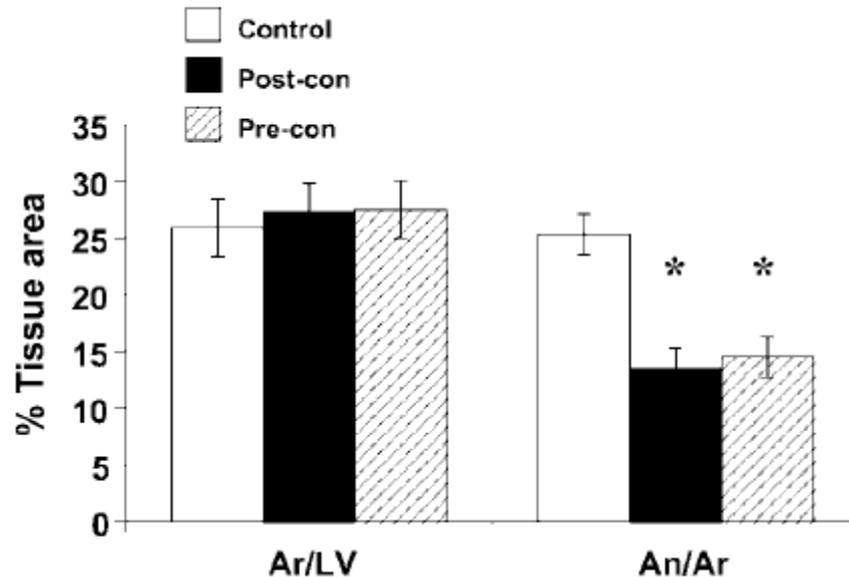


Figure 29- Mesure de la taille d'infarctus - Comparaison entre postconditionnement et preconditionnement ischémiques.

L'IPost apporte une cardioprotection comparable à celle de l'IPC. Figure issue de Zhao et al. (2003).

Depuis les travaux de Zhao, de nombreuses études ont été menées sur différents modèles animaux et les algorithmes d'IPost ont dû être adaptés (van Vuuren and Lochner 2008; Skyschally, van Caster et al. 2009). Comme observé aux débuts de l'IPost, l'adaptation des durées des cycles d'IR ainsi que leurs nombres sont des paramètres clés pour l'efficacité de la stratégie. À titre d'exemple, sur un modèle de cœur isolé perfusé murin, trois cycles de 10sec IR n'apportent que 7% de protection (Przyklenk, Maynard et al. 2008), alors que 10 cycles de 5sec IR diminuent de 44% la taille d'infarctus (Nishino, Webb et al. 2008).

L'IPost a également été étudié chez l'Homme (Staat, Rioufol et al. 2005). En 2005, sur une cohorte de 30 patients, un protocole de postconditionnement ischémique, comprenant 4 cycles de reperfusion/réocclusion de 1min, a été appliqué avec succès lors de l'angioplastie directe réalisée à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde. Il en résultait une diminution du relargage de la créatine kinase, correspondant à une diminution de l'ordre de 36% de la taille de nécrose.

III.2.a.β- Signalisation intracellulaire du postconditionnement ischémique

La reperfusion intermittente durant l'IPost entraîne une acidose transitoire et une rétention d'agonistes tels que la bradykinine, l'adénosine ou les opioïdes, impliqués dans le mécanisme déclencheur de la cardioprotection (Penna, Mancardi et al. 2007).

Si les mécanismes intracellulaires lors de l'IPost sont assez similaires à ceux du preconditionnement (Hausenloy 2009), ils restent malgré tout assez obscurs. De ce fait, Lacerda et al. proposent deux voies de signalisations parallèles qui seraient mises en jeu (**Figure 30**) (Lacerda, Somers et al. 2009) :

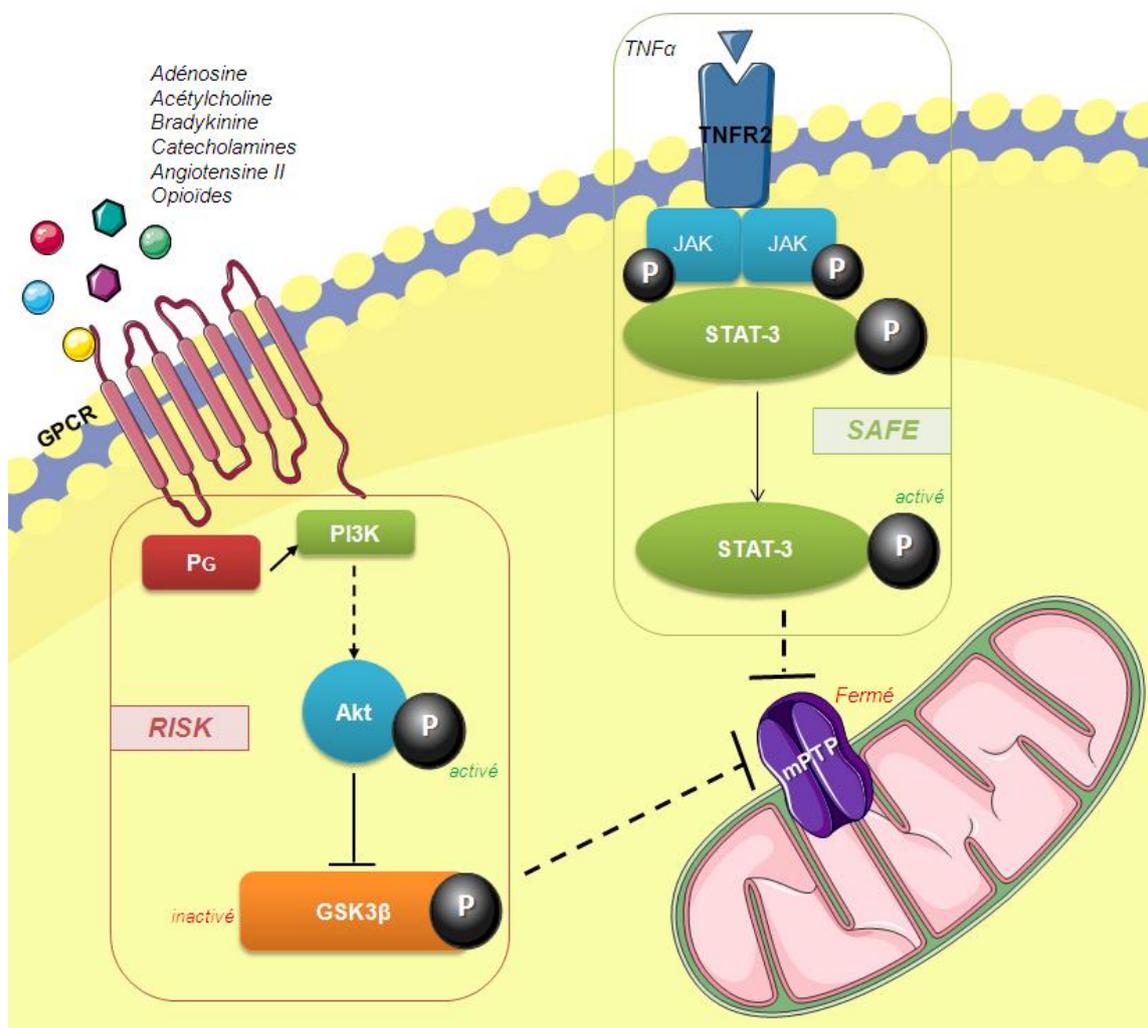


Figure 30- Signalisation intracellulaire du postconditionnement – Mise en parallèle des voies RISK et SAFE.

Deux voies seraient impliquées lors de l'IPost : la voie RISK, avec activation des récepteur GPCR et de la voie PI3K/Akt ; et la voie SAFE, avec l'activation du récepteur TNFR2 et la translocation de STAT-3. Ces deux voies aboutissent à l'inhibition d'ouverture du mPTP.

- La voie *RISK* (Reperfusion Injury Salvage Kinases).

La voie *RISK* présente de nombreuses similitudes avec celle mise en jeu lors du préconditionnement, avec activation de PI3K/Akt et inhibition de GSK-3 β (**Figure 30**) (Zhu, Feng et al. 2006; Gross, Hsu et al. 2008). Néanmoins, cette inhibition a été remise en question récemment par Nishino et al. qui ont observé que l'IPost n'est pas affecté chez des souris dont la GSK3 n'est plus inactivable (Nishino, Webb et al. 2008).

Le rôle de la voie *RISK* reste malgré tout controversé. En effet, deux études sur le cochon ont montré que la voie *RISK* ne serait pas impliquée lors de l'IPost (Musiolik, van Caster et al.; Skyschally, van Caster et al. 2009).

- La voie *SAFE* (Survivor Activating Factor Enhancement).

Les protéines STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) font partie de la voie JAK-STAT, impliquée dans la transduction des signaux de stress de la membrane plasmique au noyau. Cette voie est initiée par la liaison d'un ligand à son récepteur situé sur la membrane plasmique, entraînant son homo- ou hétérodimérisation. Dans le myocarde, on retrouve des cytokines de type interleukine 6 ou 11, le LIF, l'oncostatine M, le CNTF (ciliary neurotrophic factor), la cardiotrophine-1, le TNF α , ... (Fischer and Hilfiker-Kleiner 2007).

La dimérisation du récepteur entraîne la phosphorylation et l'activation de la protéine JAK, associée à la partie intracellulaire de ce récepteur. Une fois activée, JAK peut phosphoryler le récepteur créant ainsi des sites de liaisons pour les protéines STAT cytosoliques, *via* leurs domaines SH2. JAK va alors phosphoryler la protéine STAT (sur le résidu tyr705 pour STAT3) qui va se dimériser avec une autre STAT (**Figure 30**). Une fois dimérisée, STAT se dissocie du récepteur et se transloque au noyau où elle va se lier à des séquences spécifiques d'ADN et réguler l'expression de gènes cibles. Dans le myocarde, STAT régule l'expression de protéines impliquées dans l'angiogénèse, l'inflammation, l'apoptose, la composition de la matrice extracellulaire, la signalisation cellulaire (Boengler, Hilfiker-Kleiner et al. 2008; Snyder, Huang et al. 2008). L'activité transcriptionnelle des STAT est régulée par les protéines PIAS (protein inhibitors of STAT), qui vont réguler négativement la liaison à l'ADN des STAT activées, et par les protéines p300/CREB et Crif1, qui vont agir comme co-activateurs des STAT (Wang, Cherukuri et al. 2005).

Sur un modèle murin d'infarctus *in vivo*, Boengler et al. ont observé une augmentation de la phosphorylation de STAT3 après IPost. L'ajout d'un inhibiteur de JAK-2 (AG-490) durant

l'IPost abolit la phosphorylation de STAT3 ainsi que la diminution de la taille de l'infarctus. De plus, la délétion de STAT3 dans le cœur de souris bloque la cardioprotection induite par l'IPost (Boengler, Buechert et al. 2008). Enfin, le préconditionnement utilisant la voie SAFE aurait une action sur le mPTP au niveau de la mitochondrie, car l'ajout d'atractyloside (un ouvreur du mPTP) bloque les effets cardioprotecteurs du TNF α sur cœur isolé de rat (Gao, Xia et al. 2004).

Le rôle de la voie SAFE lors de l'IPost reste encore controversé. En effet, Lacerda et al. proposent que cette voie serait totalement indépendante de la voie RISK (Lacerda, Somers et al. 2009) étant donné que la perfusion de TNF α en tant qu'agent postconditionnant protège le cœur, indépendamment de la présence de wortmannine (un inhibiteur de PI3K). Au contraire, Goodman et al. ont démontré que la voie SAFE serait en amont de la voie RISK, et ne suffirait pas à induire une cardioprotection si PI3K/Akt est inhibée pharmacologiquement (Goodman, Koch et al. 2008).

La signalisation de l'IPost dépend également de la génération de ROS, étant donné que la présence de scavengers de ces dérivés oxygénés bloque la cardioprotection de l'IPost (Penna, Rastaldo et al. 2006; Penna, Mancardi et al. 2007). Elle fait également intervenir la NO synthase et PKC, qui peuvent inhiber l'ouverture du mPTP, empêchant ainsi qu'une réponse apoptotique ne se mette en place (Gross, Hsu et al. 2008; Hausenloy, Ong et al. 2009).

III.2.b- Le postconditionnement pharmacologique

Il est possible de mimer le postconditionnement ischémique de manière pharmacologique, en ciblant les protéines intervenant dans la signalisation du postconditionnement. On parle alors de Postconditionnement Pharmacologique ou PPost.

Étant donné certaines similitudes entre les voies de signalisation du préconditionnement et du postconditionnement, on retrouve en partie les mêmes agents pharmacologiques pour le PPC et le PPost.

III.2.b.α- PPC par les cytokines

- *Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2)*

Jiang et al., sur un modèle de cœur isolé perfusé de rat, ont pu observer que l'administration de FGF-2 durant la reperfusion améliore les capacités contractiles du cœur, diminue la nécrose cellulaire et empêche le relargage du cytochrome c. Cette protection est associée à une phosphorylation d'Akt et une translocation de PKC (Jiang, Wen et al. 2009).

- *Erythropoïétine (EPO)*

L'EPO, administré à la reperfusion, améliore la pression développée du ventricule gauche et diminue la taille d'infarctus après 25min d'ischémie suivie de 120min de reperfusion sur un modèle de cœur isolé perfusé de rat (Tamareille, Ghaboura et al. 2009). Ces effets bénéfiques sont même supérieurs à ceux du groupe IPost. L'effet protecteur de l'EPO passe par une inhibition de GSK-3β et est dépendante de PI3K et de ERK1/2.

III.2.b.β- PPC par les ligands des GPCR

- *Adénosine, bradykinine, opioïdes*

L'adénosine, administrée juste avant le début de la reperfusion diminue la taille de l'infarctus, améliore la récupération de la fonction cardiaque et réduit la réponse inflammatoire après IR sur un modèle d'infarctus de rat (Ke, Yu et al. 2010). Cette protection implique une modulation de l'activation de NF-κB et une diminution d'expression de TNFα.

L'administration de bradykinine durant les 10 premières minutes de reperfusion assure également une protection du myocarde. Cette dernière est associée à une phosphorylation d'Akt et une activation de la eNOS (Bell and Yellon 2003). Néanmoins, Penna et al. n'ont pas observé ces effets après une administration continue de bradykinine en début de reperfusion. Ils observent cependant une protection lors de l'administration transitoire de bradykinine, selon un algorithme calqué sur celui de l'IPost (Penna, Mancardi et al. 2007). À l'opposé, l'administration transitoire d'adénosine n'apporte pas de réponse protectrice (Penna, Mancardi et al. 2009).

III.2.b.γ- Anesthésiques volatils

L'isoflurane, administré durant les premières minutes de reperfusion, induit la phosphorylation de PI3K et d'Akt, diminue le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme, inhibe l'apoptose et apporte une cardioprotection comparable à celle de l'IPost (Weihrauch, Krolkowski et al. 2005; Pagel 2008). Tous ces effets sont bloqués par la wortmannine, un antagoniste de PI3K, par le L-NAME, un inhibiteur des NO synthases, mais aussi par l'atractyloside, un inducteur du mPTP, suggérant l'implication de la voie RISK, des NOS et du mPTP lors du postconditionnement par l'isoflurane (Krolkowski, Bienengraeber et al. 2005; Krolkowski, Weihrauch et al. 2006).

III.2.b.δ- Les KCO

La perfusion continue de diazoxide durant les 3 premières minutes de reperfusion ne semble pas avoir d'effet protecteur. Néanmoins, la perfusion intermittente de cet ouvreur du mitoK_{ATP} protège le cœur avec une amplitude un peu plus faible que l'IPost (Penna, Mancardi et al. 2007). En présence de 5-hydroxydécanoate, un inhibiteur sélectif du mitoK_{ATP}, le PPost est inhibé (Mykytenko, Reeves et al. 2008).

III.1.b.ε- La cyclosporine A

La cyclosporine A, inhibiteur du mPTP, est également utilisée en PPost. Sur un modèle d'infarctus de lapin, Paillard et al. obtiennent une cardioprotection similaire après perfusion de cyclosporine A et IPost (Paillard, Gomez et al. 2009).

Les premiers essais cliniques de postconditionnement par cyclosporine A, chez l'homme, à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde sont particulièrement prometteurs. Dans une étude récente portant sur 58 patients pris en charge à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde, le groupe ayant reçu la cyclosporine A présente une diminution significative du relargage de la créatine kinase et de la taille d'infarctus (**Figure 31**). Aucun effet secondaire de la cyclosporine A n'a été observé chez ces patients (Piot, Croisille et al. 2008; Gomez, Li et al. 2009).

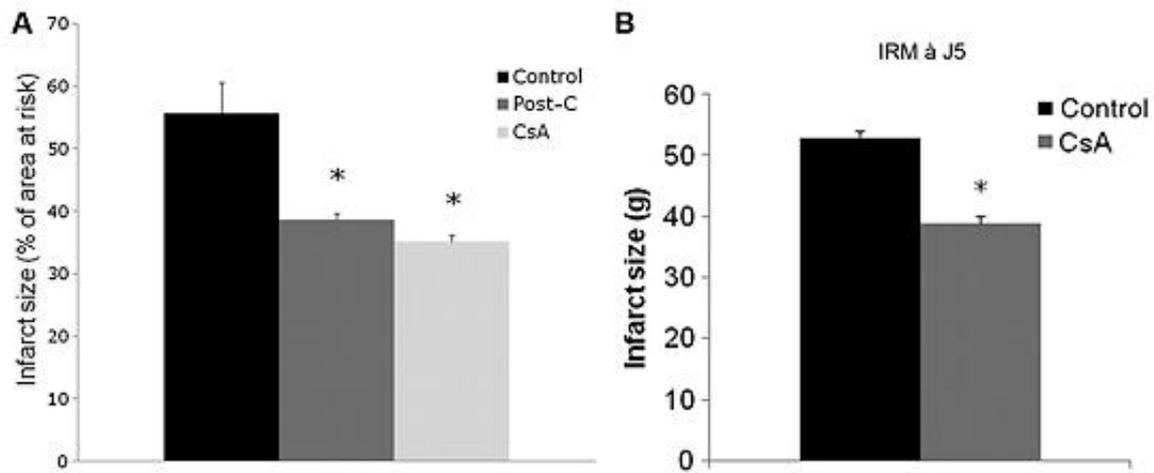


Figure 31- Effet cardioprotecteur de la cyclosporine A en tant qu'agent postconditionnant.

Réduction de taille d'infarctus après (A) IPost et traitement à la cyclosporine A chez la souris et (B) après cyclosporine A chez l'homme (mesurée par imagerie à résonance magnétique 5j après intervention). Figure adaptée de Gomez et al. (2009).

OBJECTIFS DE CETTE THÈSE

Le but de ce travail est d'approfondir la connaissance de la signalisation intracellulaire de la cardioprotection vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion, dans un contexte de preconditionnement ou de postconditionnement et dans le cadre des événements précoces de la signalisation. Notre approche est centrée sur l'étude de l'implication de GSK-3 β et des paramètres susceptibles de moduler son activité, comme celles de cibles potentielles telles que la voie mTOR. C'est à cette fin que le laboratoire a évolué du modèle de cœur isolé-perfusé de rat vers celui de cœur isolé-perfusé de souris. Cette évolution nous permet d'utiliser des modèles transgéniques, très avantageux pour ce type de problématique.

Si la problématique développée dans le laboratoire au cours des 8 dernières années s'est focalisée sur l'implication du canal potassique ATP-dépendant mitochondrial comme effecteur terminal de la protection, notre objectif ici s'est focalisé sur son implication dans la signalisation intracellulaire de ce phénomène en relation avec GSK-3 β .

Dans la mesure où l'implication de la voie Wnt en physiologie cardiovasculaire est au centre de la problématique de notre équipe de recherche, et qu'il a été décrit des interactions de cette voie avec GSK-3 β , une partie significative de notre effort s'est portée sur l'étude de son influence sur la cardioprotection.

Ce travail tire donc bénéfices de l'emploi de divers modèles de souris transgéniques, notamment d'un modèle de souris exprimant une GSK3 constitutivement active ainsi que d'un modèle de souris surexprimant sFRP1, un antagoniste de la voie Wnt.

DEUXIÈME PARTIE

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I-Modèles Animaux

L'utilisation de modèles animaux est un outil important de la recherche actuelle qui permet de mieux appréhender et comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques impliqués dans de nombreuses pathologies.

I.1- Modèles animaux

Tous les protocoles ont été menés sur des souris âgées de 8 à 12 semaines, pesant entre 23 et 28g. Lors d'études préliminaires, nous n'avons pas observé de différences de réponse entre mâle et femelle que ce soit au niveau de la fonction cardiaque lors de la perfusion, de la signalisation intracellulaire de la cardioprotection ou de la réponse tissulaire à l'ischémie-reperfusion.

Différentes souches de souris ont été utilisées :

- Des souris C57Bl6J ont été utilisées pour la mise au point des protocoles, mais également pour les croisements de purification de fond génétique des souris sFRP1-Tg. Elles proviennent du centre d'élevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France).
- Des souris sFRP1-Tg, souris transgéniques créées dans le laboratoire, surexprimant un antagoniste sécrété de la voie Wnt/Frz, exprimé spécifiquement dans le cœur.
- Des souris Littermates des sFRP1-Tg, qui sont en fait des souris monotransgéniques TRE-sFRP1 ou α -MHC-tTA.
- Des souris GSK3 Knock-in, générées dans le laboratoire à partir de souris provenant du laboratoire de DM Yellon (McManus, Sakamoto et al. 2005).
- Des souris Littermates des GSK3 KI, qui n'expriment pas de formes mutées de GSK3 α et β .

L'animalerie est constituée d'un module conventionnel IFFA CREDO, et les souris y sont élevées dans un environnement aménagé avec des cycles de 12h de lumière/12h d'obscurité, à la température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Des aliments standards de laboratoire et de l'eau leur sont fournis *ad libitum*.

I.2- Génération des souris transgéniques

I.2.a- Souris sFRP1-Tg

Les souris doubles transgéniques sFRP1-Tg ont été obtenues en croisant des lignées de souris TRE-sFRP1 avec des lignées α -MHC-tTA (**Figure 32**) (Barandon, Dufourcq et al. 2005). Les souris TRE-sFRP1 ont été produites par microinjection d'une construction contenant un promoteur bidirectionnel tet-responsive permettant l'expression simultanée de sFRP1 et de LacZ. Les souris α -MHC-tTA expriment un transactivateur contrôlé par la tétracycline (tTA) sous le contrôle du promoteur α -MHC (isoforme spécifique du cœur de la chaîne lourde de la myosine). Les souris montransgéniques TRE-sFRP1 et α -MHC-tTA serviront de contrôles (Littermates).

Les souris sFRP1-Tg expriment donc un antagoniste sécrété de la voie Wnt/Frz, exprimé spécifiquement dans le cœur.

Toutes les souris transgéniques sont viables, fertiles et ne présentent aucune malformation au niveau des organes (vérifié par microscopie optique).

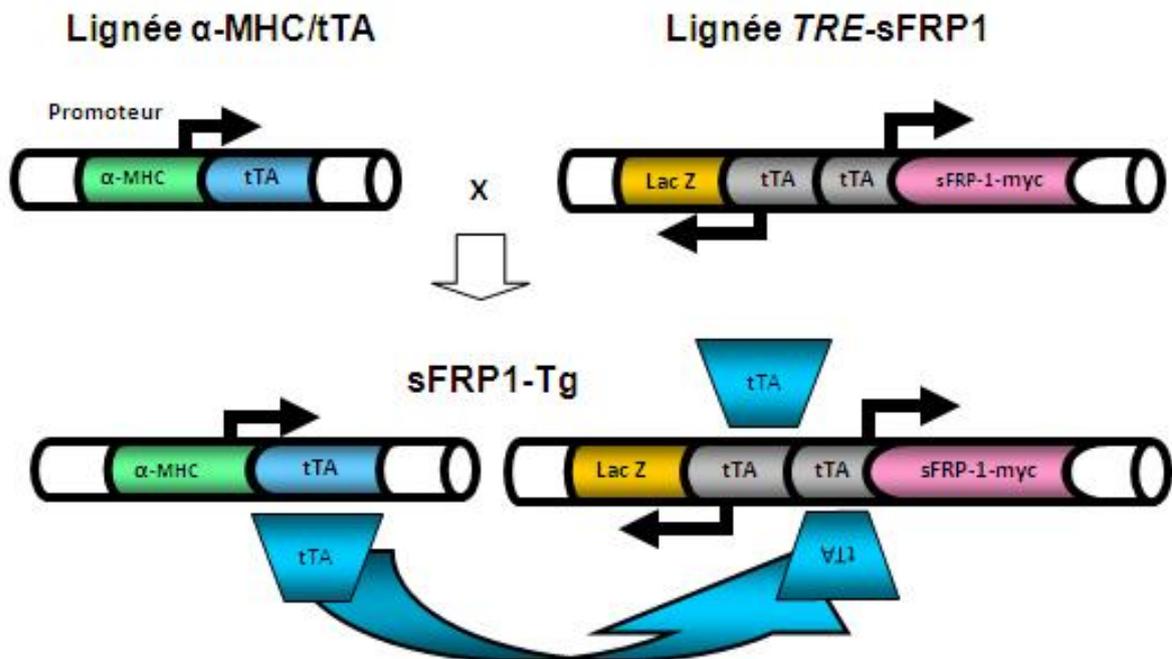


Figure 32- Génération des souris sFRP1-Tg.

Les souris doubles transgéniques, appelées sFRP1-Tg, ont été obtenues en croisant des lignées de souris TRE-sFRP1 avec des lignées α -MHC-tTA.

I.2.b- Souris GSK-3 $\alpha\beta$ Knock-in

Les souris double Knock-in ont été générées dans notre laboratoire à partir des souris simple KI provenant du laboratoire de DM Yellon (McManus, Sakamoto et al. 2005). Ces souris simple KI ont été obtenues en changeant les sites de phosphorylation par Akt de GSK-3 α (ser21) et GSK-3 β (ser9) par des alanines, non phosphorylables. Afin d'obtenir des souris doubles Knock-in pour GSK-3 α et GSK-3 β , différents croisements ont été effectués suivant le **Tableau 2**. Les souris sauvages ont servi de contrôles (Littermates).

Toutes les souris transgéniques sont viables, fertiles et ne présentent aucune malformation au niveau des organes (vérifié par microscopie optique). Les souris GSK-3 $\alpha\beta$ KI ne présentent aucun signe de diabète.

Croisements	Génotypes	
	GSK-3 α	GSK-3 β
GSK-3 α (+/S21A) GSK-3 β (+/+) X GSK-3 α (+/S21A) GSK-3 β (+/+)	GSK-3 α (+/+) GSK-3 α (+/S21A) GSK-3 α (S21A/S21A)	GSK-3 β (+/+) GSK-3 β (+/+) GSK-3 β (+/+)
GSK-3 α (S21A/S21A) GSK-3 β (+/+) X GSK-3 α (S21A/S21A) GSK-3 β (+/+)	GSK-3 α (S21A/S21A)	GSK-3 β (+/+)
GSK-3 α (+/+) GSK-3 β (+/S9A) X GSK-3 α (+/+) GSK-3 β (+/S9A)	GSK-3 α (+/+) GSK-3 α (+/+) GSK-3 α (+/+)	GSK-3 β (+/+) GSK-3 β (+/S9A) GSK-3 β (S9A/S9A)
GSK-3 α (+/+) GSK-3 β (S9A/S9A) X GSK-3 α (+/+) GSK-3 β (S9A/S9A)	GSK-3 α (+/+)	GSK-3 β (S9A/S9A)
GSK-3 α (+/S21A) GSK-3 β (+/S9A) X GSK-3 α (+/S21A) GSK-3 β (+/S9A)	GSK-3 α (+/+) GSK-3 α (+/+) GSK-3 α (+/+) GSK-3 α (+/S21A) GSK-3 α (+/S21A) GSK-3 α (+/S21A) GSK-3 α (S21A/S21A) GSK-3 α (S21A/S21A) GSK-3 α (S21A/S21A)	GSK-3 β (+/+) GSK-3 β (+/S9A) GSK-3 β (S9A/S9A) GSK-3 β (+/+) GSK-3 β (+/S9A) GSK-3 β (S9A/S9A) GSK-3 β (+/+) GSK-3 β (+/S9A) GSK-3 β (S9A/S9A)
GSK-3 α (S21A/S21A) GSK-3 β (S9A/S9A) X GSK-3 α (S21A/S21A) GSK-3 β (S9A/S9A)	GSK-3 α (S21A/S21A)	GSK-3 β (S9A/S9A)

Tableau 2- Génération des souris GSK-3 $\alpha\beta$ Knock-in.

I.3- Génotypage

Les souris obtenues lors de ces différents croisements ont été génotypées afin de vérifier l'expression des gènes concernés.

Un échantillon de queue des souris nouveau-nés a été prélevé puis lysé afin d'en extraire l'ADN. Chaque échantillon est incubé dans 50 μ L de tampon de lyse Viagen et 1 μ L de protéinase K, puis digéré à 56°C durant la nuit. Afin de stopper l'action de la protéinase K,

l'échantillon est porté à 85°C durant 45min. Le lysat est dilué dans 450µL d'eau distillée, puis centrifugé afin de récupérer le surnageant contenant l'ADN.

On réalise ensuite une PCR (Polymerase Chain Reaction) qui va permettre, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'obtenir d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Pour cette PCR, on prélève 2µL (10ng) de l'échantillon d'intérêt, 2.4µL d'un mélange de dNTP (mix des quatre désoxyribonucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP, (0.8mM final)), 3µL de tampon 5X, 0.9µL de MgCl₂ (1.5mM final), 6µL d'eau distillée, 0.3µL de l'amorce F (Forward, 0.4µM final), 0.3µL de l'amorce R (Reverse, 0.4µM final) et 0.12µL de TaqDNA polymérase (0.03U/µL final). Ces amorces F et R diffèrent en fonction du fragment d'ADN d'intérêt (**Tableau 3**) et définissent, en la bornant, la séquence à amplifier.

Amorce	Gène/Taille d'amplicon attendue	
TRE-sFRP1 F: 5' AAA AAA CCT CCC ACA CCT CCC C 3'	sFRP1	338 bp
TRE-sFRP1 R: 5' CCA CTT TCC AGT CGG TCT TCA AG 3'		
α-MHC/tAF: 5' GCT GCT TAA TGA GGT CGG 3'	α-MHC	504 bp
α-MHC/tAR: 5' CTC TGC ACC TTG GTG ATC 3'		
GSK-3α F: 5' TTG AAG TGG CTG GTA CTG GCT CTG 3'	GSK-3α WT	271 bp
GSK-3α R: 5' GTG TGC TCC AGA GTA GTA CCT AGC 3'	GSK-3α KI	317 bp
GSK-3β F: 5' TCA CTG GTC TAG GGG TGG TGG AAG 3'	GSK-3β WT	233 bp
GSK-3β R: 5' GGA GTC AGT GAC AAC ACT TAA CTT 3'	GSK-3β KI	352 bp

Tableau 3- Amorces pour génotypages.

La PCR est réalisée selon le programme suivant : 5min de dénaturation initiale à 95°C suivi de 30 cycles de 30s de dénaturation à 95°C, 30s d'hybridation à 60°C, 1min d'élongation à 72°C, suivi de 7min d'élongation finale à 72°C.

8 μ L du produit de PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 3% (2% d'agarose standard DNA Grade + 1% agarose NuSieve GTG <1Kb) dans du tampon TAE 1X (40mM Tris-Acétate, 1mM EDTA), additionné de BET (0.5 μ g/mL), puis soumis à une migration électrophorétique à 70V durant 30min.

Les gels sont ensuite observés sous lampe à ultraviolet (Vilber Lourmat) et photographiés (**Figure 33**).

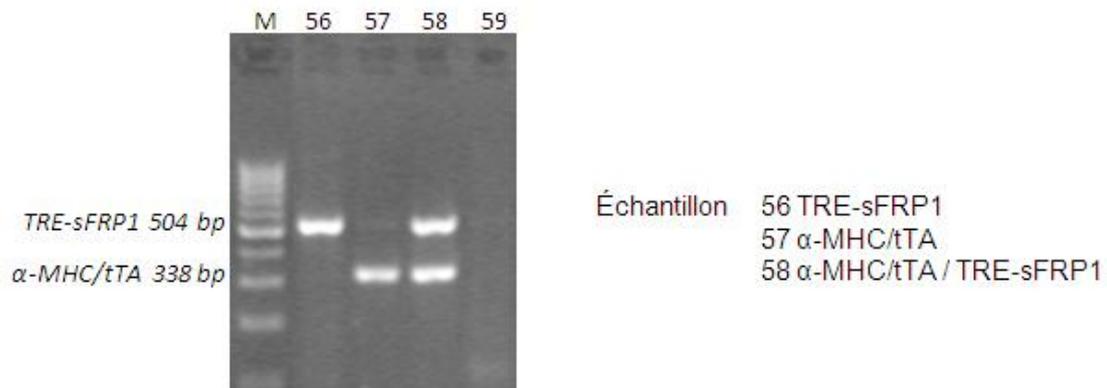


Figure 33- Exemple de gel après PCR lors d'un génotypage α -MHC/tTA X TRE-sFRP1.

II-Cœur de Souris Isolé-Perfusé

C'est à la fin du XIX^{ème} siècle qu'Oscar Langendorff a mis au point la technique permettant de perfuser et de maintenir la viabilité d'un cœur isolé (**Figure 34A**).

Le cœur isolé est une préparation permettant d'étudier la fonction cardiaque en dehors de l'organisme, et contribue depuis plus d'un siècle à la recherche en physiologie et en physiopathologie cardiaque. L'organe, prélevé chez un animal vivant et anesthésié, est ensuite installé sur un montage assurant sa perfusion tout en maintenant les cellules cardiaques viables (Zimmer 1998).

Le modèle du cœur isolé perfusé (**Figure 34B**) s'est aujourd'hui imposé comme un outil de choix pour étudier la fonction cardiaque et mieux comprendre les mécanismes qui la régissent.

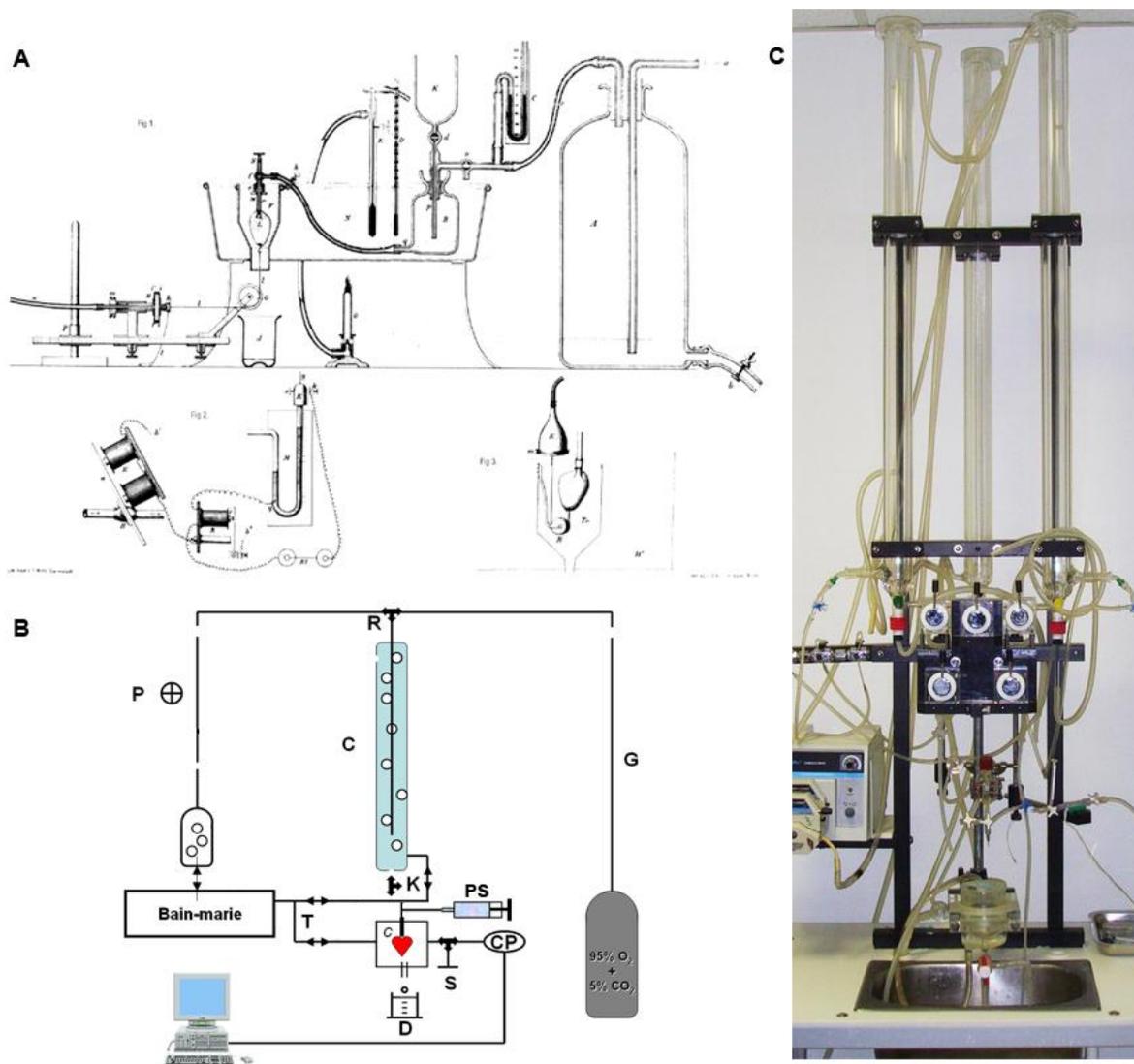


Figure 34- Modèle de cœur isolé perfusé Langendorff.
(A) Premier modèle d'Oscar Langendorff (Langendorff 1895). **(B-C)** Système de perfusion utilisé actuellement.

II.1- Perfusion rétrograde de cœur de souris selon la technique de Langendorff

Les souris ont été utilisées en conformité avec le « Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » (National Institutes of Health Publication No. 85-23, révisé en 1996).

Des souris, pesant entre 23 et 28g, sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de 25mg/Kg de pentobarbital sodique et héparinées par une injection de 100U/Kg. Le thorax est ouvert par thoracotomie bilatérale et le cœur est rapidement extrait après section de l'aorte, des artères pulmonaires et des veines caves. Le cœur est alors plongé dans une solution de Krebs-Henseleit modifié à 4°C et l'aorte est canulée (**Figure 35**). Le cœur est ainsi perfusé de manière rétrograde par une solution cristalloïde de Krebs-Henseleit modifiée (118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.18 mM KH₂PO₄, 1.75 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0.50 mM EDTA et 11 mM glucose), oxygénée par un mélange contenant 95% O₂, 5% CO₂ permettant de garder un pH constant de 7.4 et une PO₂ supérieur à 600 mmHg au niveau de la canule. La température est maintenue à 37.6 °C.

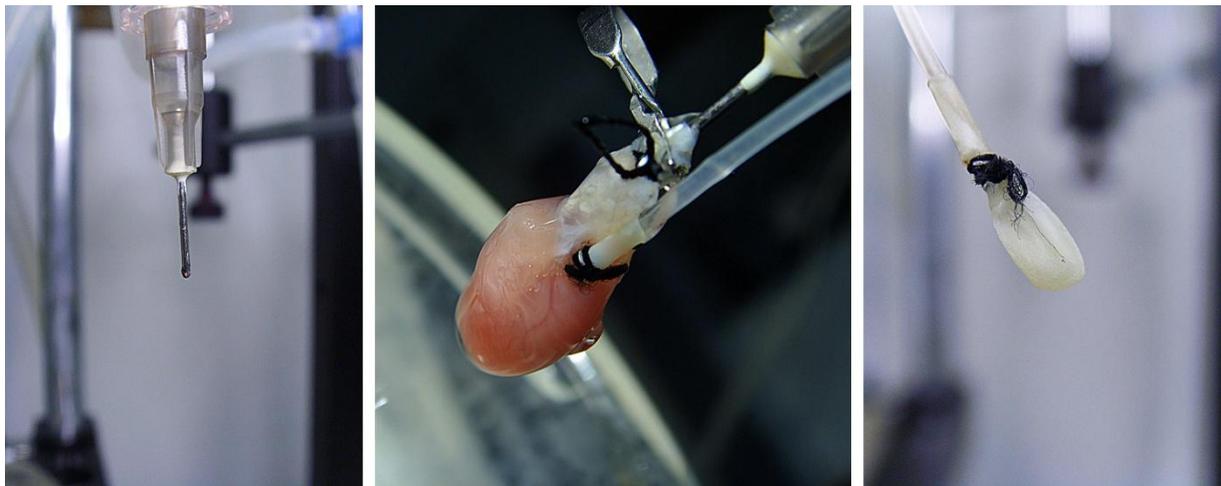


Figure 35- Cœur isolé perfusé.

À gauche, canule utilisée pour la perfusion (Terumo 22G 0.7mm coupée) ; au milieu, cœur isolé perfusé avec ballonnet inséré dans le ventricule gauche ; à droite, ballonnet en latex relié au capteur de pression.

Le cœur n'est pas stimulé et se contracte spontanément. La pression intraventriculaire gauche est mesurée *via* un ballonnet en latex (rempli d'eau), introduit dans le ventricule gauche à travers la valve mitrale par une incision du toit de l'oreillette gauche. Le volume du ballonnet est contrôlé et ajusté à l'aide d'une voie latérale reliée à une seringue. En conditions de référence, le volume du ballonnet est ajusté de manière à obtenir une pression intraventriculaire en fin de diastole aux alentours de 5mmHg, et laissée constante durant le

protocole de perfusion. Ce ballonnet, connecté à un capteur de pression P23Db, lui-même relié à un système d'enregistrement (*iox 2.4.5.13*, **Figure 36**), permet de visualiser et d'analyser en continu la pression développée en isovolumétrie par le ventricule gauche. La performance mécanique développée par le cœur est évaluée par le produit de la fréquence cardiaque et de la pression développée (produit pression x fréquence (PPF)).

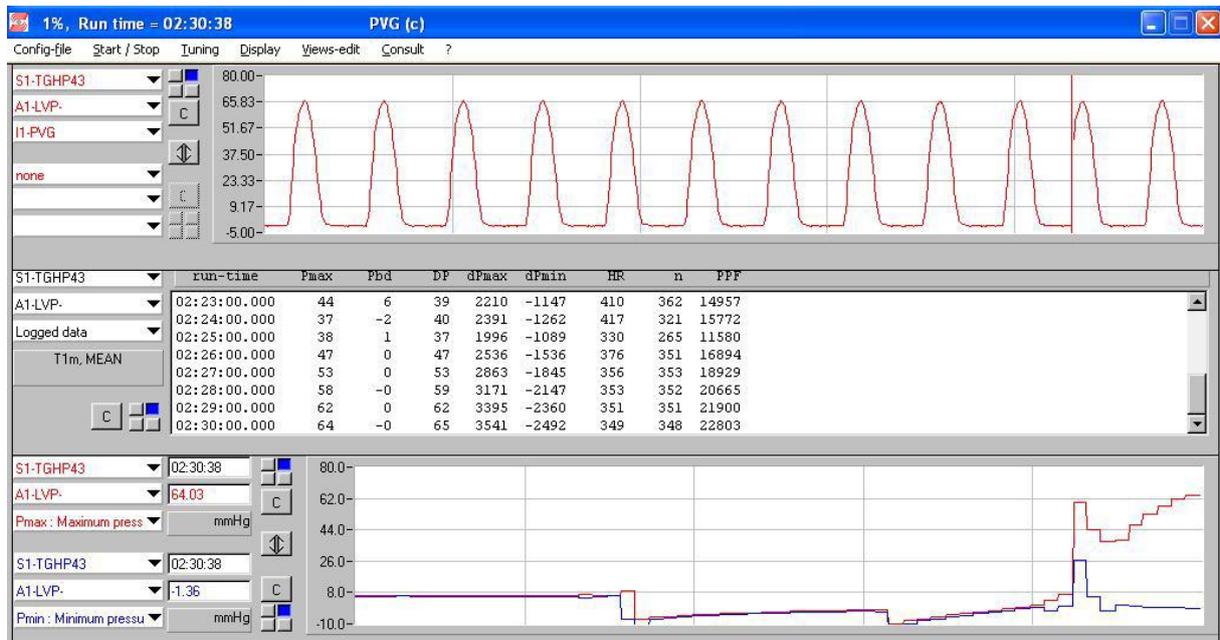


Figure 36- Tracé expérimental typique de la pression développée du ventricule gauche.

L'enregistrement continu de la pression exercée par le myocarde sur le ballonnet inséré dans le ventricule gauche permet d'obtenir la pression développée ainsi que la fréquence cardiaque du cœur.

II.2- Protocoles de préconditionnement

Les cœurs sont d'abord soumis à une période de 35min de stabilisation en condition normoxique suivie de différents protocoles de preconditionnement. Pour les analyses de signalisation intracellulaire par western blot, les cœurs sont récupérés juste à la fin du protocole de preconditionnement, débarrassés des oreillettes, plongés dans l'azote liquide et conservés à -32°C ($n \geq 6$ par groupe). L'effet des différents protocoles de perfusion sur la nécrose est évalué par la mesure du rapport taille d'infarctus par rapport à la zone à risque (IS/AAR) après marquage au 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma) réalisé au

terme de 40min d'ischémie globale suivie de 120min de reperfusion normoxique sur des séries de cœurs dédiées (n≥6 par groupe).

Tous ces protocoles ont été réalisés sur des cœurs de souris monotransgéniques littermates, sFRP1-Tg et GSK-3αβ KI. Les cœurs isolés ont été répartis au hasard selon les différents groupes suivants (**Figure 37**).

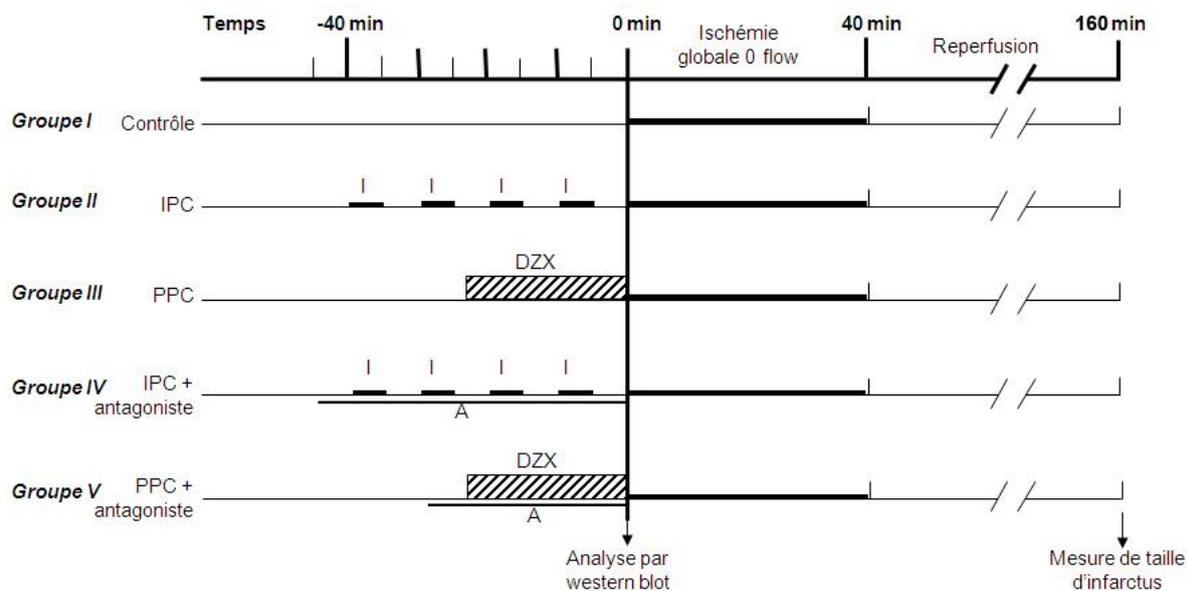


Figure 37- . Protocoles expérimentaux pour l'étude des voies de signalisation du préconditionnement et de la cardioprotection.

Toutes ces expériences ont été réalisées sur cœurs isolés perfusés de souris monotransgéniques (Littermates), sFRP1-Tg ou GSK-3αβ KI. Les cœurs sont soumis à une période de stabilisation de 35min suivie ou non d'un protocole de préconditionnement. Les cœurs sont récupérés juste après la phase de préconditionnement pour des études par western blot, ou après 40min d'ischémie globale suivie de 120min de reperfusion normoxique, pour des études de cardioprotection. IPC: Préconditionnement Ischémique PPC : Préconditionnement Pharmacologique ; I: Ischémie globale ; DZX, Diazoxide; A: Antagoniste.

- Le **Groupe I** est composé de cœurs contrôles, non-préconditionnés, soumis à une perfusion de 100μM de DMSO durant 20min.
- Dans le **Groupe II**, les cœurs sont soumis à un Préconditionnement Ischémique (IPC), consistant en quatre séquences de 5min d'ischémie suivie de 5min de reperfusion.
- Dans le **Groupe III**, les cœurs sont soumis à un Préconditionnement Pharmacologique (PPC) par une perfusion de 100μM de diazoxide durant 20min.

- Dans le **Groupe IV**, l'IPC est associé à la perfusion d'un antagoniste (**Tableau 4**). Dans tous les cas, la perfusion de l'antagoniste est débutée 5min avant l'IPC.

- Dans le **Groupe V**, le PPC par le diazoxide est précédé de 5min d'une perfusion de l'antagoniste (**Tableau 4**) qui est ensuite co-perfusé avec le diazoxide durant 20min.

Deux voies latérales équipées chacune d'une ligne de perfusion, d'une seringue et d'un pousse-seringue automatique (*Becton Dickinson Program 2*), permettent l'injection de drogues au plus près des artères coronaires, juste au dessus de la canule aortique (**Figure 34B**). Les concentrations des drogues dans la seringue de perfusion sont calculées pour correspondre à des vitesses d'injection de l'ordre de 1/60ème (3mL/h) du débit coronaire cardiaque (3mL/min) ce qui permet notamment d'éviter tout phénomène d'augmentation de pression de perfusion lors de l'injection des drogues.

Le tableau ci-dessous présente les concentrations finales de l'ensemble des antagonistes utilisés pour cette étude.

Antagoniste	Concentration	Action
5-hydroxydécanoate (5-HD)	300µM	antagoniste du mitoK _{ATP}
Wortmannine (WM)	100nM	inhibiteur spécifique de PI3K
N-(2-mercaptopropionyl) glycine (MPG)	1mM	chélateur d'espèces dérivées de l'oxygène
Rapamycine	250pM	inhibiteur spécifique de mTOR

Tableau 4- Antagonistes utilisés pour l'étude de la signalisation intracellulaire du préconditionnement et du postconditionnement.

Le diazoxide, le 5-hydroxydécanoate, la wortmannine, le N-(2-mercaptopropionyl) glycine et la rapamycine proviennent de Sigma Aldrich. Le diazoxide, la WM et la rapamycine ont été dissous dans du DMSO avant d'être ajoutés à la solution de Krebs-Henseleit modifiée. Les expériences contrôles ont donc été réalisées en présence de 0.1% DMSO. Le 5-HD et le MPG sont directement solubilisés dans la solution de Krebs-Henseleit modifiée.

II.3- Protocoles de postconditionnement

Comme pour les protocoles de préconditionnement, les cœurs sont tout d'abord soumis à 35min de stabilisation normoxique, suivie de 40min d'ischémie globale. Différents protocoles de postconditionnement sont alors réalisés dès le début de la reperfusion. Les

échantillons pour analyse de la signalisation par western blot sont récupérés après la période de postconditionnement et/ou traitements ($n \geq 6$ par groupe). La cardioprotection est étudiée après les 120min de reperfusion par marquage au TTC sur des séries de cœurs dédiées ($n \geq 6$ par groupe).

Tous ces protocoles ont été réalisés sur des cœurs de souris monotransgéniques littermates, sFRP1-Tg et GSK-3 $\alpha\beta$ KI. Les cœurs isolés ont été répartis au hasard selon les différents groupes suivants (**Figure 38**).

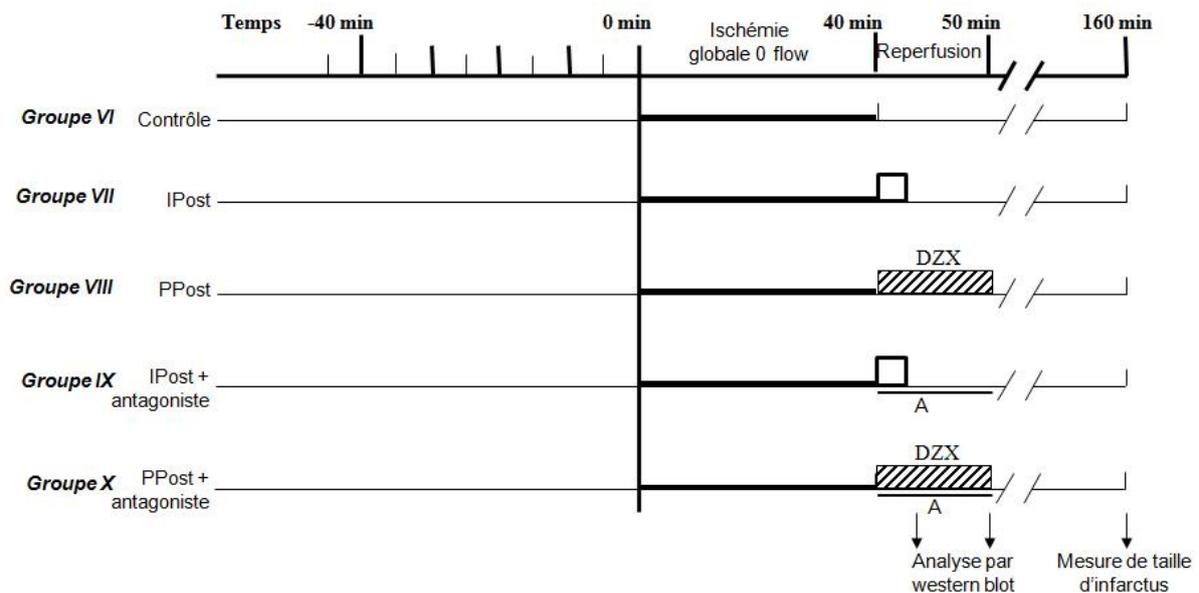


Figure 38- Protocoles expérimentaux pour l'étude des voies de signalisation du postconditionnement et de la cardioprotection.

Toutes ces expériences ont été réalisées sur cœurs isolés perfusés de souris monotransgéniques (Littermates), sFRP1-Tg ou GSK-3 $\alpha\beta$ KI. Les cœurs sont soumis à une période de stabilisation de 35min puis à 40min d'ischémie globale suivie ou non d'un protocole de postconditionnement. Les cœurs sont récupérés juste après la phase de postconditionnement pour des études par western blot, ou après 120min de reperfusion normoxique, pour des études de cardioprotection.

IPost: Postconditionnement Ischémique ; PPost: Postconditionnement Pharmacologique ; DZX, Diazoxide; A: Antagoniste.

- Le **Groupe VI** est composé de cœurs contrôles, non postconditionnés, soumis à une perfusion de 100 μ M de DMSO durant les 10 premières minutes de reperfusion.
- Dans le **Groupe VII**, les cœurs sont soumis à un Postconditionnement Ischémique (IPost), consistant en dix séquences de 5sec d'ischémie suivie de 5sec de reperfusion.

- Dans le **Groupe VIII**, les cœurs sont soumis à un Postconditionnement Pharmacologique (PPost), à savoir une perfusion après l'ischémie de 100 μ M de diazoxide durant 10min.
- Dans le **Groupe IX**, l'IPost est associé à une perfusion de 10min d'un antagoniste (**Tableau 4**).
- Dans le **Groupe X**, le PPost par le diazoxide est associé à une perfusion de 10min d'un antagoniste (**Tableau 4**).

III-Modèle de Fibres Endocardiques

Le modèle de cœur isolé-perfusé de souris est particulièrement délicat à mettre en place et à maîtriser. Dans l'optique d'études approfondies de la signalisation intracellulaire de la cardioprotection sur des modèles précieux de souris transgéniques, nous avons donc entrepris la mise au point d'un modèle d'analyse *in vitro* autorisant des études simplifiées et répétées, tout en réduisant le nombre d'animaux nécessaires.

III.1- Technique de prélèvement des fibres endocardiques de ventricule gauche

Après anesthésie par injection intrapéritonéale de 25mg/Kg de pentobarbital sodique suivie d'une injection de 100U/Kg d'héparine, le thorax de la souris est ouvert par thoracotomie bilatérale et le cœur est rapidement extrait après section de l'aorte, des artères pulmonaires et des veines caves. Il est ensuite plongé dans de la solution de conservation puis le ventricule droit et les oreillettes sont éliminés. Le cœur est coupé le long de son grand axe (c'est-à-dire de l'insertion de la racine de l'artère pulmonaire vers l'apex) mettant à jour les fibres myocardiques endocardiques qui tapissent la cavité du ventricule gauche. La première couche de fibres est alignée parallèlement au grand axe.

Des fragments de tissus sont prélevés au moyen de pinces fines afin d'obtenir plusieurs échantillons représentant la quasi-totalité de la surface interne du ventricule gauche (**Figure 39**) et placés dans la solution de conservation à 4°C. Le tapis de fibres myocardiques est

ensuite dilacéré à l'aide d'aiguilles en un réseau homogène de fins faisceaux de fibres (Saks, Veksler et al. 1998), puis il est découpé en moyenne en 6 à 8 fragments de taille équivalente.

Solution de conservation : en mM : $K_2CaEGTA$ 2.77 ($[Ca^{2+}] = 0.1\mu M$) ; K_2EGTA 7.23 ; $MgCl_2$ 6.56 ; dithiothréitol (DTT) 0.5 ; imidazole 20 ; morpholino éthane sulfonate (MES) 50 (pH 7,1) ; taurine 20 ; Na_2ATP 5.3 ; phosphocréatine 15.

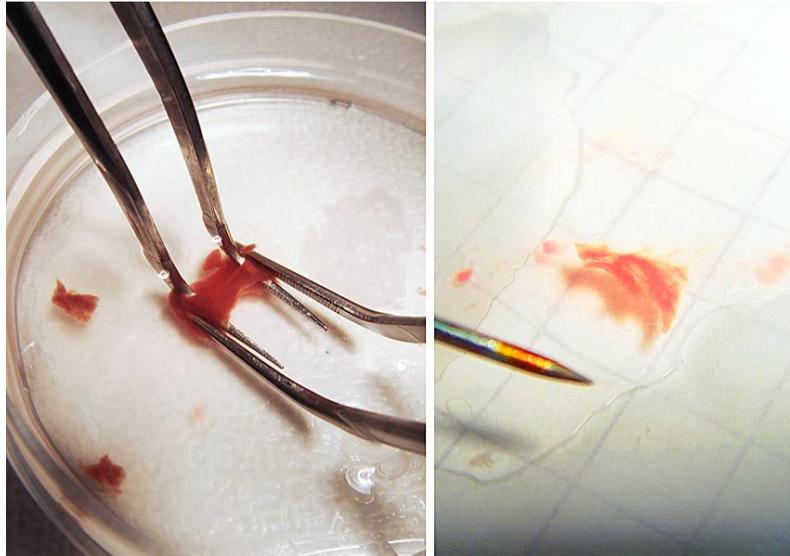


Figure 39- Prélèvement de Fibres Endocardiques de Ventricule Gauche.

Le tapis de fibres myocardiques est dilacéré à l'aide d'aiguilles en un réseau homogène de fins faisceaux de fibres.

III.2– Protocole de traitement des fibres endocardiques de ventricule gauche

Les fibres sont alors réparties dans des plaques de culture de 12 puits contenant chacun 2mL de solution de conservation. Après une phase de 30min de stabilisation à 37°C dans cette solution, les fibres sont soumises à différents protocoles d'incubation calqués sur les protocoles de préconditionnement décrits au chapitre II.2 et **Figure 37** (temps d'incubation et concentration des molécules).

Tous ces protocoles ont été réalisés sur des cœurs de souris monotransgéniques littermates ou sFRP1-Tg. Les fibres endocardiques ont été réparties au hasard selon les différents groupes suivants (**Figure 40**) :

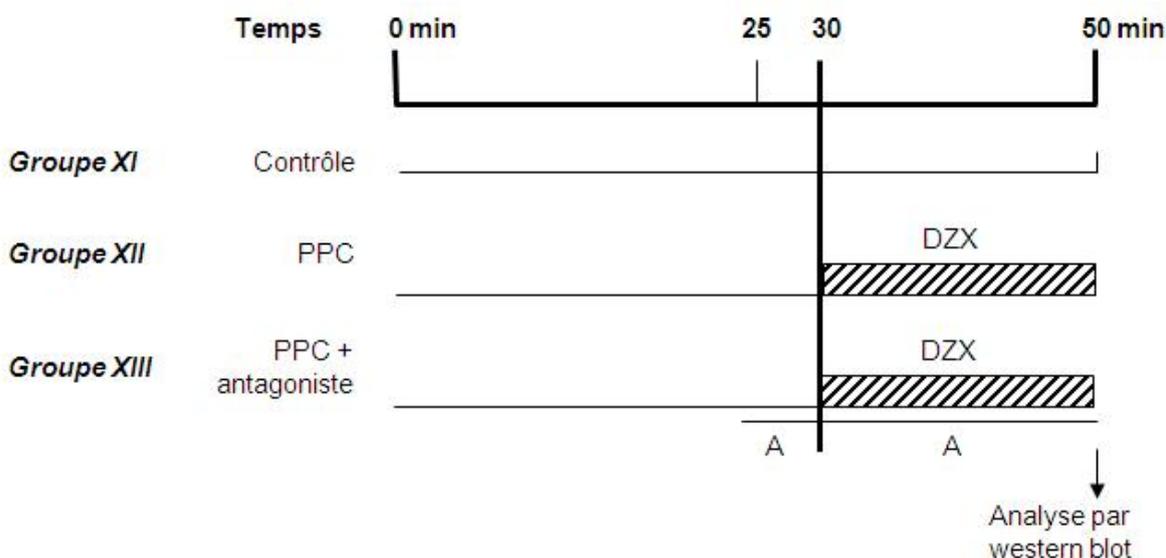


Figure 40- Protocoles expérimentaux pour l'étude des voies de signalisation de la cardioprotection sur modèle de fibres endocardiques de ventricule gauche.

Toutes ces expériences ont été réalisées sur cœurs de souris monotransgéniques (Littermates) et sFRP1-Tg. Les fibres endocardiques sont soumises à une période de stabilisation de 30min suivie ou non d'un protocole de preconditionnement. Les fibres sont récupérées juste après la phase de preconditionnement pour des études par western blot. PPC : Preconditionnement Pharmacologique ; DZX, Diazoxide; A: Antagoniste.

- Le **groupe XI** est constitué de fibres contrôles, non-preconditionnées, incubées 20min dans du milieu de conservation additionné de DMSO.
- Le **groupe XII** correspond aux fibres ayant subi un preconditionnement pharmacologique, lors d'une incubation de 20min dans 100 μ M de diazoxide.
- Le **groupe XIII** est composé de fibres ayant subi un PPC en présence d'un antagoniste. Les fibres sont tout d'abord incubées 5min avec l'antagoniste seul, puis 20min dans le mélange antagoniste + diazoxide (**Tableau 5**).

Antagoniste	Concentration	Action
5-hydroxydécanoate (5-HD)	300 μ M	antagoniste du mitoK _{ATP}
Wortmannine (WM)	100nM	inhibiteur spécifique de PI3K
LY294002	3 μ M	inhibiteur spécifique de PI3K

Tableau 5- Antagonistes utilisés pour étudier la signalisation intracellulaire du preconditionnement sur modèle de fibres endocardiques de ventricule gauche.

Afin de valider ce modèle, des fibres ont été incubées en parallèle dans des concentrations croissantes d'insuline (100 à 200nM).

À l'issue des différents protocoles de traitement, les fibres sont lavées en PBS (Phosphate Buffered Saline : Na₂HPO₄ 1.15g/L, KH₂PO₄ 0.2g/L, NaCl 8g/L, KCl 0.2g/L, pH 7.4), puis sont lysées avant d'être analysées par western blot.

IV-Analyse de la Signalisation Intracellulaire de la Cardioprotection

IV.1- Analyses par western blot

IV.1.a- Dosage protéique

L'étude des voies de signalisation intracellulaires de la cardioprotection est faite par western blot. Les cœurs congelés, obtenus à l'issue du protocole de perfusion, ainsi que les fibres endocardiques traitées, sont repris puis homogénéisés dans 150 à 800µl de tampon de lyse selon la quantité de matériel obtenu (NP40 (Nonidet P-40) 1%, déoxycholate de sodium 0.5%, Sodium Dodecyl Sulfate 0,1% (SDS) dans du PBS additionné d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases (Na₃VO₄ 0.5mM, AEBSF 0.5mM, leupeptine 10µg/mL, aprotinine 10µg/mL, acide okadaïque 1nM). Après incubation dans la glace pendant 30 à 40min, puis centrifugation durant 10min à 10 000g à 4°C, le surnageant (lysat total) est prélevé et les protéines sont dosées selon la technique de Smith utilisant le kit de dosage protéique BCA (*Pierce*). Le dosage s'effectue à la longueur d'onde $\lambda=562\text{nm}$.

Les extraits protéiques sont alors repris dans un tampon d'échantillon (Tampon Laemmli 5X : Tris 62.5mM, pH 6.8, SDS (agent dénaturant) 10% (p/v), saccharose 37.5% (p/v), β -mercaptoéthanol (agent réducteur) 19.8% (v/v) et bleu de bromophénol 0.02% (p/v)) puis ces échantillons sont dénaturés par chauffage à 100°C pendant 3 minutes.

IV.1.b- Électrophorèse et transfert

Des quantités équivalentes de protéines (30 µg pour les cœurs, 10 µg pour les fibres) sont soumises à une électrophorèse SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide à 8, 10 ou 12% (selon la taille des protéines), dans un tampon de migration (Tris 25mM, glycine 192mM, SDS 0,1%, pH 8,3), puis sont transférées sur une membrane PVDF (*Millipore*) par électrotransfert liquide dans un tampon de transfert (Tris 25mM, Glycine 192mM, Méthanol 20%, pH8.3) pendant 1h, à 100V et à 4°C.

IV.1.c- Immunomarquage

Les membranes PVDF sont saturées avec 5% de lait écrémé lyophilisé dans du PBS-0.1% Tween-20 (PBS-T) pendant 45min, puis rincées en PBS-T et incubées *overnight* avec l'anticorps primaire dilué (**Tableau 6**) dans du PBS-T contenant 5% d'albumine de sérum de bœuf (p/v). Après deux autres rinçages en PBS-T, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à de l'*Alexa Fluor* (fluorochrome émettant dans l'infra rouge) pendant 2 heures à température ambiante. Après deux nouveaux rinçages, le marquage est révélé à l'aide d'un scanner à infrarouge Odyssey (*Li-Cor*) et les protéines d'intérêt sont quantifiées à l'aide du logiciel Odyssey 3.0.

Anticorps	Résidu phosphorylé	Poids moléculaire	Dilution	Provenance
Akt		60 kDa	1/3 000 ^{ème}	Cell signaling
Phospho-Akt	Ser 473	60 kDa	1/1 000 ^{ème}	Cell signaling
GSK-3β		46 kDa	1/25 000 ^{ème}	BD Biosciences
Phospho-GSK-3β	Ser 9	46 kDa	1/2 000 ^{ème}	Cell signaling
mTOR		289 kDa	1/3 000 ^{ème}	Cell signaling
Phospho-mTOR	Ser 2448	289 kDa	1/1 000 ^{ème}	Cell signaling
p70S6K		70 kDa	1/3 000 ^{ème}	Cell signaling
Phospho-p70S6K	Thr 389	70 kDa	1/1 000 ^{ème}	Cell signaling
4E-BP1		15-20 kDa	1/3 000 ^{ème}	Cell signaling
Phospho-4E-BP1	Ser 65	15-20 kDa	1/1 000 ^{ème}	Cell signaling
Cox IV		19 kDa	1/20 000 ^{ème}	Cell signaling

Tableau 6- Anticorps et leurs dilutions, utilisés lors des études sur la signalisation intracellulaire de la cardioprotection.

V-Analyse de la Cardioprotection

V.1- Coloration des zones nécrosées

Après ischémie-reperfusion, le cœur isolé est récupéré et rincé dans du PBS. Après avoir enlevé les oreillettes, il est coupé en quatre tranches transversales, qui sont incubées durant 15min à 37°C dans une solution à 1% de 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, *Sigma*) (Pasdois, Beauvoit et al. 2007). Les déshydrogénases et leurs co-facteurs vont réagir avec les sels de tetrazolium pour former le pigment formazan (rouge). Les tissus n'ayant plus de déshydrogénases, donc non viables, ne se colorent pas et apparaissent en blanc (Figure 41).

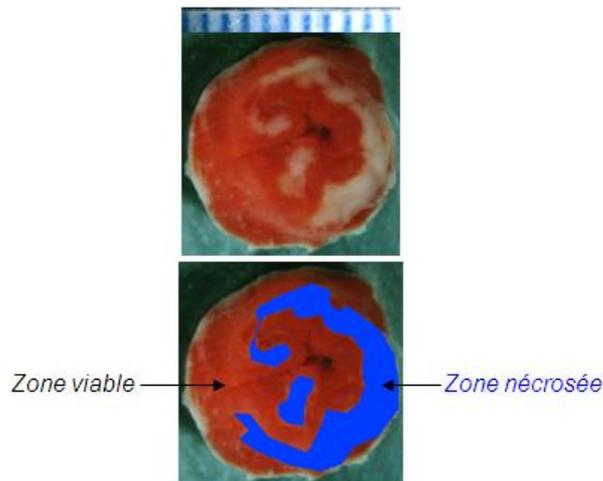


Figure 41- Coloration des zones nécrosées au 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride.

Photographies représentatives d'une coupe de cœur ayant subi 40min d'ischémie suivie de 2h de reperfusion. Une graduation pour 1mm.

Les tranches de cœurs sont ensuite fixées durant la nuit dans une solution à 4% de formaldéhyde, à 4°C.

V.2- Quantification des zones nécrosées et à risque

Chaque face des tranches est ensuite photographiée sous microscope (*Nikon, SMZ 2T*). Les zones infarctées (IS) et à risque (AAR) sont délimitées *via* le logiciel SigmaScan Pro, puis elles sont moyennées par tranche et multipliées par la masse de la tranche. Étant

donné que les cœurs ont subi une ischémie globale, le cœur entier est considéré ici comme « à risque » (**Figure 41**).

La taille de l'infarctus est exprimée en pourcentage de la masse infarctée sur la masse totale du cœur.

V.3-Expressions des Résultats et Analyses Statistiques

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm SE. Ils ont été analysés par tests d'analyse de variance (ANOVA). $p < 0.05$ est considéré comme significatif.

TROISIÈME PARTIE

RÉSULTATS

I- Rôle de la GSK-3 β dans la signalisation intracellulaire du Préconditionnement : Implications des voies mTOR et Wnt

Sommaire

I.1- Rôle de la GSK-3 β dans la signalisation intracellulaire du preconditionnement : influences des voies mTOR et Wnt.....	- 127 -
I.1.a- Le preconditionnement requiert la voie RISK : rôle central de GSK-3 β	- 127 -
I.1.a. α - Préconditionnement et nécrose myocardique	- 127 -
I.1.a. β - Implication de la voie RISK lors du preconditionnement.....	- 127 -
I.1.a. γ - L'inhibition de GSK-3 β lors du preconditionnement joue un rôle majeur	- 130 -
I.1.b- Le preconditionnement implique l'activation de la voie de survie mTOR.....	- 132 -
I.1.b. α - Le preconditionnement induit la phosphorylation de mTOR.....	- 132 -
I.1.b. β - Le Préconditionnement induit la phosphorylation de deux cibles de mTOR : p70S6K et 4E-BP1.....	- 133 -
I.1.c- Existence d'une communication entre les voies Wnt/Frz et mTOR lors du preconditionnement.....	- 135 -
I.1.c. α - Voie Wnt et cardioprotection	- 135 -
I.1.c. β - sFRP1 bloque l'inhibition de GSK-3 β de façon Akt-indépendante	- 135 -
I.1.c. γ - Communication entre les voies Wnt et mTOR	- 137 -
I.1.d- L'inhibition de GSK-3 β et l'activation de mTOR dépendent de l'ouverture du mitoK _{ATP} et de la production de ROS	- 137 -
I.1.d. α - Le Préconditionnement est mitoK _{ATP} dépendant.....	- 137 -
I.1.d. β - La production de ROS est nécessaire à la signalisation du Préconditionnement ...	- 139 -
I.2- Discussion et Perspectives	- 141 -

I.1- Rôle de la GSK-3 β dans la signalisation intracellulaire du préconditionnement : influences des voies mTOR et Wnt

I.1.a- Le préconditionnement requiert la voie RISK : rôle central de GSK-3 β

I.1.a. α - Préconditionnement et nécrose myocardique

L'importance de la cardioprotection apportée par le Préconditionnement Ischémique (IPC) sur le cœur isolé perfusé de souris Littermates est similaire à celle du Préconditionnement Pharmacologique au diazoxide (PPC). En effet, après IPC on observe une diminution de 42% du rapport taille d'infarctus / zone à risque et une diminution de 55% après PPC (**Figure 42A**) ($19.9 \pm 2.1\%$, $15.4 \pm 1.6\%$ et $34.3 \pm 1.5\%$ respectivement dans les groupes IPC, PPC et non-préconditionné, $n > 6$ dans tous les groupes ; $p < 0.05$).

I.1.a. β - Implication de la voie RISK lors du préconditionnement

La cardioprotection induite par l'IPC impliquerait l'inactivation de GSK-3 β *via* la phosphorylation d'Akt (Tong, Chen et al. 2000; Tong, Imahashi et al. 2002). Nous avons donc examiné l'état de phosphorylation d'Akt (ser473) et de GSK-3 β (ser9) dans les cœurs ayant subi ou non un préconditionnement.

L'IPC, comme le PPC, entraîne une augmentation significative du ratio p-Akt/Akt totale. On observe une augmentation de ce ratio de 138% après IPC et de 88% après PPC comparés aux cœurs non-préconditionnés (contrôle) (**Figure 42B**). Le ratio p-GSK-3 β /GSK-3 β totale est lui aussi augmenté de 86% après IPC et 71% après PPC par rapport au groupe contrôle, reflétant ainsi une phosphorylation/inhibition de la GSK-3 β lors du préconditionnement.

En condition normoxique, les cœurs Littermates présentent un niveau basal faible de phosphorylation d'Akt et GSK-3 β .

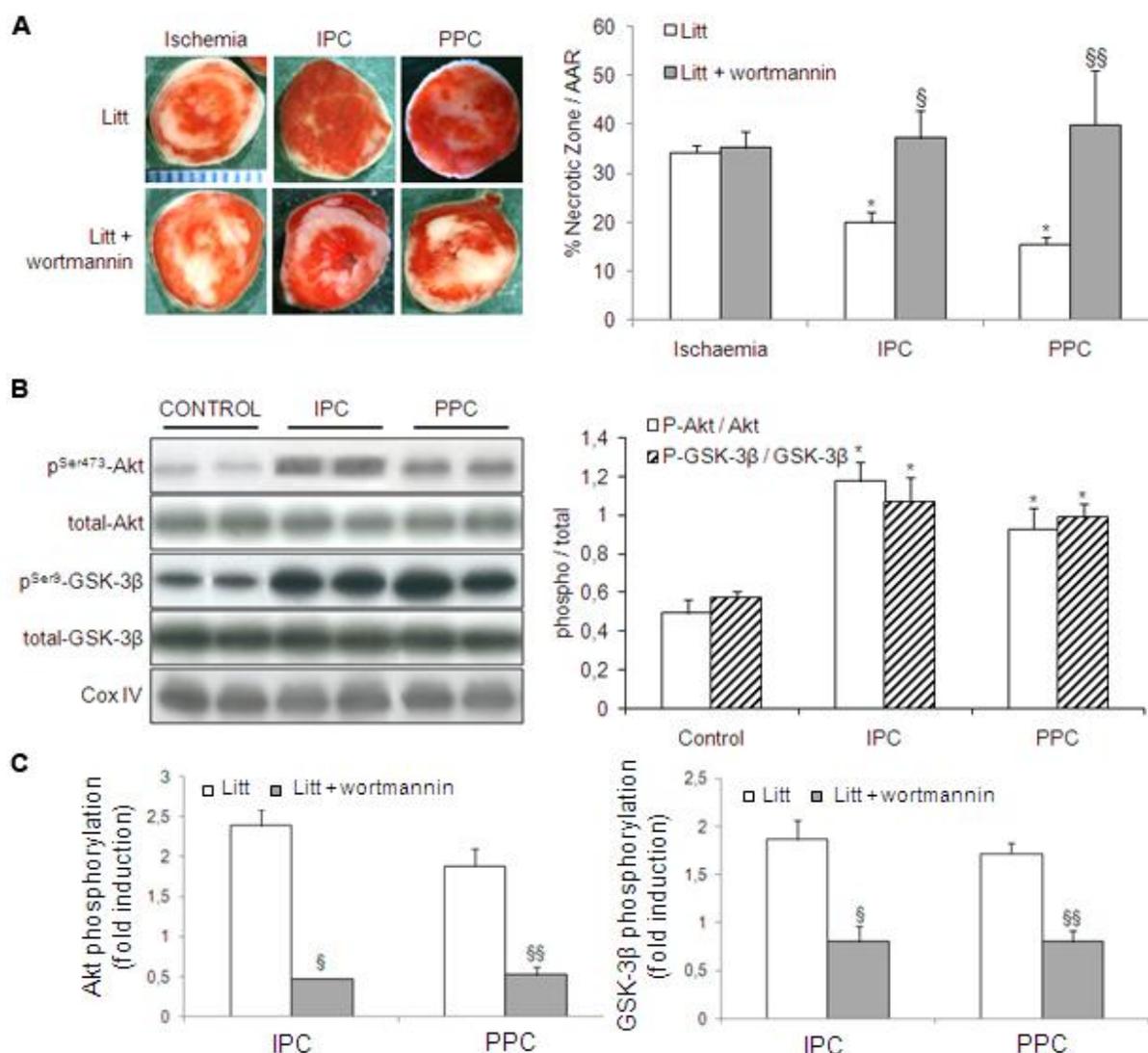


Figure 42- Le preconditionnement protège le cœur via la voie Akt/GSK-3 β .

(A) Photographies originales obtenues après coloration au TTC de cœurs Littermates \pm 100nM wortmannine, ayant subi une ischémie/reperfusion contrôlée (*ischemia*), un preconditionnement ischémique (*IPC*) ou la perfusion de 100 μ M de diazoxide (*PPC*). Les cœurs ont été coupés en tranches transversales et colorés au TTC pour distinguer les zones myocardiques nécrosées (non colorées) des zones viables (rouges). Une graduation pour 1mm. Les tailles d'infarctus (*IS*) sont exprimées en tant que pourcentage de la zone à risque totale (*AAR*). Les résultats correspondent aux moyennes \pm SE ($n > 6$). * correspond à $p < 0.05$ vs. IR contrôle, § à $p < 0.05$ vs. Littermates contrôle.

(B) Immunoblots représentatifs et leurs quantifications de p^{Ser473}-Akt, Akt totale, p^{Ser9}-GSK-3 β , GSK-3 β totale et de la cytochrome *c* oxydase IV (*Cox IV*) des cœurs isolés perfusés ayant subi une perfusion aérobie (*control*), un IPC ou un PPC. La *Cox IV* a été utilisée pour s'assurer de la qualité des dépôts. Les analyses quantitatives de plusieurs expériences représentent les ratios p-Akt/Akt totale ou p-GSK-3 β /GSK-3 β totale. $n > 10$ et * correspond à $p < 0.05$ vs. le groupe contrôle ayant subi une perfusion normoxique sans preconditionnement.

(C) Quantifications de p^{Ser473}-Akt, Akt totale, p^{Ser9}-GSK-3 β , GSK-3 β totale de cœurs Littermates \pm 100nM wortmannine ayant subi une

perfusion aérobie (*Control*), un IPC ou un PPC. Les analyses quantitatives de plusieurs expériences représentent les ratios p-Akt/Akt totale et p-GSK-3 β /GSK-3 β totale exprimés en pourcentage d'induction par rapport à des cœurs non-préconditionnés. n > 8 et § correspond à p < 0.05 vs. le groupe Litt correspondant.

L'importance d'Akt lors du préconditionnement a été confirmée en utilisant un inhibiteur de PI3K. La perfusion de 100nM de wortmannine (WM) bloque complètement les effets cardioprotecteurs de l'IPC et du PPC. Cet effet s'exerce à plusieurs niveaux :

- L'inhibition de la diminution de la taille d'infarctus avec un rapport de IS/AAR de 37.2 \pm 5.5% et de 39.9 \pm 11.2% après WM/IPC et WM/PPC comparable à celui mesuré sur les cœurs non-préconditionnés, n>6) (**Figure42A**).

- L'inhibition de l'induction de phosphorylation d'Akt : on observe une diminution de phosphorylation de 95% et 94% dans le groupe WM/IPC et WM/PPC contrairement à l'augmentation de 138% et 88% après IPC et PPC en l'absence de WM, p < 0.05) (**Figure42C**).

- L'inhibition de l'induction de phosphorylation de GSK-3 β : on observe une diminution de 18% et 10% dans le groupe WM/IPC et WM/PPC vs. une augmentation de 86% et 71% après IPC et PPC en l'absence de WM, p < 0.05) (**Figure42C**).

On notera que la wortmannine perfusée seule n'a pas d'influence sur l'état de phosphorylation d'Akt et de GSK-3 β comme sur la taille de l'infarctus sur des cœurs non-préconditionnés

De façon intéressante, nous avons réussi à obtenir des résultats similaires sur notre modèle de fibres endocardiques.

Nous avons pris soin de valider notre modèle par incubation des fibres dans différentes concentrations d'insuline afin d'observer la modulation de p-GSK-3 β (**Figure43A-B**). Nous avons pu observer une augmentation de 55% de p-GSK-3 β /GSK-3 β dans le groupe PPC (fibres incubées en présence de 100 μ M de diazoxide durant 20min). L'administration de 3 μ M de LY294002, un autre inhibiteur de PI3K, bloque cette phosphorylation de GSK-3 β (**Figure43A-C**).

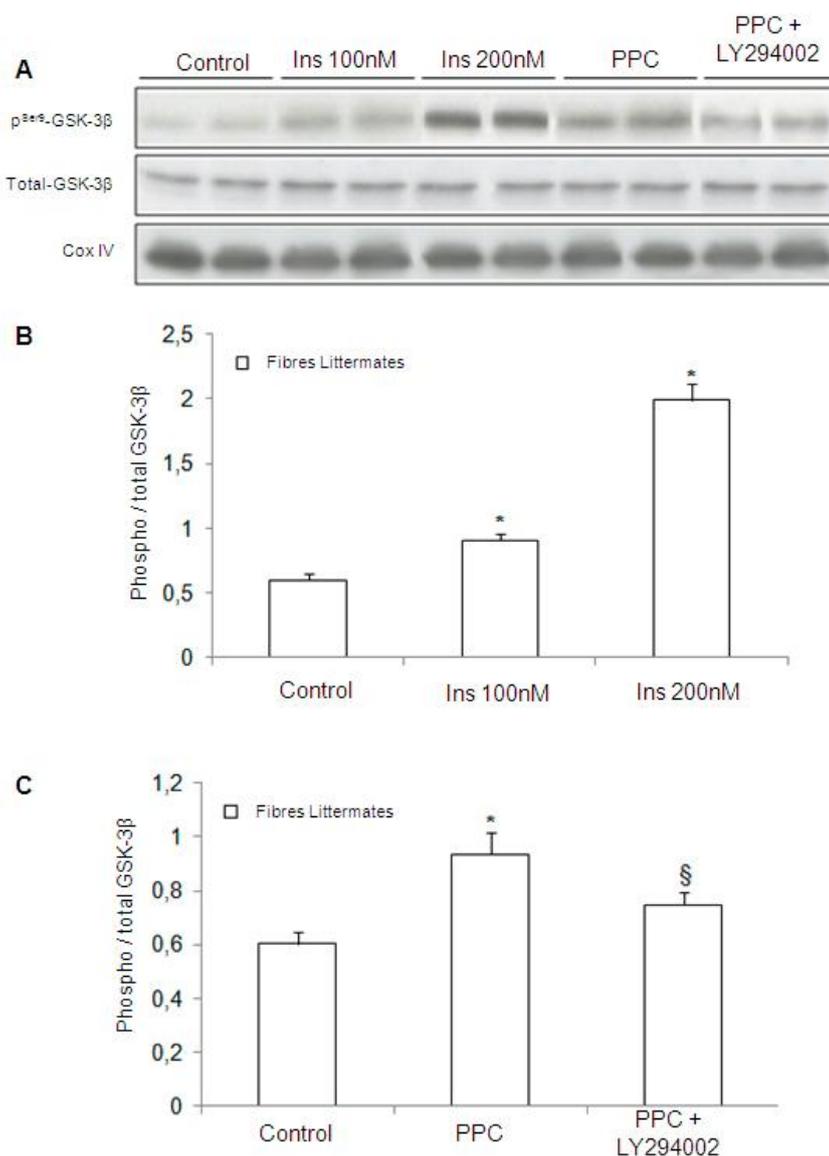


Figure 43- Le preconditionnement pharmacologique au diazoxide induit l'inhibition de GSK-3 β sur un modèle de fibres endocardiques.

(A) Immunoblots représentatifs et leurs quantifications de p^{Ser9}-GSK-3 β , GSK-3 β totale et Cox IV de fibres endocardiques incubées dans (B) 100 μ M de DMSO, ou 100nM / 200nM d'insuline, ou (C) 100 μ M de diazoxide ou 100 μ M de diazoxide additionné de 3 μ M de LY294002. n > 4, * correspond à p < 0.05 vs. le groupe contrôle non preconditionné, § à p < 0.05 vs. fibre ayant subi un PPC.

1.1.a.γ- L'inhibition de GSK-3 β lors du preconditionnement joue un rôle majeur

Le rôle de GSK-3 β dans le contexte du preconditionnement reste encore assez controversé. En effet, des études récentes suggèrent que GSK-3 β n'interviendrait pas lors du pré- et postconditionnement (Nishino, Webb et al. 2008). Afin d'élucider cette question,

nous avons étudié le préconditionnement sur des souris GSK3 Knock-in où GSK-3 α et β ne sont plus phosphorylables et donc constitutivement activées.

Avant toute chose, nous avons vérifié par western blot que ces souris GSK3 KI ne présentaient pas de p^{Ser9}-GSK-3 β au niveau cardiaque (**Figure 44A**).

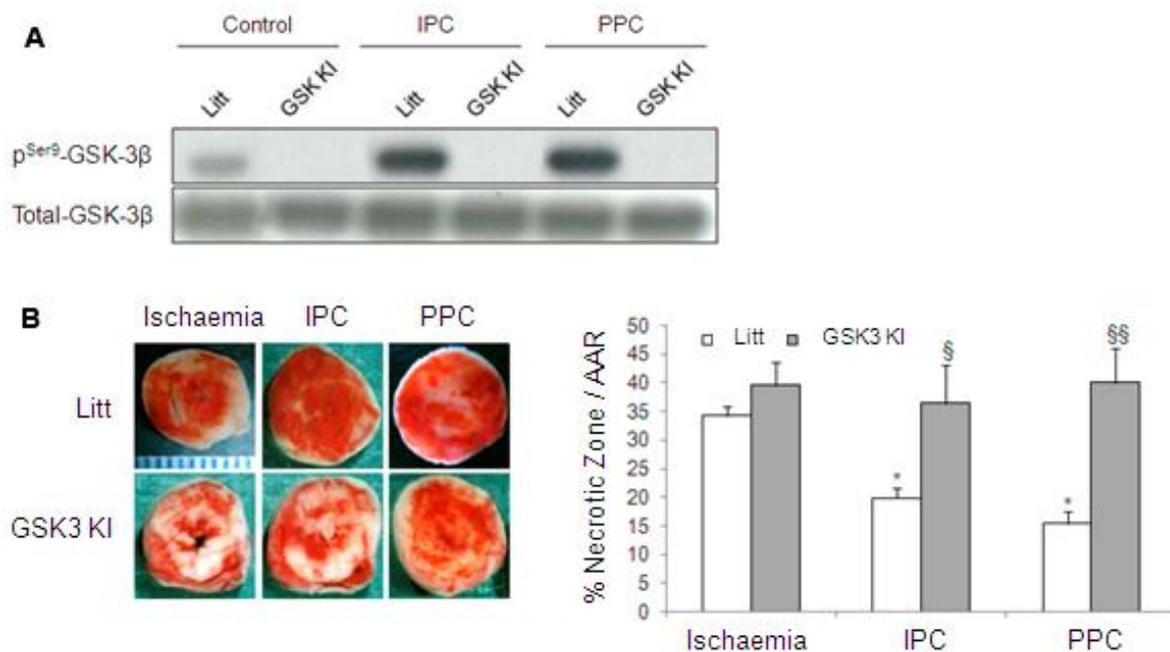


Figure 44- Le préconditionnement est GSK-3 β dépendant.

(A) Immunoblots représentatifs de p^{Ser9}-GSK-3 β et GSK-3 β totale de cœurs isolés perfusés Littermates et GSK3 KI soumis à une perfusion normoxique contrôle (*Control*), un IPC ou un PPC. **(B)** Photographies représentatives et quantifications des tailles d'infarctus, exprimées en tant que pourcentage de la zone à risque, de cœurs Littermates ou GSK3 KI ayant subi une IR contrôle (*Ischaemia*), ou un IPC ou un PPC. Les résultats correspondent aux moyennes \pm SE (n > 6). * correspond à p < 0.05 vs. IR contrôle, § à p < 0.05 vs. Littermates contrôles.

L'expression de GSK3 KI bloque la cardioprotection par IPC et PPC. En d'autres termes, ces souris ne sont pas « préconditionnables ». La taille d'infarctus représente 36.4 \pm 5.9% et 40.1 \pm 6.7% de la zone à risque après IPC et PPC respectivement et est identique à celle mesurée sur les cœurs non-préconditionnés (34.3 \pm 1.5%, **Figure44B**).

I.1.b- Le preconditionnement implique l'activation de la voie de survie mTOR

Des études récentes sur un modèle de développement tumoral ont démontré que Wnt pouvait activer mTOR *via* l'inhibition de GSK3, tandis que GSK3 serait capable d'inhiber mTOR en phosphorylant TSC2 (Inoki, Ouyang et al. 2006).

I.1.b. α - Le preconditionnement induit la phosphorylation de mTOR

Afin d'étudier le rôle éventuel de mTOR lors du preconditionnement, nous avons examiné si un inhibiteur spécifique de mTOR, la rapamycine, bloquait les effets cardioprotecteurs de l'IPC et du PPC.

Comme décrit sur la **Figure 45A**, la cardioprotection apportée par l'IPC et le PPC est bloquée par la perfusion de 250pM de rapamycine (IS/AAR = $40.0 \pm 4.8\%$ et $49.4 \pm 4.2\%$ dans les groupes rapamycine/IPC et rapamycine/PPC, similaires à la taille d'infarctus des cœurs non-preconditionnés).

Nous avons ensuite étudié l'état de phosphorylation de mTOR après l'IPC et PPC. Les deux modalités de preconditionnement entraînent une augmentation de la phosphorylation de mTOR (ser2448). On retrouve une augmentation de 127% du ratio p-mTOR/mTOR totale après IPC et de 108% après PPC comparé au groupe non-preconditionné (**Figure 45B**).

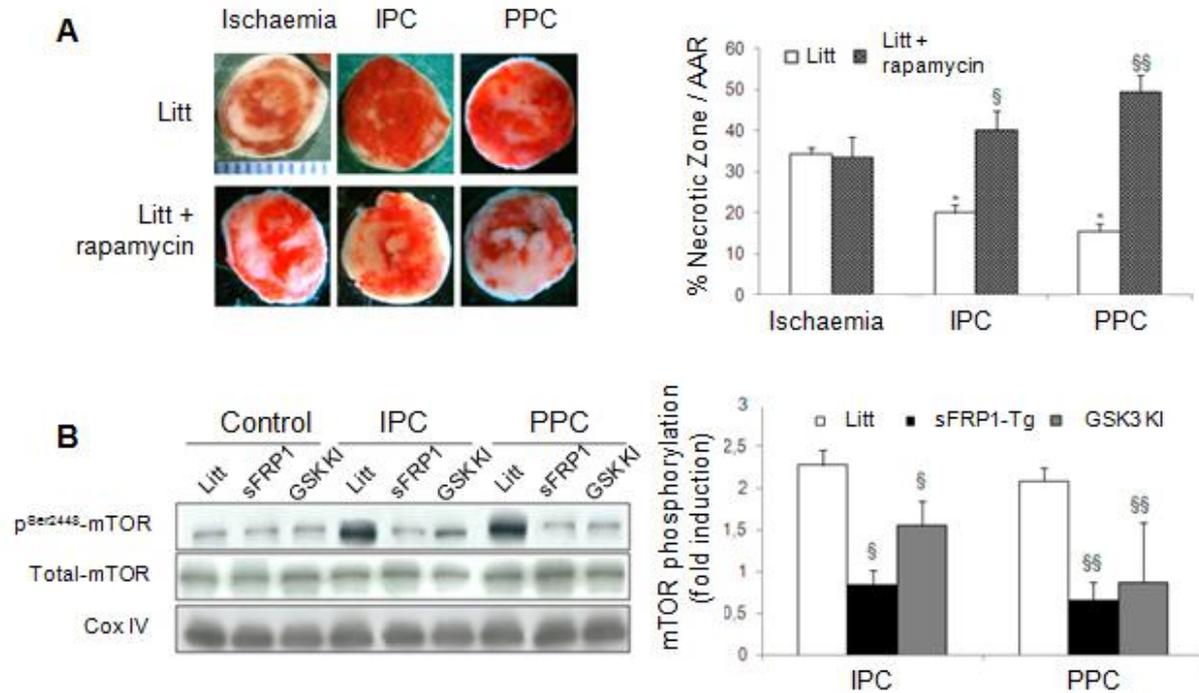


Figure 45- mTOR est activé durant le préconditionnement par GSK-3 β de manière Wnt-dépendante.

(A) Photographies représentatives et quantifications des tailles d'infarctus, exprimées en tant que pourcentage de la zone à risque, de cœurs Littermates ayant subi une IR contrôle (*Ischaemia*), ou un IPC ou un PPC, en présence ou non de 250pM de rapamycine. Les résultats correspondent aux moyennes \pm SE ($n > 6$). * correspond à $p < 0.05$ vs. IR contrôle, § à $p < 0.05$ vs. Littermates contrôles. **(B)** Immunoblots représentatifs et leurs quantifications de p^{Ser2448}-mTOR, mTOR totale et de la cytochrome *c* oxydase IV (Cox IV) de cœurs isolés perfusés de souris Littermates (*Litt*), sFRP1-Tg ou GSK3 KI ayant subi une perfusion aérobie (*Control*), un IPC ou un PPC. Les analyses quantitatives de plusieurs expériences représentent les ratios p-mTOR/mTOR totale exprimés en pourcentage d'induction par rapport à des cœurs non-préconditionnés. $n > 8$ et § correspond à $p < 0.05$ vs. le groupe Litt correspondant.

I.1.b.β- Le Préconditionnement induit la phosphorylation de deux cibles de mTOR : p70S6K et 4E-BP1

Les cibles de la voie mTOR incluent différents composants de la machinerie traductionnelle (***III.1.a.β.vi- mTOR***). Nous nous sommes concentrés sur p70S6K, activée par phosphorylation du résidu thr389 et impliquée dans l'initiation de la traduction, ainsi que sur 4E-BP1, régulateur négatif de la traduction dépendante de la coiffe et inhibée par hyperphosphorylation.

Le preconditionnement résulte en une augmentation de 91.1% de la phosphorylation/activation de p70S6K après IPC et de 93.8% après PPC, comparé au groupe non-preconditionné ($p < 0.05$, **Figure 46 A-B**). De plus, le preconditionnement induit également la phosphorylation/inhibition de 4E-BP1, dont le ratio phosphorylée/totale est augmenté de 121.3% après IPC et de 150.9% après PPC ($p < 0.05$, **Figure 46 A-C**).

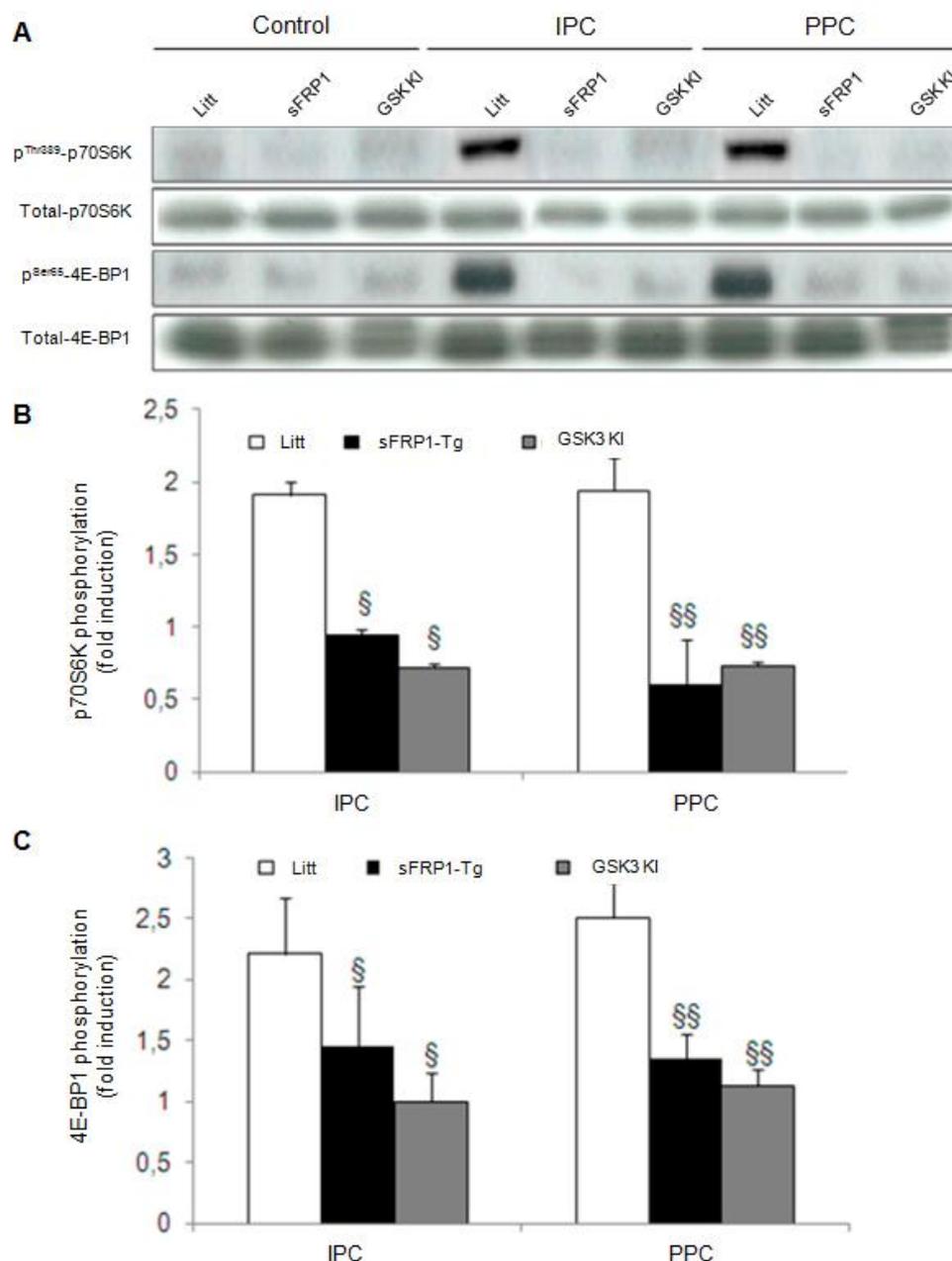


Figure 46- Le preconditionnement implique p70S6K et 4E-BP1, deux cibles de mTOR.

(A) Immunoblots représentatifs de p^{Thr389}-p70S6K, p70S6K totale, p^{Ser65}-4E-BP1 et 4E-BP1 totale de cœurs isolés perfusés de souris Litt, sFRP1-Tg ou GSK3 KI soumis à une perfusion contrôle, un IPC ou un PPC. Quantifications des ratios **(B)** p-p70S6K/p70S6K totale et **(C)** p-4E-BP1/4E-BP1 totale, exprimés en

pourcentage d'induction. n>8, § correspondant à p < 0.05 vs. Litt correspondant.

I.1.c- Existence d'une communication entre les voies Wnt/Frz et mTOR lors du préconditionnement

I.1.c.α- Voie Wnt et cardioprotection

Lors d'études précédentes, le laboratoire a démontré que la surexpression de sFRP1, un inhibiteur de la voie Wnt, dans le cœur de souris transgéniques (sFRP1-Tg) empêche la phosphorylation de la sérine9 de GSK-3β. Cet effet est corrélé à une perte de la cardioprotection après un IPC sur un modèle *in vivo* d'infarctus du myocarde (Barandon, Dufourcq et al. 2005). Lors de cette thèse, nous avons transposé ce début d'étude sur un modèle de cœur isolé perfusé, et étudier l'éventuelle implication de la voie Wnt lors du PPC par diazoxide. Nous avons alors émis l'hypothèse que, la GSK-3β étant classiquement positionnée en amont du mitoK_{ATP} dans la séquence d'action de la signalisation intracellulaire du préconditionnement ischémique, une activation directe du mitoK_{ATP} pourrait contourner tout blocage au niveau de GSK-3β et engendrer une cardioprotection, y compris sur des souris sFRP1-Tg. Cette hypothèse s'est rapidement avérée erronée.

La diminution d'infarctus apportée par l'IPC et le PPC est abolie dans les cœurs surexprimant sFRP1. Le ratio IS/AAR est respectivement de 28.9 ± 1.0% et 34.0 ± 4.2% après IPC et PPC chez les sFRP1-Tg, comparés à 19.9 ± 2.1% et 15.4 ± 1.6% après IPC et PPC chez les souris Littermates (**Figure 47A**).

Il apparaît donc que, comme l'IPC, le PPC par activation directe du mitoK_{ATP} requiert l'inhibition de GSK-3β pour exercer son effet cardioprotecteur.

I.1.c.β- sFRP1 bloque l'inhibition de GSK-3β de façon Akt-indépendante

Nous avons ensuite étudié si la surexpression de sFRP1 altérait les effets du préconditionnement sur la phosphorylation d'Akt et GSK-3β.

La phosphorylation/inhibition de GSK-3β par l'IPC et le PPC est abolie chez les cœurs sFRP1-Tg, avec un ratio p-GSK-3β/GSK-3β de 0.62 ± 0.04 après IPC et 0.62 ± 0.04 après

PPC, identique à celui observé pour les cœurs monotransgéniques Littermates non-préconditionnés (0.58 ± 0.03) (**Figure 47B**).

À l'opposé, chez les sFRP1-Tg, le ratio p-Akt/Akt est augmenté de $107.70 \pm 0.03\%$ après IPC et de $75.00 \pm 0.14\%$ après PPC comparé aux cœurs sFRP1-tg non-préconditionnés. Cette augmentation est comparable à celle observée chez les cœurs Littermates après IPC et PPC (**Figure 47B**).

Des résultats similaires ont été observés sur fibres endocardiques, à savoir une perte de la phosphorylation de GSK-3 β alors que la phosphorylation d'Akt est maintenue chez les sFRP1-Tg (**Figure 47C**).

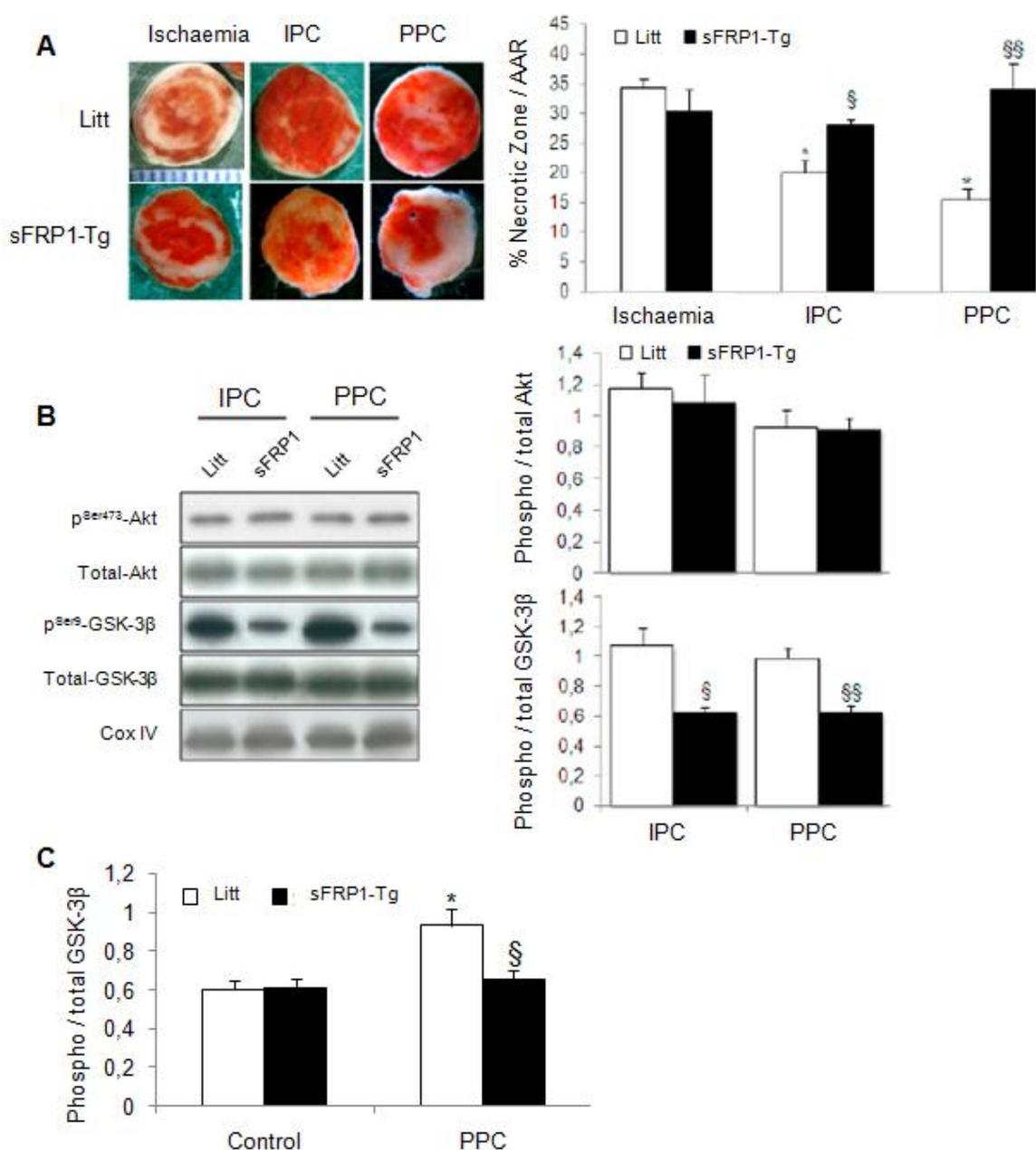


Figure 47- La voie Wnt interfère avec le préconditionnement ischémique et pharmacologique - sFRP1 bloque l'inhibition de GSK-3 β de façon Akt-indépendante.

(A) Photographies originales et quantifications des tailles d'infarctus, exprimées en tant que pourcentage de la zone à risque, de cœurs Littermates ou sFRP1-Tg ayant subi une IR contrôle (*Ischaemia*), un IPC ou un PPC. Les résultats correspondent aux moyennes \pm SE (n > 6). * correspond à p < 0.05 vs. IR contrôle, § à p < 0.05 vs. Littermates contrôles. **(B)** Immunoblots représentatifs et leurs quantifications de p^{Ser473}-Akt, Akt totale, p^{Ser9}-GSK-3 β , GSK-3 β totale et de la cytochrome c oxydase IV (Cox IV) de cœurs isolés perfusés de souris Littermates (*Litt*) ou sFRP1-Tg ayant subi un IPC ou un PPC. Les analyses quantitatives de plusieurs expériences représentent les ratios p-Akt/Akt totale et p-GSK-3 β /GSK-3 β totale exprimés en pourcentage d'induction par rapport à des cœurs non-préconditionnés. n > 8 et § correspond à p < 0.05 vs. le groupe Litt correspondant. **(C)** Quantifications du ratio p^{Ser9}-GSK-3 β /GSK-3 β totale de fibres endocardiques contrôles ou ayant subi un PPC, issues de cœurs Littermates ou sFRP1-Tg. n > 4, * correspond à p < 0.05 vs. le groupe contrôle non préconditionné, § à p < 0.05 vs. fibres Littermates.

I.1.c.γ- Communication entre les voies Wnt et mTOR

Chez les cœurs sFRP1-Tg, la phosphorylation après IPC et PPC de mTOR est abolie, et les ratios p-mTOR/mTOR totale sont identiques à ceux mesurés sur des cœurs non préconditionnés (**Figure 45B**). Une réponse similaire a été observée sur les cœurs de souris GSK3 KI, indiquant que la GSK-3 β agit en amont de la voie de survie mTOR. De plus, cette voie est potentiellement contrôlée par la voie Wnt lors du processus de cardioprotection vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion (**Figure 45B**).

Les phosphorylations des deux cibles de mTOR, p70S6K et 4E-BP1, sont également abolies dans les cœurs surexprimant sFRP1-Tg mais aussi dans ceux exprimant une GSK3 KI. Les ratios p-p70S6K/p70S6K totale et p-4E-BP1/4E-BP1 totale sont identiques à ceux mesurés dans les cœurs contrôles, non-préconditionnés (**Figure 46**).

I.1.d- L'inhibition de GSK-3 β et l'activation de mTOR dépendent de l'ouverture du mitoK_{ATP} et de la production de ROS

I.1.d.α- Le Préconditionnement est mitoK_{ATP} dépendant

Afin d'étudier l'implication du mitoK_{ATP} dans la signalisation du préconditionnement, nous avons observé si son inhibition par le 5-hydroxydécanoate (5-HD) altérerait les phosphorylations d'Akt et de GSK-3 β , ainsi que la cardioprotection.

Il est intéressant de constater que la perfusion de 300 μ M de 5-HD abolit complètement la cardioprotection (**Figure 48A**) mais également les phosphorylations d'Akt et de GSK-3 β (**Figure 48B**). De plus, le 5-HD diminue aussi le taux de phosphorylation de mTOR après IPC et PPC (on observe une diminution du ratio p-mTOR/mTOR total de l'ordre de 43% comparé au groupe contrôle non-préconditionné, **Figure 48C**).

Le 5-HD perfusé seul, sur des cœurs non-préconditionnés, n'a aucun effet sur la taille de nécrose ni sur les taux de phosphorylation d'Akt, GSK-3 β ou mTOR.

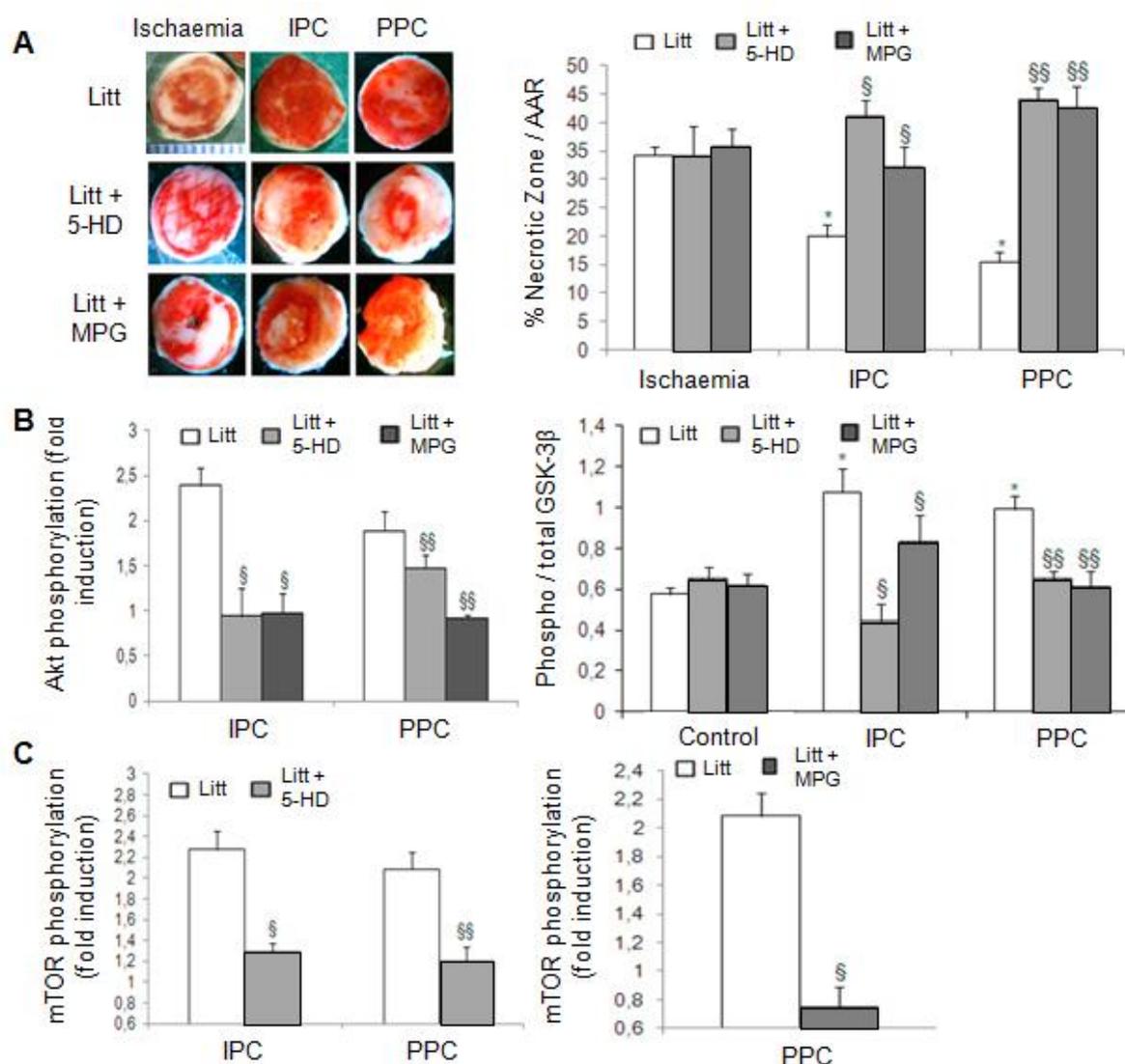


Figure 48- L'inhibition de GSK-3 β et l'activation de mTOR dépendent de l'ouverture du mitoK_{ATP} et de la production de ROS.

(A) Photographies représentatives et quantifications des tailles d'infarctus, exprimées en tant que pourcentage de la zone à risque, de cœurs Littermates ayant subi une IR contrôle (*Ischaemia*), un IPC ou un PPC, en présence ou non de 300 μ M de 5-HD ou de 1mM de MPG. Les résultats correspondent aux moyennes \pm SE (n > 6). * correspond à p < 0.05 vs. IR contrôle, § à p < 0.05 vs. Littermates contrôles. (B) Quantification des ratios p-Akt/Akt totale, p-GSK-

3 β /GSK-3 β totale et (C) p-mTOR/mTOR totale de cœurs Littermates soumis ou non à un IPC ou PPC avec ou sans perfusion de 5-HD ou de MPG.

I.1.d.β- La production de ROS est nécessaire à la signalisation du Préconditionnement

L'ouverture du canal mitoK_{ATP} entraîne la production d'une petite quantité de ROS (Pain, Yang et al. 2000; Garlid, Dos Santos et al. 2003; Pasdois, Beauvoit et al. 2008). Nous avons donc examiné si ces ROS, produits après IPC ou PPC, sont impliqués dans les effets du preconditionnement.

Ainsi, nous avons pu observer que la perfusion de 1mM de *N*-(2-mercaptopropionyl) glycine (MPG), un chélateur de ROS, abolit complètement la protection du cœur engendrée par l'IPC et le PPC (IS/AAR = 32.3 \pm 3.5% et 42.7 \pm 3.6% dans les groupes MPG/IPC et MPG/PPC, vs. 34.3 \pm 1.5% pour les cœurs non-preconditionnés, **Figure 48A**). Le MPG inhibe également les phosphorylations d'Akt et de GSK3- β (**Figure 48B**). Nous avons ensuite examiné les effets du MPG sur l'activation de mTOR due au PPC : le ratio p-mTOR/mTOR totale est réduit de 63% après co-perfusion de MPG+Diazoxide (**Figure 48C**). La perfusion de MPG dans des cœurs non-preconditionnés n'a aucun effet sur la taille d'infarctus ni sur les phosphorylations des protéines étudiées.

I.2- Discussion et Perspectives

Dans cette première partie de résultats, nous avons démontré que le préconditionnement ischémique requiert l'inhibition de GSK-3 β et l'activation des voies Wnt et mTOR sur un modèle de cœur isolé. Une précédente étude menée au laboratoire avait montré le rôle potentiel de la voie Wnt/Frz dans la cardioprotection en relation avec la GSK-3 β sur un modèle d'infarctus du myocarde *in vivo* (Barandon, Dufourcq et al. 2005). L'inhibition de cette voie par sFRP1 induit l'activation de GSK-3 β et abolit la cardioprotection par l'IPC. De plus, de nombreuses molécules reconnues comme cardioprotectrices agiraient *via* la GSK-3 β , comme l'illustre l'étude de Juhaszova et al. portant sur le diazoxide. Ce dernier induit la phosphorylation/inhibition de GSK-3 β dans un modèle de cardiomyocytes en culture (Juhaszova, Zorov et al. 2004).

Nous démontrons que l'activation pharmacologique de l'ouverture du mitoK_{ATP} induit une signalisation et une cardioprotection comparable à celle de l'IPC (**Figure 42**). En effet, tout comme l'IPC, le PPC conduit à une augmentation de la phosphorylation de GSK-3 β dépendante de PI3K/Akt. Ces effets sont bloqués par le 5-HD, un inhibiteur du mitoK_{ATP} (**Figure 48**).

Bien qu'un rôle clé de la GSK-3 β dans la cardioprotection soit rapporté par plusieurs travaux (Tong, Chen et al. 2000; Tong, Imahashi et al. 2002), une étude récente suggère que GSK-3 β ne serait pas déterminante dans le pré- et le postconditionnement chez la souris (Nishino, Webb et al. 2008).

Nos résultats montrent que la cardioprotection apportée par l'IPC et le PPC est abolie dans les cœurs exprimant une forme de GSK3 résistante à l'inactivation par phosphorylation (**Figure 44**). De plus, chez les souris sFRP1-Tg, où l'inactivation de GSK-3 β est bloquée, nous avons également observé une perte de la cardioprotection par IPC et PPC par une voie indépendante de PI3K/Akt (**Figure 47**). Nos résultats montrent donc l'implication de la voie Wnt/Frz dans la phase de préconditionnement et dans la cardioprotection. Ceci est en accord avec les précédents résultats de l'équipe sur le modèle d'infarctus du myocarde *in vivo*. Le modèle de cœur isolé fournit une alternative, pertinente et plus aisée à étudier que le modèle *in vivo* pour l'analyse de la signalisation précoce du préconditionnement. Il permet de plus de s'affranchir de potentiels mécanismes de protection impliquant la réponse neurohumorale au stress, ou les éléments figurés du sang.

I- Rôle de la GSK-3 β dans la signalisation intracellulaire du Préconditionnement : Implications des voies mTOR et Wnt

Nous avons mis en évidence que le mitoK_{ATP} ne serait pas l'effecteur terminal du preconditionnement chez la souris mais jouerait un rôle de médiateur intermédiaire, requis pour l'effet cardioprotecteur. En effet, l'activation directe du mitoK_{ATP} par le diazoxide ne permet pas d'outrepasser l'inhibition de la cardioprotection par sFRP1 ou GSK3 KI (Figure 44, 47).

Nous proposons donc l'existence d'une boucle de rétrocontrôle par laquelle le mitoK_{ATP} pourrait participer au maintien de l'inhibition de GSK-3 β via l'activation d'Akt. Par ailleurs, sFRP1 pourrait réguler cette boucle indépendamment de PI3K/Akt (Figure 49).

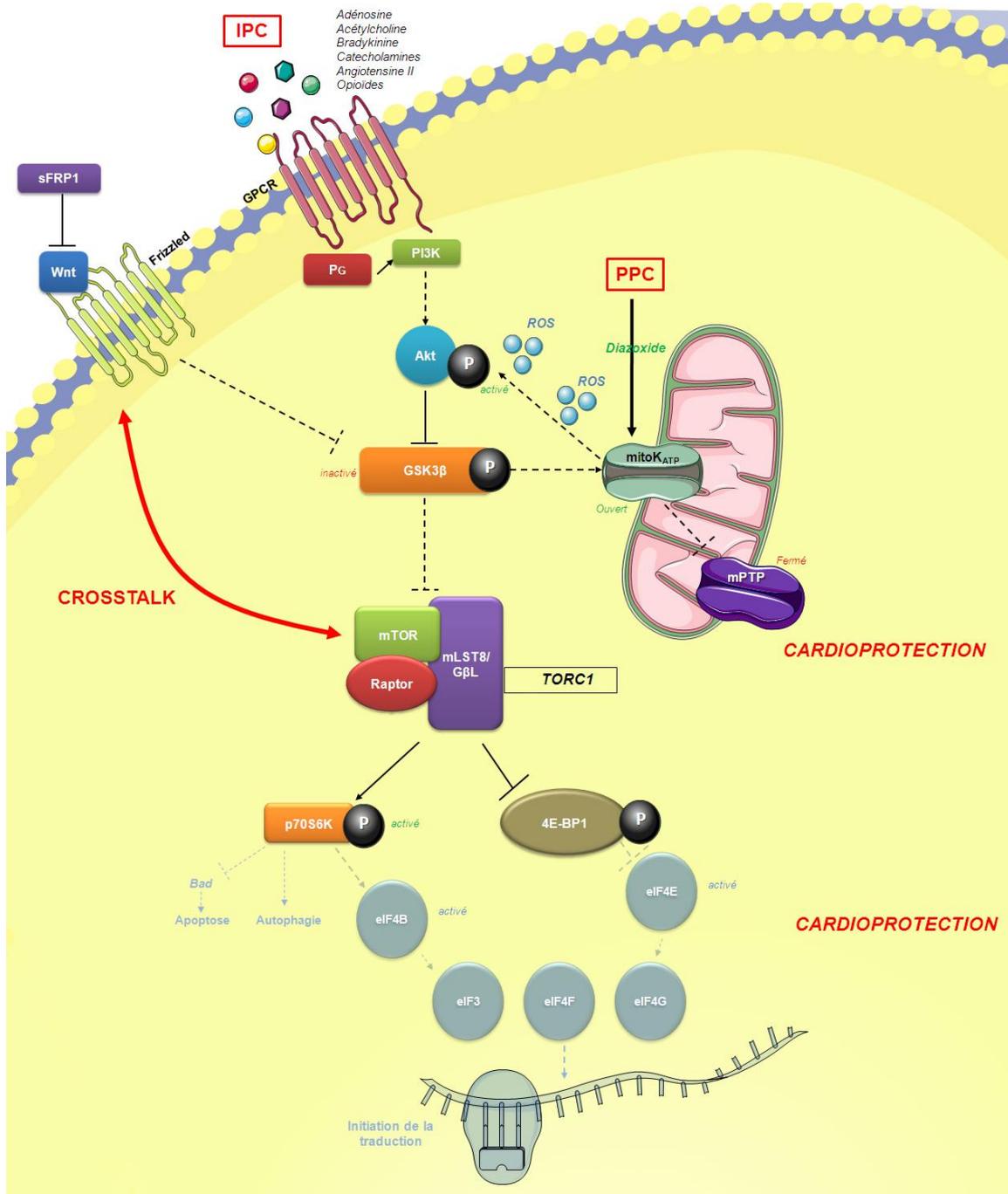


Figure 49- Modèle de signalisation du Préconditionnement.

Nos résultats suggèrent que la signalisation du Préconditionnement implique une boucle d'amplification permettant l'activation de PI3K/Akt, l'inhibition de GSK-3 β et une ouverture maintenue du mitoK_{ATP}. Cette boucle résulte en une activation de la voie mTOR et entraîne la cardioprotection. sFRP1, un antagoniste de la voie Wnt, peut moduler cette boucle d'amplification *via* une interaction avec GSK-3 β , indépendante de PI3K/Akt.

Nous avons émis l'hypothèse que mTOR est une cible de GSK3 β et de la voie Wnt. La voie Wnt a été décrite comme jouant un rôle dans l'activation de mTOR dans un modèle tumoral, probablement *via* l'inhibition de GSK-3 β (Inoki, Ouyang et al. 2006). Par ailleurs, mTOR serait potentiellement impliqué dans le preconditionnement (Kis, Yellon et al. 2003).

Nous avons pu montrer que l'IPC, ainsi que le PPC, induisaient la phosphorylation de mTOR et de ses cibles sous-jacentes, p70S6K et 4E-BP1 (**Figure 45**, **Figure 46**). Tous ces effets sont abolis chez les souris GSK3 KI et sFRP1-Tg. De plus, nous avons montré que la rapamycine, un inhibiteur spécifique de mTOR, bloquait la cardioprotection du preconditionnement.

Ces résultats montrent l'existence d'une interaction entre la voie Wnt et la voie mTOR durant le preconditionnement.

À partir de ces résultats, nous pouvons suggérer que l'activation de la voie mTOR requiert celle de la voie Wnt, et que l'inhibition de GSK-3 β est l'événement pivot permettant à l'effet cardioprotecteur de s'exprimer.

Certaines études démontrent que l'IPC entraîne une altération de l'abondance protéique. Matsuyama et al. suggèrent que l'IPC requiert une synthèse protéique qui pourrait engendrer une tolérance adaptative à l'ischémie/reperfusion dans un modèle de cœur isolé perfusé (Matsuyama, Leavens et al. 2000). Wong et al. proposent que ces changements d'expression protéique seraient plutôt liés à des modifications de la dégradation et/ou à des modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations (Wong, Aponte et al. 2010). mTOR régule les phosphorylations et les fonctions de nombreuses protéines impliquées dans la traduction des ARNm (Gingras, Raught et al. 2001; Hay and Sonenberg 2004). mTOR induit notamment la phosphorylation/activation de p70S6K. L'activation de p70S6K, dont nous avons montré qu'elle se produit durant l'IPC, est connue pour entraîner la phosphorylation de la protéine S6, capable d'activer la traduction d'ARNm codant pour des protéines ribosomales et d'autres facteurs de transcription. L'activation de S6 pourrait ainsi augmenter les capacités cellulaires pour la synthèse protéique. p70S6K peut également phosphoryler eIF4B augmentant ainsi son interaction avec le facteur d'initiation de la

traduction 3 (eIF3) (**Figure 49**) (Shahbazian, Roux et al. 2006). Enfin, p70S6K peut phosphoryler Bad, et par la même pourrait inhiber son rôle pro-apoptotique (Harada, Andersen et al. 2001). p70S6K est aussi capable de réguler positivement l'autophagie (Scott, Schuldiner et al. 2004).

mTOR peut également stimuler la traduction en phosphorylant directement le facteur d'initiation 4E-BP1. Cela entraîne une perte d'affinité de 4E-BP1 pour eIF4E qui va ainsi pouvoir former un complexe avec eIF4G et d'autres partenaires requis pour l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe (**Figure 49**) (Gingras, Kennedy et al. 1998; Gingras, Raught et al. 2001; Richter and Sonenberg 2005).

Nos résultats suggèrent que l'activation de la voie mTOR dépend de la voie Wnt, et d'une boucle d'amplification impliquant PI3K/Akt, GSK-3 β et le mitoK_{ATP} (**Figure 49**). L'ouverture du mitoK_{ATP} entraînerait un rétrocontrôle de ces kinases et permettrait ainsi une amplification du signal. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'action du mitoK_{ATP} sur cette boucle, nous avons examiné le rôle des ROS en tant que médiateurs du preconditionnement. De nombreuses études ont démontré que l'ouverture du mitoK_{ATP} entraînait une production modérée de ROS (Pain, Yang et al. 2000; Forbes, Steenbergen et al. 2001; Andrukhiv, Costa et al. 2006; Pasdois, Beauvoit et al. 2008) qui pourraient activer PKC ϵ et ainsi amplifier le signal cardioprotecteur (Baines, Zhang et al. 2002; Costa, Jakob et al. 2006). Dans une étude précédente, nous avons observé que l'activation de PKC ϵ par le preconditionnement est inhibée par la surexpression de sFRP1 (Barandon, Dufourcq et al. 2005), qui pourrait être compatible avec l'implication de PKC ϵ dans la boucle d'amplification que nous proposons.

Nous suggérons donc que la phosphorylation de GSK-3 β durant le preconditionnement résulte de la production de ROS consécutive à l'ouverture du mitoK_{ATP}. En effet, la perfusion de MPG abolit les phosphorylations d'Akt et de GSK-3 β mais bloque également la cardioprotection induite par le preconditionnement. De plus, le MPG inhibe l'activation de mTOR consécutive à l'ouverture du mitoK_{ATP}. Qin et al. ont montré que le peroxyde d'hydrogène est capable d'induire l'activation de PI3K et d'Akt, induisant la translocation de cette dernière à la membrane plasmique et augmentant ainsi ses capacités catalytiques (Qin and Chock 2003). Les ROS produits pourraient alors agir en tant que second messenger pour induire l'activation d'Akt et ainsi contribuer à l'inhibition de GSK-3 β et l'activation de la voie mTOR.

Tous ces résultats doivent par ailleurs être confirmés sur un modèle d'infarctus murin *in vivo*. L'utilisation d'un tel modèle permettrait d'évaluer la relevance physiologique des voies de signalisation mises en jeu lors du preconditionnement et donc de valider leurs effets sur la

cardioprotection. Des travaux récents de protéomique ont montré des modifications d'expression génique au niveau de la mitochondrie après préconditionnement (Wong, Aponte et al. 2010). Il serait intéressant de poursuivre ces travaux en ciblant plus particulièrement les composants de la voie Wnt et mTOR.

En conclusion, nous démontrons ici pour la première fois que le préconditionnement, ischémique ou pharmacologique, implique une interaction entre les voies Wnt et mTOR, *via* la GSK-3 β , ce qui induirait et contribuerait à amplifier la réponse cardioprotectrice.

II- Implication de GSK-3 β et du mitoK_{ATP} lors du Postconditionnement : Une cardioprotection indépendante des voies Wnt et mTOR

Sommaire

Sommaire.....	- 147 -
II.1- Implication de GSK-3 β et du mitoK _{ATP} lors du Postconditionnement : Une cardioprotection indépendante des voies Wnt et mTOR.....	- 149 -
II.1.a- Le postconditionnement requiert la voie RISK : rôle central de GSK-3 β	- 149 -
II.1.a. α - Postconditionnement et nécrose myocardique.....	- 149 -
II.1.a. β - Implication de la voie RISK lors du postconditionnement.....	- 149 -
II.1.a. γ - L'inhibition de GSK-3 β est primordiale lors du postconditionnement.....	- 151 -
II.1.b- L'efficacité du postconditionnement est indépendante de l'activation de la voie de survie mTOR.....	- 152 -
II.1.c- La voie Wnt/Frz n'est pas impliquée dans le postconditionnement	- 154 -
II.1.d- L'inhibition de GSK-3 β et la cardioprotection dépendent de l'ouverture du mitoK _{ATP} lors du postconditionnement.....	- 155 -
II.2- Discussion et Perspectives.....	- 159 -

II.1- Implication de GSK-3 β et du mitoK_{ATP} lors du Postconditionnement : Une cardioprotection indépendante des voies Wnt et mTOR

II.1.a- Le postconditionnement requiert la voie RISK : rôle central de GSK-3 β

II.1.a. α - Postconditionnement et nécrose myocardique

L'efficacité de la cardioprotection engendrée par le postconditionnement ischémique (IPost) est similaire à celle du postconditionnement pharmacologique (PPost) sur le modèle de cœur isolé perfusé de souris Littermates. On retrouve une diminution de la taille d'infarctus de l'ordre de 37.6% pour des cœurs soumis à un protocole d'IPost et de 27.5% pour les cœurs postconditionnés pharmacologiquement au diazoxide (**Figure 50A**) (IS/AAR = 21.4 \pm 2.5%, 24.8 \pm 5.2% et 34.3 \pm 1.5% respectivement, dans les groupes IPost, PPost et non-postconditionnés, n>7 et p < 0.05).

Cette cardioprotection est comparable à celle engendrée après un préconditionnement ischémique (IPC) ou pharmacologique (PPC) (**Figure 50A**) (IS/AAR = 19.9 \pm 2.1%, 15.4 \pm 1.6% et 34.3 \pm 1.5% respectivement dans les groupes IPC, PPC et non-préconditionnés, n>6 et p < 0.05).

II.1.a. β - Implication de la voie RISK lors du postconditionnement

La cardioprotection apportée par le postconditionnement impliquerait l'inhibition de la GSK-3 β *via* l'activation d'Akt (Zhu, Feng et al. 2006). Nous avons donc étudié l'importance d'Akt et de GSK-3 β dans cette réponse postconditionnante, ainsi que leur état de phosphorylation respective.

L'IPost et le PPost résultent en une augmentation du ratio P-Akt/Akt totale. En effet, on observe une augmentation de ce ratio de l'ordre de 247% après IPost et de 663% après PPost comparé à celui de cœurs Littermates non postconditionnés ayant subi une ischémie de 40min (**Figure 50B**). Le ratio P-GSK-3 β /GSK-3 β totale est lui aussi augmenté après postconditionnement. On retrouve une augmentation de l'ordre de 190% après IPost et de

165% après PPost par rapport au groupe contrôle non postconditionné (**Figure 50B**). Cette augmentation de phosphorylation reflète l'inhibition de GSK-3 β .

Les cœurs Littermates ayant subi une ischémie de 40min présentent un niveau basal faible de phosphorylation d'Akt et GSK-3 β .

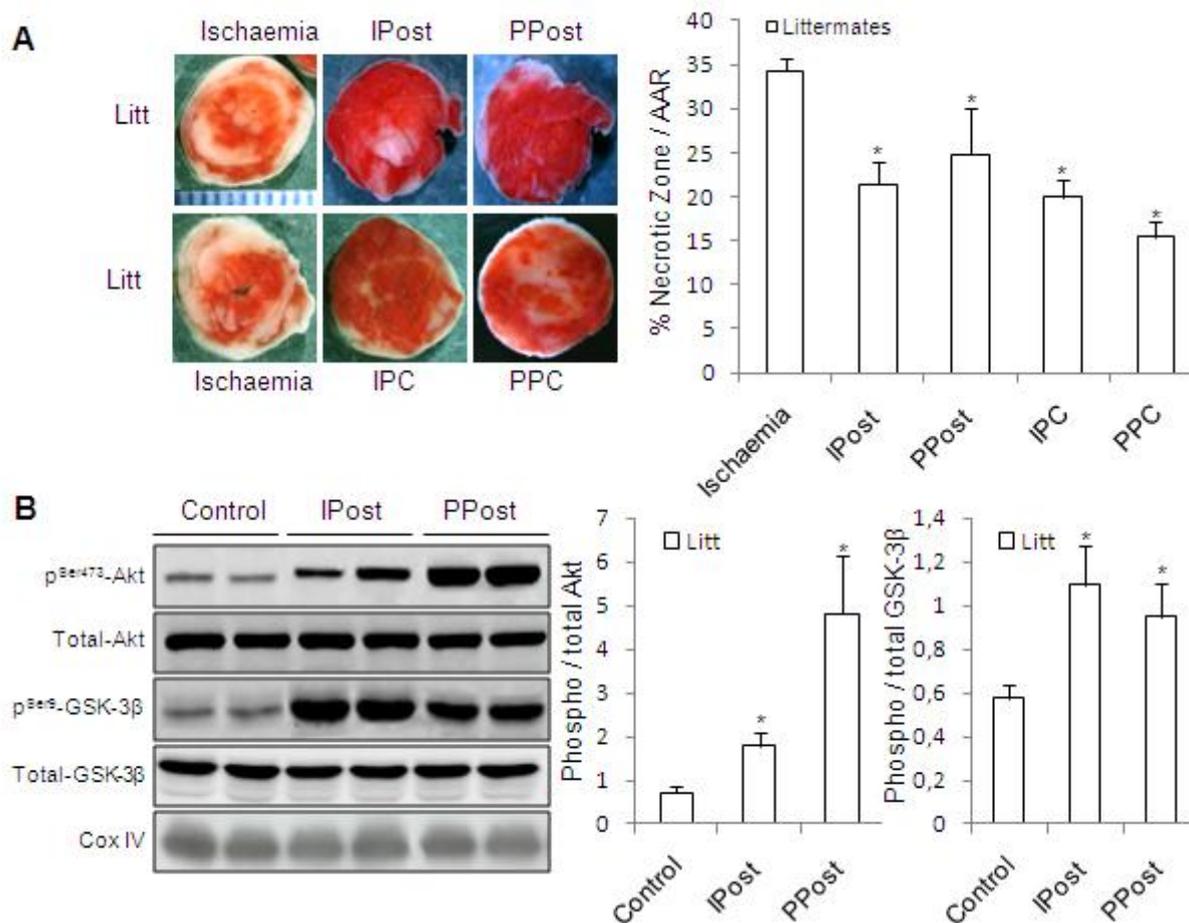


Figure 50- Le postconditionnement protège le cœur via la voie Akt/GSK-3 β (I).

(A) Photographies originales obtenues après coloration au TTC de cœurs Littermates ayant subi une ischémie/reperfusion contrôle (*Ischemia*), un postconditionnement ischémique (*IPost*), un postconditionnement pharmacologique (*PPost*), un préconditionnement ischémique (*IPC*) ou un préconditionnement pharmacologique (*PPC*). Les cœurs ont été coupés en tranches transversales et colorés au TTC pour distinguer les zones myocardiques nécrosées (non colorées) des zones viables (rouges). Une graduation pour 1mm. Les tailles d'infarctus (*IS*) sont exprimées en tant que pourcentage de la zone à risque totale (*AAR*). Les résultats correspondent aux moyennes \pm SE ($n > 6$). * correspond à $p < 0.05$ vs. IR contrôle, § à $p < 0.05$ vs. Littermates contrôle. **(B)** Immunoblots représentatifs et leurs quantifications de p^{Ser473}-Akt, Akt totale, p^{Ser9}-GSK-3 β , GSK-3 β totale et de la cytochrome c oxydase IV (Cox IV) de cœurs isolés perfusés ayant subi une perfusion aérobie suivie de 40min d'ischémie globale (*control*), un IPost ou un PPost. La Cox IV a été utilisée pour s'assurer de la qualité des dépôts. Les analyses quantitatives

de plusieurs expériences représentent les ratios p-Akt/Akt totale ou p-GSK-3 β /GSK-3 β totale. n > 8 et * correspond à p < 0.05 vs. le groupe contrôle ayant subi une perfusion normoxique suivie d'ischémie, sans postconditionnement.

Afin de confirmer l'importance d'Akt durant la mise en place du postconditionnement, nous avons utilisé un inhibiteur de PI3K, la wortmannine. Sa perfusion durant les protocoles d'IPost ou de PPost abolit la protection normalement engendrée par ces protocoles de postconditionnement (**Figure 51**). En effet, les tailles d'infarctus sont identiques au groupe non-postconditionné (IS/AAR = 42.9 \pm 9.4% et 33.5 \pm 5.4% après WM/IPost et WM/PPost vs. 35.3 \pm 3.2% pour les cœurs WM/non-postconditionnés, n>6).

II.1.a. γ - L'inhibition de GSK-3 β est primordiale lors du postconditionnement

Tout comme pour ce qui concerne le préconditionnement, l'implication de la GSK-3 β lors du postconditionnement est un sujet controversé. Nishino et al. ont en effet observé que celle-ci ne serait pas requise pour l'effet cardioprotecteur du postconditionnement (Nishino, Webb et al. 2008). Afin d'évaluer son implication, nous avons utilisé des souris GSK3 KI, qui expriment des GSK-3 α et GSK-3 β non phosphorylables.

Les cœurs de souris GSK3 KI sont naturellement insensibles aux manœuvres de cardioprotection par IPost ou PPost. En effet, la taille de l'infarctus mesurée après IPost ou PPost sur cette souche est similaire à celle observée chez des souris Littermates n'ayant pas subi de postconditionnement (IS/AAR = 46.4 \pm 5.6% et 34.0 \pm 5.9% après IPost et PPost respectivement pour les cœurs GSK3 KI, vs. 39.5 \pm 4.1% après IR chez les littermates ; **Figure 51**).

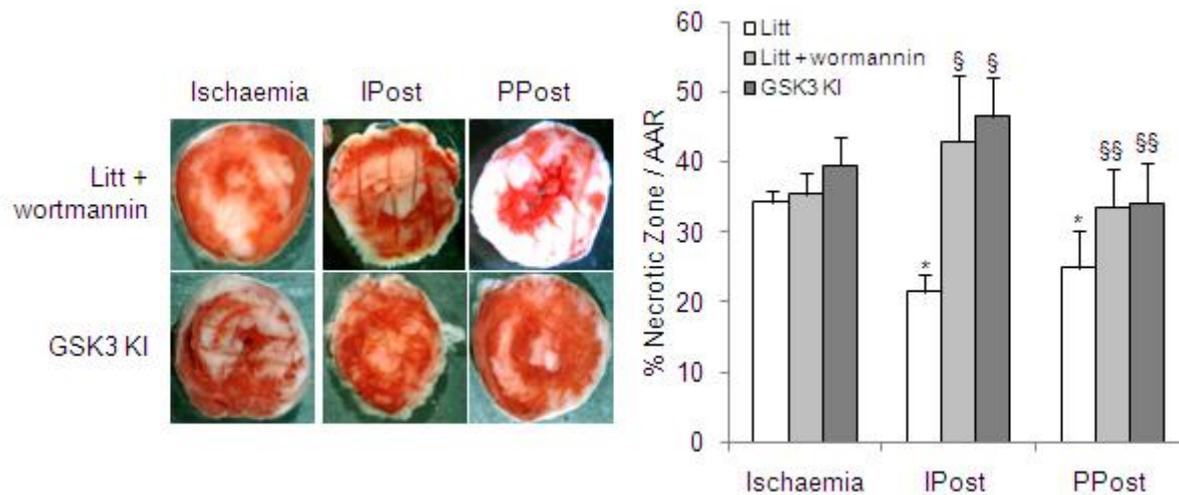


Figure 51- Le postconditionnement protège le cœur via la voie Akt/GSK-3 β (II).

Taille d'infarctus de cœur Littermates soumis à une ischémie contrôlée, un IPost ou un PPost avec perfusion de 100nM de wortmannine, et de cœur de souris GSK3 Knock-in soumis à une ischémie/reperfusion contrôlée (*Ischaemia*), un IPost ou un PPost. § correspond à $p < 0.05$ vs. le groupe Litt contrôle.

II.1.b- L'efficacité du postconditionnement est indépendante de l'activation de la voie de survie mTOR

Compte tenu de l'implication de la voie mTOR lors du préconditionnement, nous avons naturellement évalué son rôle lors du postconditionnement (voir chapitre **I.1.b- Le préconditionnement implique l'activation de la voie de survie mTOR**).

L'utilisation d'un inhibiteur de mTOR, la rapamycine, s'est avérée sans effet sur la protection apportée par les deux types de postconditionnement. En effet, il n'y a pas de différence significative entre les groupes rapamycine/IPost et IPost ($IS/AAR = 28.94 \pm 6.45\%$ vs. $21.37 \pm 2.5\%$ pour les groupes rapamycine/IPost et IPost respectivement), et entre les groupes rapamycine/PPost et PPost ($26.9 \pm 3.7\%$ vs. $24.8 \pm 5.2\%$ pour les groupes rapamycine/PPost et PPost respectivement ; **Figure 52A**).

Nous avons également étudié l'état de phosphorylation de mTOR et de ses deux principales cibles, p70S6K et 4E-BP1 dans ce contexte. Après postconditionnement, il n'y a pas de modification de la phosphorylation de mTOR comparé au groupe non-postconditionné (**Figure 52B**). De même, les cibles p70S6K et 4E-BP1 ne présentent pas de variation de leur taux de phosphorylation après postconditionnement (**Figure 52B**).

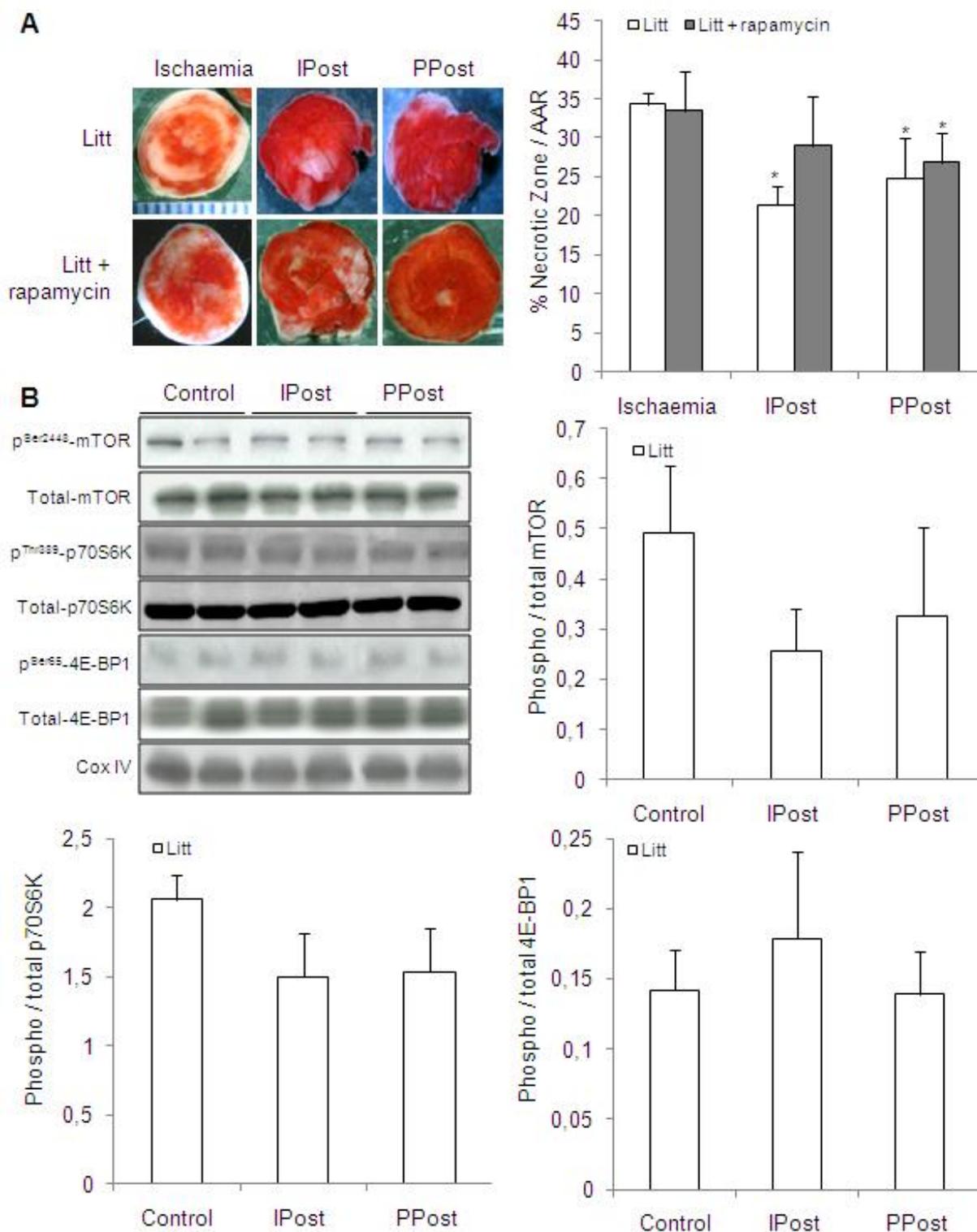


Figure 52- La voie mTOR n'est pas impliquée lors du postconditionnement.

(A) Photographies représentatives et quantifications des tailles d'infarctus, exprimées en tant que pourcentage de la zone à risque, de cœurs Littermates ayant subi une IR contrôle (*Ischaemia*), un IPost ou un PPost, en présence ou non de 250pM de rapamycine. Les résultats correspondent aux moyennes \pm SE (n > 6). * correspond à p < 0.05 vs. IR contrôle. **(B)** Immunoblots représentatifs

et leurs quantifications de p^{Ser2448}-mTOR, mTOR totale, p^{Thr389}-p70S6K, p70S6K totale, p^{Ser65}-4E-BP1 et 4E-BP1 totale et de la cytochrome *c* oxydase IV (Cox IV) de cœurs isolés perfusés de souris Littermates (*Litt*) ayant subi une perfusion aérobie suivie de 40min d'ischémie 0flow (*Control*), un IPost ou un PPost. Les analyses quantitatives de plusieurs expériences représentent les ratios p-mTOR/mTOR totale, p-p70S6K/p70S6K totale et p-4E-BP1/4E-BP1 totale. n > 8.

II.1.c- La voie Wnt/Frz n'est pas impliquée dans le postconditionnement

Nous avons montré précédemment l'implication de la voie Wnt lors de la cardioprotection par préconditionnement (voir chapitre **I.1.c- Existence d'une communication entre les voies Wnt/Frz et mTOR lors du préconditionnement**). En raison des similitudes observées entre les voies de signalisation du préconditionnement et du postconditionnement (Hausenloy 2009), nous avons étudié l'implication de cette voie de développement embryonnaire lors du postconditionnement. Pour cela, nous avons réalisé des protocoles de postconditionnement sur des cœurs de souris surexprimant sFRP1, un antagoniste de cette voie Wnt.

Contrairement aux résultats observés lors des protocoles de préconditionnement, la cardioprotection apportée par le postconditionnement n'est pas affectée par la surexpression de sFRP1. En effet, on retrouve une protection semblable entre les souris sFRP1 et les Littermates (IS/AAR = $25.55 \pm 2.6\%$ vs. $21.37 \pm 2.5\%$ pour les groupes sFRP1/IPost et Litt/IPost respectivement, et $24.4 \pm 3.3\%$ vs. $24.8 \pm 5.2\%$ pour les groupes sFRP1/PPost et Litt/PPost respectivement, **Figure 53**).

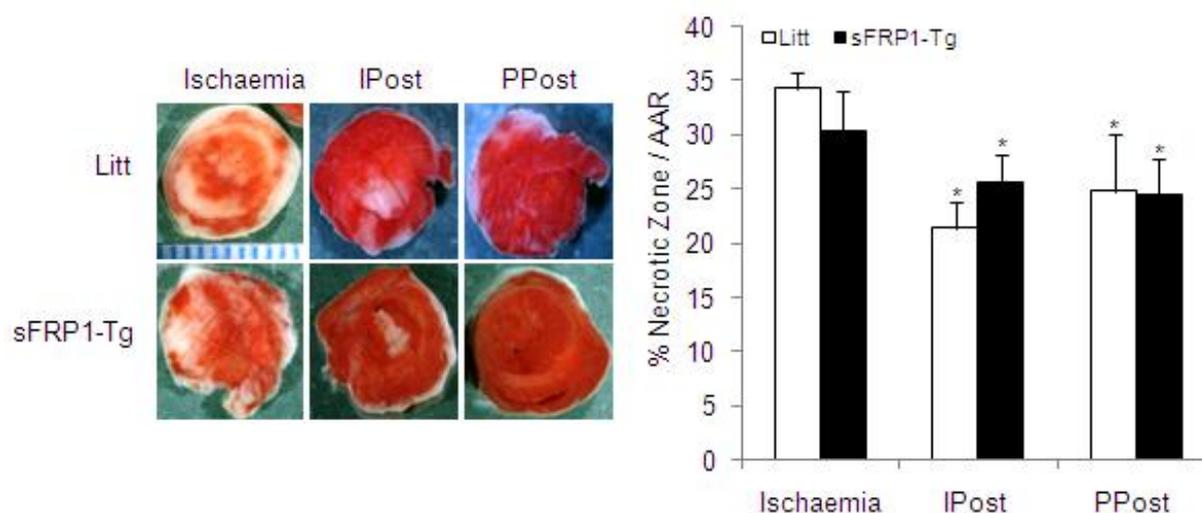


Figure 53- la voie Wnt/Frz n'intervient pas dans la mise en place de la cardioprotection par postconditionnement.

Photographies originales et quantifications des tailles d'infarctus, exprimées en tant que pourcentage de la zone à risque, de cœurs Littermates ou sFRP1-Tg ayant subi une IR contrôle (*Ischaemia*), un IPost ou un PPost. Les résultats correspondent aux moyennes \pm SE (n > 6). * correspond à p < 0.05 vs. IR contrôle.

II.1.d- L'inhibition de GSK-3 β et la cardioprotection dépendent de l'ouverture du mitoK_{ATP} lors du postconditionnement

Afin d'étudier l'implication du canal mitoK_{ATP} durant le postconditionnement, nous avons étudié l'effet du 5-HD, un inhibiteur spécifique de ce canal, dans ce contexte.

La perfusion de 300 μ M de 5-HD bloque la protection apportée par le postconditionnement (IS/AAR = 32.5 \pm 6.5% et 37.6 \pm 9.9% pour les groupes 5-HD/IPost et 5-HD/PPost vs. 34.2 \pm 5.0% pour le groupe 5-HD non-postconditionné ; (**Figure 54A**)). Cette absence d'effet cardioprotecteur est à rapprocher de l'absence de phosphorylation d'Akt et GSK-3 β en présence de 5-HD. Notons que la perfusion de 5-HD au moment de la reperfusion sur des cœurs non-postconditionnés n'entraîne ni variation de la taille d'infarctus ni modification de la phosphorylation d'Akt et GSK-3 β (**Figure 54B**).

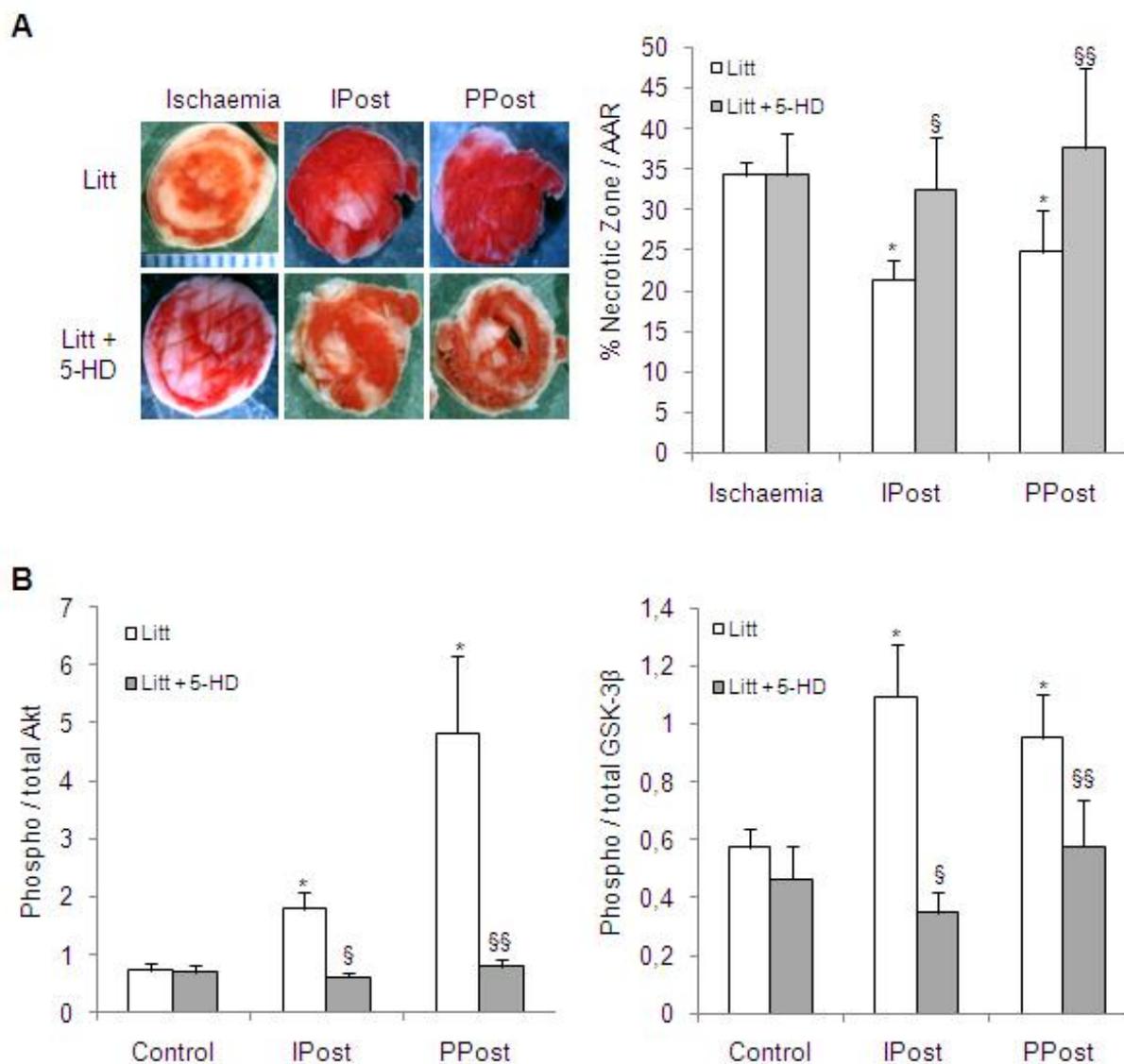


Figure 54- L'inhibition de GSK-3 β et la cardioprotection est dépendante de l'ouverture du mitoK_{ATP} lors du postconditionnement.

(A) Photographies représentatives et quantifications des tailles d'infarctus, exprimées en tant que pourcentage de la zone à risque, de cœurs Littermates ayant subi une IR contrôlée (*Ischaemia*), un IPost ou un PPost, en présence ou non de 300 μ M de 5-HD. **(B)** Quantification des ratios p-Akt/Akt totale, p-GSK-3 β /GSK-3 β totale de cœurs Littermates soumis ou non à un IPost ou PPost avec ou sans perfusion de 5-HD. Les résultats correspondent aux moyennes \pm SE (n > 6). * correspond à p < 0.05 vs. IR contrôlé, \S à p < 0.05 vs. Littermates contrôlés.

II.2- Discussion et Perspectives

Dans cette seconde partie de résultats, nous avons démontré que le postconditionnement ischémique et pharmacologique requierent l'inhibition de GSK-3 β et l'ouverture du mitoK_{ATP} mais n'impliquent, contrairement au préconditionnement, ni la voie Wnt/Frz ni la voie mTOR.

Nous montrons que l'efficacité de la protection apportée par postconditionnement est similaire, en termes de réduction de taille de nécrose, à celle engendrée par préconditionnement. De plus, l'activation pharmacologique du canal mitoK_{ATP}, par perfusion de diazoxide durant les premières minutes de reperfusion, induit une réponse intracellulaire et une cardioprotection identique au postconditionnement ischémique (**Figure 50**). Tout comme le préconditionnement, l'IPost et le PPost induisent une augmentation de la phosphorylation d'Akt et de GSK-3 β . Ces phosphorylations, comme la protection, sont bloquées par la perfusion de wortmannine (inhibiteur de PI3K) et de 5-HD (inhibiteur du mitoK_{ATP}) (**Figure 50B, 51, 54**).

Alors que l'implication de GSK-3 β lors du postconditionnement reste un sujet de débats acharnés (Tong, Imahashi et al. 2002; Nishino, Webb et al. 2008), nous montrons dans ce travail que la cardioprotection apportée par IPost et PPost est abolie dans les cœurs exprimant une forme de GSK3 résistante à l'inactivation par phosphorylation (**Figure 51**). Dans notre modèle de cœur murin isolé perfusé, la GSK-3 β aurait donc un rôle primordial lors de la mise en place de la cardioprotection par postconditionnement.

Nous pouvons ainsi proposer un modèle de boucle de rétrocontrôle semblable à celle proposée pour le préconditionnement, qui assurerait le maintien de l'ouverture du canal mitoK_{ATP}, lors du postconditionnement grâce à une inhibition de GSK-3 β , *via* l'activation d'Akt (**Figure 55**).

D'après les travaux de Musiolik et al. et Skyschally et al., la voie RISK ne serait pas impliquée lors du postconditionnement. Cette contradiction avec nos résultats pourrait être en rapport avec des différences de modèles d'études. En effet, Musiolik et al. et Skyschally et al., dans leurs études respectives, ont utilisé un modèle porcin de ligature *in vivo* de l'artère coronaire gauche (Skyschally, van Caster et al. 2009; Musiolik, van Caster et al. 2010) alors que nous utilisons un modèle de cœur isolé perfusé de souris et d'ischémie globale. De nombreuses études ont montré que les modalités de réalisation d'un postconditionnement efficace, notamment les algorithmes d'ischémie-reperfusion, diffèrent

en fonction des espèces étudiées ainsi que des critères de jugement (van Vuuren and Lochner 2008; Skyschally, van Caster et al. 2009). Cela pourrait, au moins en partie, expliquer ces contradictions.

Contrairement au préconditionnement, l'efficacité du postconditionnement, sur notre modèle, n'est pas modulée par la voie Wnt/Frz. En effet, la surexpression de sFRP1, un inhibiteur de cette voie de développement embryonnaire, n'affecte pas la réponse cardioprotectrice apportée par l'IPost ou le PPost. Afin d'expliquer cette différence d'implication de la voie Wnt vis-à-vis du préconditionnement ou du postconditionnement, on peut envisager l'existence d'une perturbation de la compartimentation intracellulaire de GSK-3 β , qui pourrait amener à la constitution de pools différents en fonction du contexte : un pool impliqué lors du préconditionnement, et pouvant être modulé par la voie Wnt ; et un second pool, indépendant de la voie Wnt, impliqué dans le postconditionnement. Cette hypothèse de deux pools de GSK-3 β serait compatible avec les données observées par Juhaszova et al. (Juhaszova, Zorov et al. 2004) et plus récemment par Miura et al. (Miura, Tanno et al. 2010), qui retrouvent un premier pool de GSK-3 β cytosolique et un second au niveau de la mitochondrie.

Pour conforter l'hypothèse de l'existence de deux pools de GSK-3 β impliqués différemment lors du pré- et postconditionnement, il faudra en premier lieu contrôler l'état de phosphorylation de GSK-3 β dans les cœurs sFRP1 après postconditionnement. En effet, l'absence d'effet de sFRP1 sur l'IPost/PPost devrait s'accompagner d'une absence d'effet de sFRP1 sur la phosphorylation de GSK-3 β induite par le postconditionnement. Il faudra, en second lieu, préciser la localisation intracellulaire de GSK-3 β après postconditionnement par fractionnements subcellulaires, afin d'étudier l'éventuelle perturbation de sa localisation et de son état de phosphorylation en fonction de sa localisation.

Dans ce travail, nous avons également étudié l'éventuelle implication de mTOR, cible de GSK-3 β (Kis, Yellon et al. 2003) et qui possède un rôle clé lors du préconditionnement (voir chapitre **I.1.b- Le préconditionnement implique l'activation de la voie de survie mTOR**). Nous avons pu observer que mTOR ne semble pas impliqué lors du postconditionnement. En effet, la perfusion de rapamycine, un inhibiteur de mTOR, n'influence pas la protection apportée par l'IPost et le PPost. En accord avec ces résultats, nous n'observons ni la phosphorylation de mTOR ni celle de ses cibles p70S6K et 4E-BP1 durant le postconditionnement (**Figure 52**).

Ces résultats montrent que la signalisation intracellulaire du postconditionnement serait différente de celle du préconditionnement. En effet, contrairement à ce que l'on a observé

lors du préconditionnement (voir Chapitre I des résultats - **La GSK-3 β au carrefour de la signalisation intracellulaire du Préconditionnement : Implications des voies mTOR et Wnt**), le postconditionnement n'implique pas les voies Wnt et mTOR, malgré un rôle central du mitoK_{ATP}, d'Akt et de GSK-3 β (**Figure 55**).

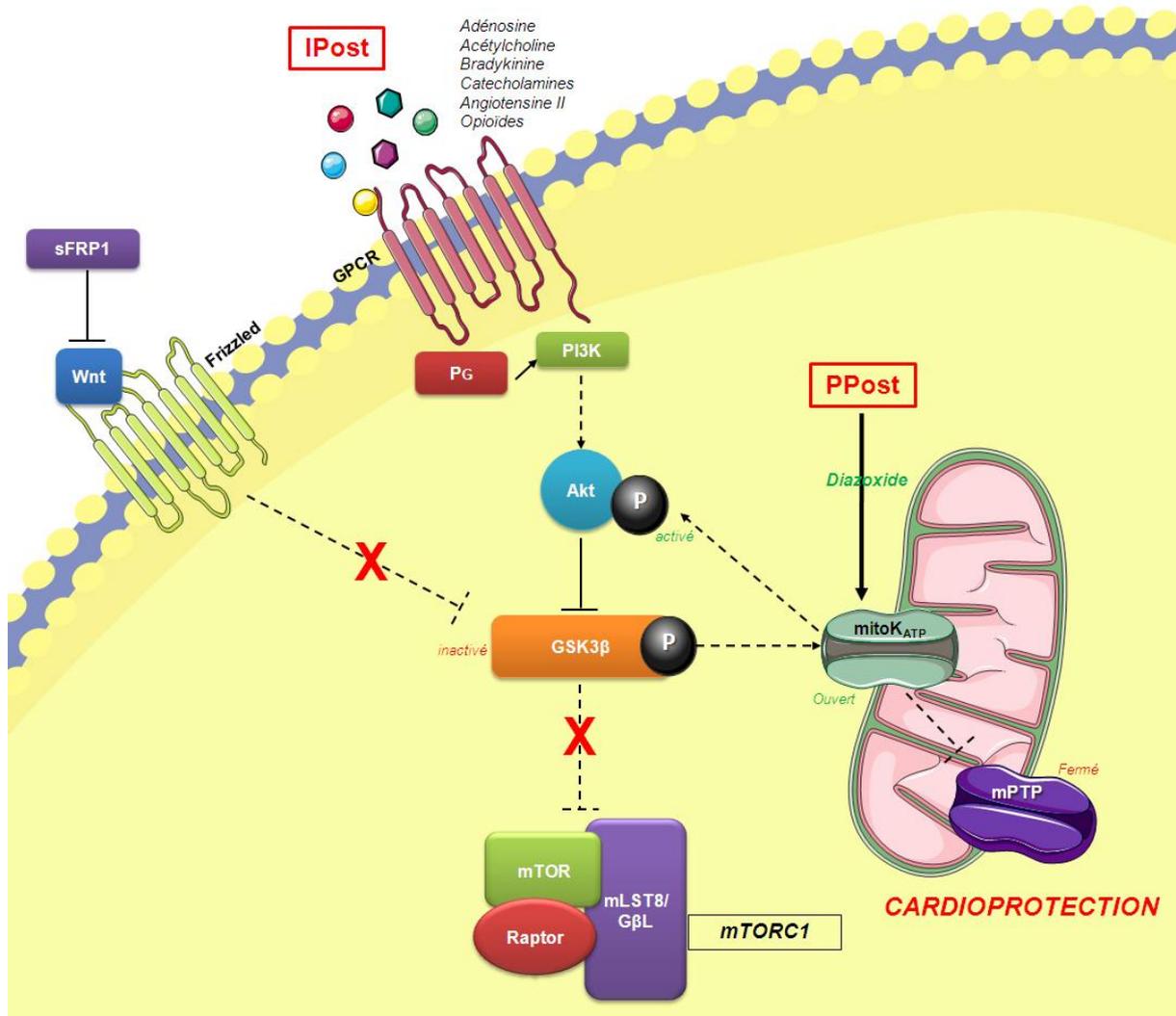


Figure 55- Modèle de signalisation du postconditionnement.

Nos résultats suggèrent que la signalisation du postconditionnement implique une boucle d'amplification permettant l'activation de PI3K/Akt, l'inhibition de GSK-3 β et une ouverture maintenue du mitoK_{ATP}. Cette voie de signalisation est indépendante des voies Wnt et mTOR, impliquées lors du préconditionnement.

La cardioprotection apportée par le postconditionnement pourrait donc faire intervenir d'autres cibles, telles que des cibles de PDK1 (PKC) mais aussi d'Akt, comme Bad (Miyawaki, Mashiko et al. 2008; Yu, Yu et al. 2010) ou la caspase 9 (Lopez-Nebolina, Toledo et al. 2005) impliquées dans l'apoptose. Afin d'étudier cela, il sera intéressant d'analyser

l'effet du postconditionnement sur l'éventuelle translocation d'acteurs comme la PKC ϵ , Bad et Bax lors du postconditionnement, ainsi que sur le relargage du cytochrome c.

La voie de survie mTOR/p70S6K/4E-BP1, impliquée lors de l'initiation de la traduction, ne semble pas intervenir lors du postconditionnement sur ce modèle de cœur isolé perfusé murin. Cette hypothèse est confirmée par l'absence d'effet de la perfusion de rapamycine durant l'IPost et le PPost. L'absence de phosphorylation de p70S6K après postconditionnement observée par Wagner et al. sur un modèle d'occlusion coronaire de rat conforte nos résultats, suggérant l'absence d'implication de mTOR dans ce contexte (Wagner, Tillack et al. 2010). Lucchinetti et al. ont également montré, sur un modèle de cœur isolé de rat, que le postconditionnement n'induit pas le même type de modification transcriptionnelle que le préconditionnement (Lucchinetti, da Silva et al. 2005). À titre d'exemple, ils rapportent que l'expression de HSF1, impliqué dans l'expression de nombreuses heat shock proteins (HSP) permettant le repliement et l'assemblage des peptides, est diminuée après le postconditionnement par l'isoflurane. Cet effet pourrait être dû à une inhibition dépendante de JNK et Erk1/2 mais aussi à une diminution de l'expression de kinases impliquées dans la stabilisation des ARNm de ces HSP. Ils ont également observé une forte diminution après postconditionnement de l'expression de NF- κ B, impliqué dans la transcription de nombreuses cytokines, chemokines ainsi que dans l'adhésion cellulaire.

En conclusion, nous montrons ici que le postconditionnement engendre une protection myocardique similaire à celle observée après préconditionnement, et que cette protection peut être induite après activation directe du mitoK_{ATP} par le diazoxide durant les premières minutes de reperfusion. Nos résultats plaident pour l'implication de la voie RISK et de GSK-3 β dans une boucle d'amplification faisant intervenir le mitoK_{ATP} et Akt mais, contrairement au préconditionnement, indépendamment de toute influence des voies Wnt et mTOR.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail de thèse étudie la signalisation intracellulaire du préconditionnement et du postconditionnement sur un modèle de cœur isolé perfusé de souris, nouvellement mis en place dans le laboratoire.

Nous avons ainsi observé que le préconditionnement ischémique peut être mimé par une activation directe du mitoK_{ATP} par le diazoxide et que cet effet procède de l'activation d'une signalisation intracellulaire commune aux deux types de préconditionnement, qui induit un effet cardioprotecteur équivalant en termes de réduction de la taille de la nécrose. Nous avons surtout mis en évidence l'existence, lors du préconditionnement, d'une boucle d'auto-amplification impliquant l'activation d'Akt, l'inhibition de GSK-3 β et l'ouverture du mitoK_{ATP}. La production mitochondriale de ROS, en réponse à l'ouverture du mitoK_{ATP}, est un événement clé de la mise en action de cette boucle de par leur rôle de second messenger intracellulaire.

Le laboratoire avait précédemment montré que la voie de développement embryonnaire Wnt est capable de moduler l'effet du préconditionnement ischémique *via* son influence sur l'état de phosphorylation/inhibition de GSK-3 β indépendamment d'Akt. Ce travail étend cette observation au préconditionnement pharmacologique par activation directe du mitoK_{ATP}. Nos résultats mettent en perspectives l'implication du mitoK_{ATP} dans la signalisation intracellulaire du préconditionnement, alors que nos travaux préalables, réalisés chez le rat et le gros animal, s'étaient attachés à étudier les mécanismes de son implication en tant qu'effecteur terminal.

Nous montrons que la voie de survie mTOR est également impliquée lors de cette signalisation, et que cette dernière intervient comme cible de GSK-3 β et pourrait induire des modifications traductionnelles participant à la réponse adaptative à l'ischémie-reperfusion.

La seconde partie de nos travaux a étudié la signalisation intracellulaire du postconditionnement selon des modalités comparables et sur les mêmes modèles animaux. Nous montrons que l'activation directe du mitoK_{ATP}, par perfusion de diazoxide à l'instauration de la reperfusion, induit une protection similaire à celle apportée par le postconditionnement ischémique.

Les deux modalités de cardioprotection, à savoir le préconditionnement (ischémique ou pharmacologique) et le postconditionnement (ischémique ou pharmacologique) partagent des voies de signalisation similaires impliquant Akt, GSK-3 β et le mitoK_{ATP}, trois acteurs reliés par une boucle d'amplification. GSK-3 β , qui apparaît comme un partenaire pivot de cette voie commune, activerait des cibles différentes en fonction des modalités de la cardioprotection (préconditionnement vs. postconditionnement). Alors que la voie Wnt et la voie mTOR sont

des partenaires régulateurs ou effecteurs, respectivement, du préconditionnement, elles ne semblent jouer aucun rôle dans le contexte du postconditionnement.

Ces différences pourraient impliquer l'isoforme alpha de GSK3. En effet, dans les souris sFRP1, contrairement à ce qui est observé chez les souris GSK3 KI, seule l'isoforme beta est rendue résistante à l'inhibition par phosphorylation. Ainsi, on ne peut exclure que la GSK-3 α soit un partenaire du postconditionnement insensible à la modulation par la voie Wnt. Cette hypothèse pourra être vérifiée au moyen de souris exprimant seulement la forme GSK-3 α KI ou GSK-3 β KI, dont nous disposons actuellement.

Une hypothèse alternative impliquerait l'existence de deux pools de GSK-3 β . Le premier, cytosolique, pourrait être la cible du préconditionnement ; le second, mitochondrial, pourrait intervenir lors du postconditionnement. Les travaux de Nishihara et al. montrent en effet que la GSK-3 β serait transloquée à la mitochondrie dès les premières minutes de reperfusion (Nishihara, Miura et al. 2007). Cette GSK-3 β mitochondriale pourrait être la cible du postconditionnement et ainsi échapper à la modulation par la voie Wnt. Afin de vérifier l'existence de ces pools et leurs rôles éventuels, il sera intéressant d'étudier la translocation de GSK-3 β ainsi que son état de phosphorylation lors du pré- et du postconditionnement par des expériences de fractionnement cellulaire.

Ces travaux mériteraient d'être complétés par une analyse des modifications d'expression génique (au niveau protéique) après préconditionnement, en ciblant plus particulièrement les protéines impliquées dans les voies Wnt et mTOR, et par des expériences de protéomique afin d'étudier les éventuelles différences entre pré- et postconditionnement.

Les résultats obtenus en première analyse mériteront d'être confirmés sur un modèle d'infarctus murin *in vivo*. Ceci permettrait également de valider l'implication du mitoK_{ATP} lors du postconditionnement pharmacologique par le diazoxide, et d'approfondir la pertinence physiologique des voies de signalisation nouvellement identifiées et de valider leurs implications lors de la cardioprotection.

Il serait enfin intéressant d'étudier l'implication du pore mPTP lors de la cardioprotection (des travaux dans ce domaine sont actuellement en cours dans le laboratoire).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Alessi, D. R., L. R. Pearce, et al. (2009). "New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond." *Sci Signal* **2**(67): pe27.
- Andrukhiv, A., A. D. Costa, et al. (2006). "Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(5): H2067-74.
- Antos, C. L., T. A. McKinsey, et al. (2002). "Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(2): 907-12.
- Aon, M. A., S. Cortassa, et al. (2009). "From mitochondrial dynamics to arrhythmias." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(10): 1940-8.
- Aon, M. A., S. Cortassa, et al. (2008). "Mitochondrial oscillations in physiology and pathophysiology." *Adv Exp Med Biol* **641**: 98-117.
- Ardehali, H., Z. Chen, et al. (2004). "Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11880-5.
- Ardehali, H. and B. O'Rourke (2005). "Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death." *J Mol Cell Cardiol* **39**(1): 7-16.
- Argaud, L. and M. Ovize (2004). "[How to use the paradigm of ischemic preconditioning to protect the heart?]." *Med Sci (Paris)* **20**(5): 521-5.
- Baines, C. P., M. Goto, et al. (1997). "Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium." *J Mol Cell Cardiol* **29**(1): 207-16.
- Baines, C. P., R. A. Kaiser, et al. (2005). "Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death." *Nature* **434**(7033): 658-62.
- Baines, C. P., R. A. Kaiser, et al. (2007). "Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death." *Nat Cell Biol* **9**(5): 550-5.
- Baines, C. P., J. Zhang, et al. (2002). "Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection." *Circ Res* **90**(4): 390-7.
- Barandon, L., T. Couffinhal, et al. (2003). "Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA." *Circulation* **108**(18): 2282-9.
- Barandon, L., P. Dufourcq, et al. (2005). "Involvement of FrzA/sFRP-1 and the Wnt/frizzled pathway in ischemic preconditioning." *Circ Res* **96**(12): 1299-306.
- Baxter, G. F., M. M. Mocanu, et al. (2001). "Cardioprotective effects of transforming growth factor-beta1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK." *J Cardiovasc Pharmacol* **38**(6): 930-9.
- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." *Am J Physiol* **271**(5 Pt 1): C1424-37.
- Bell, R. M. and D. M. Yellon (2003). "Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway." *J Am Coll Cardiol* **41**(3): 508-15.
- Bell, R. M. and D. M. Yellon (2003). "Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS." *J Mol Cell Cardiol* **35**(2): 185-93.
- Bers, D. M., S. Despa, et al. (2006). "Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes." *Ann N Y Acad Sci* **1080**: 165-77.
- Bessman, S. P. and A. Fonyo (1966). "The possible role of the mitochondrial bound creatine kinase in regulation of mitochondrial respiration." *Biochem Biophys Res Commun* **22**(5): 597-602.
- Bijur, G. N. and R. S. Jope (2003). "Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation." *J Neurochem* **87**(6): 1427-35.

- Birnbaum, Y., J. Leor, et al. (1997). "Pathobiology and Clinical Impact of Reperfusion Injury." *J Thromb Thrombolysis* **4**(2): 185-195.
- Bittl, J. A. and J. S. Ingwall (1985). "Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A 31P NMR magnetization transfer study." *J Biol Chem* **260**(6): 3512-7.
- Boengler, K., A. Buechert, et al. (2008). "Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice." *Circ Res* **102**(1): 131-5.
- Boengler, K., D. Hilfiker-Kleiner, et al. (2008). "The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure." *Pharmacol Ther* **120**(2): 172-85.
- Bolli, R., W. X. Zhu, et al. (1987). "Attenuation of dysfunction in the postischemic 'stunned' myocardium by dimethylthiourea." *Circulation* **76**(2): 458-68.
- Boluyt, M. O., Z. B. Li, et al. (2004). "The mTOR/p70S6K signal transduction pathway plays a role in cardiac hypertrophy and influences expression of myosin heavy chain genes in vivo." *Cardiovasc Drugs Ther* **18**(4): 257-67.
- Bond, J. M., B. Herman, et al. (1991). "Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **179**(2): 798-803.
- Boveris, A., N. Oshino, et al. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." *Biochem J* **128**(3): 617-30.
- Brar, B. K., A. K. Jonassen, et al. (2000). "Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway." *J Biol Chem* **275**(12): 8508-14.
- Brazil, D. P., J. Park, et al. (2002). "PKB binding proteins. Getting in on the Akt." *Cell* **111**(3): 293-303.
- Cagnol, S. and J. C. Chambard (2010). "ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence." *Febs J* **277**(1): 2-21.
- Cai, Z. and G. L. Semenza (2005). "PTEN activity is modulated during ischemia and reperfusion: involvement in the induction and decay of preconditioning." *Circ Res* **97**(12): 1351-9.
- Cain, D. F. and R. E. Davies (1962). "Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle." *Biochem Biophys Res Commun* **8**: 361-6.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* **296**(5573): 1655-7.
- Chan, T. O., S. E. Rittenhouse, et al. (1999). "AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation." *Annu Rev Biochem* **68**: 965-1014.
- Chance, E. M., S. H. Seeholzer, et al. (1983). "Mathematical analysis of isotope labeling in the citric acid cycle with applications to 13C NMR studies in perfused rat hearts." *J Biol Chem* **258**(22): 13785-94.
- Chang, Y. Y., G. Juhasz, et al. (2009). "Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 1): 232-6.
- Chen, Z., C. C. Chua, et al. (2001). "Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(5): H2313-20.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* **127**(3): 469-80.
- Cohen, M. V., C. P. Baines, et al. (2000). "Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel." *Annu Rev Physiol* **62**: 79-109.
- Cohen, M. V. and J. M. Downey (2008). "Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection." *Basic Res Cardiol* **103**(3): 203-15.
- Cohen, M. V., X. M. Yang, et al. (2001). "Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels." *Circ Res* **89**(3): 273-8.
- Cohen, M. V., X. M. Yang, et al. (2010). "Cardioprotective PKG-independent NO signaling at reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- Conway, M. A., J. Allis, et al. (1991). "Detection of low phosphocreatine to ATP ratio in failing hypertrophied human myocardium by 31P magnetic resonance spectroscopy." *Lancet* **338**(8773): 973-6.
- Cope, D. K., W. K. Impastato, et al. (1997). "Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction." *Anesthesiology* **86**(3): 699-709.

- Costa, A. D. and K. D. Garlid (2008). "Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(2): H874-82.
- Costa, A. D., R. Jakob, 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**(30): 20801-8.
- Crisostomo, P. R., G. M. Wairiuko, et al. (2006). "Preconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials." *J Am Coll Surg* **202**(5): 797-812.
- Cuadrado, A. and A. R. Nebreda (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." *Biochem J* **429**(3): 403-17.
- Cui, X., H. Wang, et al. (2010). "Transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with diazoxide, a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener, promotes repair of myocardial infarction in rats." *Tohoku J Exp Med* **220**(2): 139-47.
- Curran, J., M. J. Hinton, et al. (2007). "Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase." *Circ Res* **100**(3): 391-8.
- Danielian, P. S. and A. P. McMahon (1996). "Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development." *Nature* **383**(6598): 332-4.
- de Moissac, D., R. M. Gurevich, et al. (2000). "Caspase activation and mitochondrial cytochrome C release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes." *J Mol Cell Cardiol* **32**(1): 53-63.
- Dejana, E. (2010). "The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis." *Circ Res* **107**(8): 943-52.
- Deschepper, C. F. (2005). "The many possible benefits of natriuretic peptides after myocardial infarction." *Hypertension* **46**(2): 271-2.
- Ding, V. W., R. H. Chen, et al. (2000). "Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling." *J Biol Chem* **275**(42): 32475-81.
- Doble, B. W. and J. R. Woodgett (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." *J Cell Sci* **116**(Pt 7): 1175-86.
- Dos Santos, P., A. J. Kowaltowski, et al. (2002). "Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel protects the ischemic heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(1): H284-95.
- Dos Santos, P., M. N. Laclau, et al. (2004). "Alterations of the bioenergetics systems of the cell in acute and chronic myocardial ischemia." *Mol Cell Biochem* **256-257**(1-2): 157-66.
- Dosenko, V. E., V. S. Nagibin, et al. (2006). "Protective effect of autophagy in anoxia-reoxygenation of isolated cardiomyocyte?" *Autophagy* **2**(4): 305-6.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* **82**(1): 47-95.
- Dufourcq, P., L. Leroux, et al. (2008). "Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation." *Am J Pathol* **172**(1): 37-49.
- Dunlop, E. A. and A. R. Tee (2009). "Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms." *Cell Signal* **21**(6): 827-35.
- Dunwoodie, S. L. (2009). "The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo." *Dev Cell* **17**(6): 755-73.
- Eisenberg, C. A. and L. M. Eisenberg (1999). "WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm." *Dev Dyn* **216**(1): 45-58.
- Elliott, S. (2008). "Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport." *Br J Pharmacol* **154**(3): 529-41.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). "Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity." *Nature* **421**(6924): 753-6.
- Ezan, J., L. Leroux, et al. (2004). "FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo." *Cardiovasc Res* **63**(4): 731-8.

- Fanto, M. and H. McNeill (2004). "Planar polarity from flies to vertebrates." *J Cell Sci* **117**(Pt 4): 527-33.
- Ferrari, S., W. Bannwarth, et al. (1992). "Activation of p70s6k is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Thr-Pro motifs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(15): 7282-6.
- Fischer, P. and D. Hilfiker-Kleiner (2007). "Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT axis." *Basic Res Cardiol* **102**(5): 393-411.
- Forbes, R. A., C. Steenbergen, et al. (2001). "Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism." *Circ Res* **88**(8): 802-9.
- Foster, F. M., C. J. Traer, et al. (2003). "The phosphoinositide (PI) 3-kinase family." *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3037-40.
- Frassdorf, J., R. Huhn, et al. (2010). "Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels." *Can J Anaesth* **57**(8): 767-73.
- Fruehauf, J. P. and F. L. Meyskens, Jr. (2007). "Reactive oxygen species: a breath of life or death?" *Clin Cancer Res* **13**(3): 789-94.
- Fuglestad, B. N., C. Tiron, et al. (2009). "Pretreatment with insulin before ischaemia reduces infarct size in Langendorff-perfused rat hearts." *Acta Physiol (Oxf)* **195**(2): 273-82.
- Gambassi, G., R. G. Hansford, et al. (1993). "Effects of acidosis on resting cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ in mammalian myocardium." *J Gen Physiol* **102**(3): 575-97.
- Gao, C., W. Cao, et al. (2010). "Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation." *Nat Cell Biol* **12**(8): 781-90.
- Gao, Q., Q. Xia, et al. (2004). "Role of the mitochondrial permeability transition pore in TNF-alpha-induced recovery of ventricular contraction and reduction of infarct size in isolated rat hearts subjected to ischemia/reperfusion." *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **5**: 3622-4.
- Garcia-Dorado, D. and H. M. Piper (2006). "Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation." *Cardiovasc Res* **69**(1): 1-3.
- Garlid, K. D., P. Dos Santos, et al. (2003). "Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection." *Biochim Biophys Acta* **1606**(1-3): 1-21.
- Garlid, K. D. and P. Paucek (2003). "Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle." *Biochim Biophys Acta* **1606**(1-3): 23-41.
- Gellerich, F. and V. A. Saks (1982). "Control of heart mitochondrial oxygen consumption by creatine kinase: the importance of enzyme localization." *Biochem Biophys Res Commun* **105**(4): 1473-81.
- Gho, B. C., R. G. Schoemaker, et al. (1996). "Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue." *Circulation* **94**(9): 2193-200.
- Gingras, A. C., S. G. Kennedy, et al. (1998). "4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway." *Genes Dev* **12**(4): 502-13.
- Gingras, A. C., B. Raught, et al. (2001). "Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1." *Genes Dev* **15**(21): 2852-64.
- Gingras, A. C., B. Raught, et al. (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." *Annu Rev Biochem* **68**: 913-63.
- Glick, D., S. Barth, et al. "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." *J Pathol* **221**(1): 3-12.
- Gnaiger, E., R. Steinlechner-Maran, et al. (1995). "Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen." *J Bioenerg Biomembr* **27**(6): 583-96.
- Gomez, L., B. Li, et al. (2009). "Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients." *Cardiovasc Res* **83**(2): 226-33.
- Goodman, M. D., S. E. Koch, et al. (2008). "Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning?" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(4): H1649-56.
- Granfeldt, A., D. J. Lefer, et al. (2009). "Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning." *Cardiovasc Res* **83**(2): 234-46.

- Gross, A., J. M. McDonnell, et al. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**(15): 1899-911.
- Gross, E. R., A. K. Hsu, et al. (2008). "Delayed cardioprotection afforded by the glycogen synthase kinase 3 inhibitor SB-216763 occurs via a KATP- and MPTP-dependent mechanism at reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(3): H1497-500.
- Gudbjarnason, S., P. Mathes, et al. (1970). "Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle." J Mol Cell Cardiol **1**(3): 325-39.
- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2009). "The pharmacology of mTOR inhibition." Sci Signal **2**(67): pe24.
- Guo, Y., A. B. Stein, et al. (2005). "Late preconditioning induced by NO donors, adenosine A1 receptor agonists, and delta1-opioid receptor agonists is mediated by iNOS." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(5): H2251-7.
- Gupta, S., T. Barrett, et al. (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." Embo J **15**(11): 2760-70.
- Halestrap, A. P., S. J. Clarke, et al. (2007). "The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning." Biochim Biophys Acta **1767**(8): 1007-31.
- Han, J. W., R. B. Pearson, et al. (1995). "Rapamycin, wortmannin, and the methylxanthine SQ20006 inactivate p70s6k by inducing dephosphorylation of the same subset of sites." J Biol Chem **270**(36): 21396-403.
- Hanada, M., J. Feng, et al. (2004). "Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 3-16.
- Hanlon, P. R., P. Fu, et al. (2005). "Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling." Faseb J **19**(10): 1323-5.
- Harada, H., J. S. Andersen, et al. (2001). "p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9666-70.
- Harwood, A. and V. M. Braga (2003). "Cdc42 & GSK-3: signals at the crossroads." Nat Cell Biol **5**(4): 275-7.
- Hausenloy, D. J. (2009). "Signalling pathways in ischaemic postconditioning." Thromb Haemost **101**(4): 626-34.
- Hausenloy, D. J., S. B. Ong, et al. (2009). "The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning." Basic Res Cardiol **104**(2): 189-202.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-45.
- Hayashi, M., T. Tsutamoto, et al. (2001). "Intravenous atrial natriuretic peptide prevents left ventricular remodeling in patients with first anterior acute myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **37**(7): 1820-6.
- Hernandez, F., E. Langa, et al. (2010). "Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A." Mol Cell Biochem **344**(1-2): 211-5.
- Heyndrickx, G. R., R. W. Millard, et al. (1975). "Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs." J Clin Invest **56**(4): 978-85.
- Ho, B. and M. P. Bendeck (2009). "Integrin linked kinase (ILK) expression and function in vascular smooth muscle cells." Cell Adh Migr **3**(2): 174-6.
- Holler, N., R. Zaru, et al. (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol **1**(6): 489-95.
- Holly, T. A., A. Drincic, et al. (1999). "Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo." J Mol Cell Cardiol **31**(9): 1709-15.
- Huang, F., J. Shan, et al. (2006). "Analysis of calstabin2 (FKBP12.6)-ryanodine receptor interactions: rescue of heart failure by calstabin2 in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3456-61.
- Huang, J. Q., S. Radinovic, et al. (2000). "In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor administered after the onset of ischemia." Eur J Pharmacol **402**(1-2): 139-42.

- Huang, P. L. (2009). "eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease." Trends Endocrinol Metab **20**(6): 295-302.
- Huelsken, J. and W. Birchmeier (2001). "New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates." Curr Opin Genet Dev **11**(5): 547-53.
- Iliodromitis, E. K., C. Gaitanaki, et al. (2002). "Dissociation of stress-activated protein kinase (p38-MAPK and JNKs) phosphorylation from the protective effect of preconditioning in vivo." J Mol Cell Cardiol **34**(8): 1019-28.
- Inoki, K., H. Ouyang, et al. (2005). "Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control." Microbiol Mol Biol Rev **69**(1): 79-100.
- Inoki, K., H. Ouyang, et al. (2006). "TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth." Cell **126**(5): 955-68.
- Inoue, I., H. Nagase, et al. (1991). "ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane." Nature **352**(6332): 244-7.
- Ivanov, F., G. Rioufol, et al. (2010). "Postconditioning in Acute Myocardial Infarction Patients." Antioxid Redox Signal.
- Jacobs, H., H. W. Heldt, et al. (1964). "High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase." Biochem Biophys Res Commun **16**(6): 516-21.
- Jacobus, W. E. and D. M. Diffley (1986). "Creatine kinase of heart mitochondria. Control of oxidative phosphorylation by the extramitochondrial concentrations of creatine and phosphocreatine." J Biol Chem **261**(35): 16579-83.
- Jaspard, B., T. Couffinhal, et al. (2000). "Expression pattern of mouse sFRP-1 and mWnt-8 gene during heart morphogenesis." Mech Dev **90**(2): 263-7.
- Javadov, S. and M. Karmazyn (2007). "Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection." Cell Physiol Biochem **20**(1-4): 1-22.
- Jennings, R. B., J. Schaper, et al. (1985). "Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure." Circ Res **56**(2): 262-78.
- Jennings, R. B., H. M. Sommers, et al. (1960). "Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog." Arch Pathol **70**: 68-78.
- Jeremias, I., C. Kupatt, et al. (2000). "Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia." Circulation **102**(8): 915-20.
- Jiang, Z. S., R. R. Padua, et al. (2002). "Acute protection of ischemic heart by FGF-2: involvement of FGF-2 receptors and protein kinase C." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(3): H1071-80.
- Jiang, Z. S., G. B. Wen, et al. (2009). "High molecular weight FGF-2 promotes postconditioning-like cardioprotection linked to activation of the protein kinase C isoforms Akt and p70 S6 kinase." Can J Physiol Pharmacol **87**(10): 798-804.
- Jones, S. E. and C. Jomary (2002). "Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns." Bioessays **24**(9): 811-20.
- Juhaszova, M., D. B. Zorov, et al. (2004). "Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore." J Clin Invest **113**(11): 1535-49.
- Kaiser, R. A., Q. Liang, et al. (2005). "Genetic inhibition or activation of JNK1/2 protects the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo." J Biol Chem **280**(38): 32602-8.
- Kang, M. H. and C. P. Reynolds (2009). "Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy." Clin Cancer Res **15**(4): 1126-32.
- Kaplan, P., M. Hendriks, et al. (1992). "Effect of ischemia and reperfusion on sarcoplasmic reticulum calcium uptake." Circ Res **71**(5): 1123-30.
- Kawasome, H., P. Papst, et al. (1998). "Targeted disruption of p70(s6k) defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5033-8.

- Ke, J. J., F. X. Yu, et al. (2010). "Adenosine postconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury though modulate production of TNF-alpha and prevents activation of transcription factor NF-kappaB." Mol Biol Rep.
- Kersten, J. R., K. G. Orth, et al. (1997). "Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection." Anesthesiology **86**(5): 1128-39.
- Kevin, L. G., A. K. Camara, et al. (2003). "Ischemic preconditioning alters real-time measure of O2 radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(2): H566-74.
- Kharbanda, R. K., T. T. Nielsen, et al. (2009). "Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice." Lancet **374**(9700): 1557-65.
- Khosravi Shahi, P. and I. Fernandez Pineda (2008). "Tumoral angiogenesis: review of the literature." Cancer Invest **26**(1): 104-8.
- Kim, L. and A. R. Kimmel (2006). "GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization." Curr Drug Targets **7**(11): 1411-9.
- Kim, M. Y., M. J. Kim, et al. (2006). "Diazoxide acts more as a PKC-epsilon activator, and indirectly activates the mitochondrial K(ATP) channel conferring cardioprotection against hypoxic injury." Br J Pharmacol **149**(8): 1059-70.
- Kimura, S., G. X. Zhang, et al. (2005). "Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II." Hypertension **45**(5): 860-6.
- Kis, A., D. M. Yellon, et al. (2003). "Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase." J Mol Cell Cardiol **35**(9): 1063-71.
- Kloner, R. A. and K. Przyklenk (1990). "Progress in cardioprotection: the role of calcium antagonists." Am J Cardiol **66**(18): 2H-9H.
- Kobayashi, K. and J. R. Neely (1979). "Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle." Circ Res **44**(2): 166-75.
- Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, et al. (2004). "The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore." Nature **427**(6973): 461-5.
- Koller, P. T. and S. R. Bergmann (1989). "Reduction of lipid peroxidation in reperfused isolated rabbit hearts by diltiazem." Circ Res **65**(3): 838-46.
- Kongkham, P. N., P. A. Northcott, et al. (2010). "The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma." Oncogene **29**(20): 3017-24.
- Korge, P., H. M. Honda, et al. (2002). "Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3312-7.
- Krause, S. M., W. E. Jacobus, et al. (1989). "Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium." Circ Res **65**(2): 526-30.
- Krolikowski, J. G., M. Bienengraeber, et al. (2005). "Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels." Anesth Analg **101**(6): 1590-6.
- Krolikowski, J. G., D. Weihrauch, et al. (2006). "Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo." Can J Anaesth **53**(2): 174-82.
- Ksenzenko, M., A. A. Konstantinov, et al. (1983). "Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain." FEBS Lett **155**(1): 19-24.
- Kudoh, S., I. Komuro, et al. (1997). "Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats." Circ Res **80**(1): 139-46.
- Kukreja, R. C., A. A. Kearns, et al. (1991). "Singlet oxygen interaction with Ca(2+)-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum." Circ Res **69**(4): 1003-14.

- Kurrelmeyer, K. M., L. H. Michael, et al. (2000). "Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5456-61.
- Kuznetsov, A. V., T. Tiivel, et al. (1996). "Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo." *Eur J Biochem* **241**(3): 909-15.
- Kuzuya, T., S. Hoshida, et al. (1993). "Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia." *Circ Res* **72**(6): 1293-9.
- Lacerda, L., S. Somers, et al. (2009). "Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway." *Cardiovasc Res* **84**(2): 201-8.
- Laclau, M. N., S. Boudina, et al. (2001). "Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase." *J Mol Cell Cardiol* **33**(5): 947-56.
- Lane, H. A., A. Fernandez, et al. (1993). "p70s6k function is essential for G1 progression." *Nature* **363**(6425): 170-2.
- Lang, S. C., A. Elsasser, et al. (2006). "Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a protective factor using proteomic methods?" *Basic Res Cardiol* **101**(2): 149-58.
- Langendorff, O. (1895). "Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen." *Pflügers Arch.* **61**: 291-332.
- Lee, P., M. Sata, et al. (2003). "Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(2): H456-63.
- Lee, T. M., M. S. Lin, et al. (2007). "Effects of pravastatin on ventricular remodeling by activation of myocardial KATP channels in infarcted rats: role of 70-kDa S6 kinase." *Basic Res Cardiol* **102**(2): 171-82.
- Lehnart, S. E. (2007). "Novel targets for treating heart and muscle disease: stabilizing ryanodine receptors and preventing intracellular calcium leak." *Curr Opin Pharmacol* **7**(2): 225-32.
- Lenaz, G. (2001). "The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology." *IUBMB Life* **52**(3-5): 159-64.
- Leroux, L., B. Descamps, et al. (2010). "Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway." *Mol Ther* **18**(8): 1545-52.
- Lesnefsky, E. J., T. J. Slabe, et al. (2001). "Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(6): H2770-8.
- Leung, P. S. (2004). "The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs." *Curr Protein Pept Sci* **5**(4): 267-73.
- Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." *Cell* **132**(1): 27-42.
- Li, H., A. Samouilov, et al. (2003). "Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues." *Biochemistry* **42**(4): 1150-9.
- Lilien, J. and J. Balsamo (2005). "The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin." *Curr Opin Cell Biol* **17**(5): 459-65.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 781-810.
- Lomonosova, E. and G. Chinnadurai (2008). "BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview." *Oncogene* **27 Suppl 1**: S2-19.
- Lopaschuk, G. D., C. A. Hansen, et al. (1986). "Fatty acid metabolism in hearts containing elevated levels of CoA." *Am J Physiol* **250**(3 Pt 2): H351-9.
- Lopez-Neblina, F., A. H. Toledo, et al. (2005). "Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion." *J Invest Surg* **18**(6): 335-50.
- Loschen, G., A. Azzi, et al. (1973). "Mitochondrial H₂O₂ formation: relationship with energy conservation." *FEBS Lett* **33**(1): 84-7.

- Lucchinetti, E., R. da Silva, et al. (2005). "Anaesthetic preconditioning but not postconditioning prevents early activation of the deleterious cardiac remodelling programme: evidence of opposing genomic responses in cardioprotection by pre- and postconditioning." Br J Anaesth **95**(2): 140-52.
- Ludwig, L. M., D. Weihrauch, et al. (2004). "Protein kinase C translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reactive oxygen species." Anesthesiology **100**(3): 532-9.
- Luo, J., J. Chen, et al. (2007). "Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?" Lab Invest **87**(2): 97-103.
- Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 307-18.
- Mackay, K. and D. Mochly-Rosen (1999). "An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia." J Biol Chem **274**(10): 6272-9.
- Marber, M. S., D. S. Latchman, et al. (1993). "Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction." Circulation **88**(3): 1264-72.
- Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, et al. (1999). "Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G." Mol Cell **3**(6): 707-16.
- Masini, E., E. Giannella, et al. (1987). "Histamine and lactate dehydrogenase (LDH) release in ischemic myocardium of the guinea-pig." Agents Actions **20**(3-4): 281-3.
- Matsui, Y., H. Takagi, et al. (2007). "Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy." Circ Res **100**(6): 914-22.
- Matsuyama, N., J. E. Leavens, et al. (2000). "Ischemic but not pharmacological preconditioning requires protein synthesis." Circulation **102**(19 Suppl 3): III312-8.
- McLennan, H. R. and M. Degli Esposti (2000). "The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species." J Bioenerg Biomembr **32**(2): 153-62.
- McMahon, A. and A. Bradley (1990). "The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain." Cell **62**(6): 1073-85.
- McManus, E. J., K. Sakamoto, et al. (2005). "Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis." Embo J **24**(8): 1571-83.
- Merla, R., I. N. Daher, et al. (2007). "Pretreatment with statins may reduce cardiovascular morbidity and mortality after elective surgery and percutaneous coronary intervention: clinical evidence and possible underlying mechanisms." Am Heart J **154**(2): 391-402.
- Mewton, N., P. Croisille, et al. (2010). "Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **55**(12): 1200-5.
- Miura, T. and T. Miki (2009). "GSK-3beta, a therapeutic target for cardiomyocyte protection." Circ J **73**(7): 1184-92.
- Miura, T. and M. Tanno (2010). "Mitochondria and GSK-3beta in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury." Cardiovasc Drugs Ther **24**(3): 255-63.
- Miura, T., M. Tanno, et al. (2010). "Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis." Cardiovasc Res **88**(1): 7-15.
- Miyamoto, S., A. N. Murphy, et al. (2008). "Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II." Cell Death Differ **15**(3): 521-9.
- Miyawaki, T., T. Mashiko, et al. (2008). "Ischemic preconditioning blocks BAD translocation, Bcl-xL cleavage, and large channel activity in mitochondria of postischemic hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(12): 4892-7.
- Mora, A., A. M. Davies, et al. (2003). "Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia." Embo J **22**(18): 4666-76.

- Murphy, E. and C. Steenbergen (2008). "Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury." *Physiol Rev* **88**(2): 581-609.
- Murphy, L. O. and J. Blenis (2006). "MAPK signal specificity: the right place at the right time." *Trends Biochem Sci* **31**(5): 268-75.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1997). "Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study." *Lancet* **349**(9064): 1498-504.
- Murry, C. E., R. B. Jennings, et al. (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* **74**(5): 1124-36.
- Musioliik, J., P. van Caster, et al. "Reduction of infarct size by gentle reperfusion without activation of reperfusion injury salvage kinases in pigs." *Cardiovasc Res* **85**(1): 110-7.
- Musioliik, J., P. van Caster, et al. (2010). "Reduction of infarct size by gentle reperfusion without activation of reperfusion injury salvage kinases in pigs." *Cardiovasc Res* **85**(1): 110-7.
- Mykytenko, J., J. G. Reeves, et al. (2008). "Persistent beneficial effect of preconditioning against infarct size: role of mitochondrial K(ATP) channels during reperfusion." *Basic Res Cardiol* **103**(5): 472-84.
- Nakano, A., C. P. Baines, et al. (2000). "Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK." *Circ Res* **86**(2): 144-51.
- Nazareth, W., N. Yafei, et al. (1991). "Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A." *J Mol Cell Cardiol* **23**(12): 1351-4.
- Neely, J. R., H. Liebermeister, et al. (1967). "Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart." *Am J Physiol* **212**(4): 804-14.
- Neely, J. R. and H. E. Morgan (1974). "Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle." *Annu Rev Physiol* **36**: 413-59.
- Netticadan, T., R. M. Temsah, et al. (2000). "Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase is altered in heart failure." *Circ Res* **86**(5): 596-605.
- Neubauer, S., B. L. Hamman, et al. (1988). "Velocity of the creatine kinase reaction decreases in postischemic myocardium: a 31P-NMR magnetization transfer study of the isolated ferret heart." *Circ Res* **63**(1): 1-15.
- Newton, A. C. (1995). "Protein kinase C: structure, function, and regulation." *J Biol Chem* **270**(48): 28495-8.
- Niccoli, G., M. Marino, et al. (2010). "Prevention and treatment of no-reflow." *Acute Card Care* **12**(3): 81-91.
- Nishihara, M., T. Miura, et al. (2007). "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection." *J Mol Cell Cardiol* **43**(5): 564-70.
- Nishino, Y., I. G. Webb, et al. (2008). "Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse." *Circ Res* **103**(3): 307-14.
- Novalija, E., L. G. Kevin, et al. (2003). "Reactive oxygen species precede the epsilon isoform of protein kinase C in the anesthetic preconditioning signaling cascade." *Anesthesiology* **99**(2): 421-8.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1992). "Wnt genes." *Cell* **69**(7): 1073-87.
- Okawa, H., H. Horimoto, et al. (2003). "Preischemic infusion of alpha-human atrial natriuretic peptide elicits myoprotective effects against ischemia reperfusion in isolated rat hearts." *Mol Cell Biochem* **248**(1-2): 171-7.
- Opie, L. H. (1968). "Metabolism of the heart in health and disease. I." *Am Heart J* **76**(5): 685-98.
- Opie, L. H. (1969). "Metabolism of the heart in health and disease. II." *Am Heart J* **77**(1): 100-22 contd.
- Opie, L. H. (1969). "Metabolism of the heart in health and disease. III." *Am Heart J* **77**(3): 383-410.
- Opie, L. H. (1991). "Postischemic stunning--the case for calcium as the ultimate culprit." *Cardiovasc Drugs Ther* **5**(5): 895-9.
- Oudit, G. Y. and J. M. Penninger (2009). "Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN." *Cardiovasc Res*.
- Pagel, P. S. (2008). "Postconditioning by volatile anesthetics: salvaging ischemic myocardium at reperfusion by activation of prosurvival signaling." *J Cardiothorac Vasc Anesth* **22**(5): 753-65.

- Pagel, P. S. (2009). "Cardioprotection by volatile anesthetics: established scientific principle or lingering clinical uncertainty?" *J Cardiothorac Vasc Anesth* **23**(5): 589-93.
- Paige, S. L., T. Osugi, et al. (2010). "Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells." *PLoS One* **5**(6): e11134.
- Paillard, M., L. Gomez, et al. (2009). "Postconditioning inhibits mPTP opening independent of oxidative phosphorylation and membrane potential." *J Mol Cell Cardiol* **46**(6): 902-9.
- Pain, T., X. M. Yang, et al. (2000). "Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals." *Circ Res* **87**(6): 460-6.
- Park, H. S., J. W. Yu, et al. (2004). "Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 by nitric oxide through a thiol redox mechanism." *J Biol Chem* **279**(9): 7584-90.
- Pasdois, P., B. Beauvoit, et al. (2007). "Sarcoplasmic ATP-sensitive potassium channel blocker HMR1098 protects the ischemic heart: implication of calcium, complex I, reactive oxygen species and mitochondrial ATP-sensitive potassium channel." *J Mol Cell Cardiol* **42**(3): 631-42.
- Pasdois, P., B. Beauvoit, et al. (2008). "Effect of diazoxide on flavoprotein oxidation and reactive oxygen species generation during ischemia-reperfusion: a study on Langendorff-perfused rat hearts using optic fibers." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(5): H2088-97.
- Pasdois, P., C. L. Quinlan, et al. (2007). "Ouabain protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via pathway involving src kinase, mitoKATP, and ROS." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(3): H1470-8.
- Peart, J. and J. P. Headrick (2003). "Adenosine-mediated early preconditioning in mouse: protective signaling and concentration dependent effects." *Cardiovasc Res* **58**(3): 589-601.
- Peifer, M. and P. Polakis (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nudeus." *Science* **287**(5458): 1606-9.
- Penna, C., D. Mancardi, et al. (2007). "Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling." *Cardiovasc Res* **75**(1): 168-77.
- Penna, C., D. Mancardi, et al. (2009). "Intermittent adenosine at the beginning of reperfusion does not trigger cardioprotection." *J Surg Res* **153**(2): 231-8.
- Penna, C., R. Rastaldo, 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**(2): 180-9.
- Petrosillo, G., F. M. Ruggiero, et al. (2003). "Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin." *Faseb J* **17**(6): 714-6.
- Ping, P., H. Takano, et al. (1999). "Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning." *Circ Res* **84**(5): 587-604.
- Ping, P., J. Zhang, et al. (1999). "PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits." *Am J Physiol* **276**(5 Pt 2): H1468-81.
- Piot, C., P. Croisille, et al. (2008). "Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction." *N Engl J Med* **359**(5): 473-81.
- Piot, C. A., D. Padmanaban, et al. (1997). "Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo." *Circulation* **96**(5): 1598-604.
- Pison, C. (2002). "Broncho-pneumopathie chronique obstructive." *Corpus Médical – Faculté de Médecine de Grenoble*.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." *Genes Dev* **14**(15): 1837-51.
- Polimeni, P. I. and S. I. Buraczewski (1988). "Expansion of extracellular tracer spaces in the isolated heart perfused with crystalloid solutions: expansion of extracellular space, trans-sarcolemmal leakage, or both?" *J Mol Cell Cardiol* **20**(1): 15-22.
- Przyklenk, K., B. Bauer, et al. (1993). "Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion." *Circulation* **87**(3): 893-9.

- Przyklenk, K., M. Maynard, et al. (2008). "Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning." *J Am Coll Cardiol* **51**(14): 1393-8.
- Qin, S. and P. B. Chock (2003). "Implication of phosphatidylinositol 3-kinase membrane recruitment in hydrogen peroxide-induced activation of PI3K and Akt." *Biochemistry* **42**(10): 2995-3003.
- Ramos, J. W. (2008). "The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(12): 2707-19.
- Rattner, A., J. C. Hsieh, et al. (1997). "A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 2859-63.
- Richter, J. D. and N. Sonenberg (2005). "Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins." *Nature* **433**(7025): 477-80.
- Rosner, M., C. Fuchs, et al. (2009). "Functional interaction of mammalian target of rapamycin complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle." *Hum Mol Genet* **18**(17): 3298-310.
- Sacewicz, I., M. Wiktorska, et al. (2009). "[Mechanisms of cancer angiogenesis]." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **63**: 159-68.
- Saks, V. A., N. V. Lipina, et al. (1977). "The localization of the MM isozyme of creatine phosphokinase on the surface membrane of myocardial cells and its functional coupling to ouabain-inhibited (Na⁺, K⁺)-ATPase." *Biochim Biophys Acta* **465**(3): 550-8.
- Saks, V. A., V. I. Veksler, et al. (1998). "Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo." *Mol Cell Biochem* **184**(1-2): 81-100.
- Saks, V. A., R. Ventura-Clapier, et al. (1996). "Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells." *Biochim Biophys Acta* **1274**(3): 81-8.
- Sanada, S. and M. Kitakaze (2004). "Ischemic preconditioning: emerging evidence, controversy, and translational trials." *Int J Cardiol* **97**(2): 263-76.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, et al. (2004). "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton." *Curr Biol* **14**(14): 1296-302.
- Sato, M., G. A. Cordis, et al. (2000). "SAPKs regulation of ischemic preconditioning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**(3): H901-7.
- Saurin, A. T., J. L. Martin, et al. (2000). "The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes." *Faseb J* **14**(14): 2237-46.
- Scalia, R., M. E. Gooszen, et al. (2001). "Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice." *Circulation* **103**(21): 2598-603.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." *Mol Cell Biol* **19**(4): 2435-44.
- Schieke, S. M., D. Phillips, et al. (2006). "The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity." *J Biol Chem* **281**(37): 27643-52.
- Schlessinger, K., E. J. McManus, et al. (2007). "Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity." *J Cell Biol* **178**(3): 355-61.
- Schneider, S., W. Chen, et al. (2001). "Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(2): H499-508.
- Schulman, D., D. S. Latchman, et al. (2002). "Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(4): H1481-8.
- Schumann, H., J. Holtz, et al. (2000). "Expression of secreted frizzled related proteins 3 and 4 in human ventricular myocardium correlates with apoptosis related gene expression." *Cardiovasc Res* **45**(3): 720-8.
- Scott, R. C., O. Schuldiner, et al. (2004). "Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body." *Dev Cell* **7**(2): 167-78.

- Shahbazian, D., P. P. Roux, et al. (2006). "The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity." *Embo J* **25**(12): 2781-91.
- Shannon, T. R., S. M. Pogwizd, et al. (2003). "Elevated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure." *Circ Res* **93**(7): 592-4.
- Sharma, A. and M. Singh (2000). "Possible mechanism of cardioprotective effect of angiotensin preconditioning in isolated rat heart." *Eur J Pharmacol* **406**(1): 85-92.
- Sharov, V. G., V. A. Saks, et al. (1977). "An electron microscopic histochemical investigation of the localization of creatine phosphokinase in heart cells." *Biochim Biophys Acta* **468**(3): 495-501.
- Shen, W. H., Z. Chen, et al. (2008). "Cardiac restricted overexpression of kinase-dead mammalian target of rapamycin (mTOR) mutant impairs the mTOR-mediated signaling and cardiac function." *J Biol Chem* **283**(20): 13842-9.
- Sheng, Z., K. Knowlton, et al. (1997). "Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy." *J Biol Chem* **272**(9): 5783-91.
- Shima, H., M. Pende, et al. (1998). "Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase." *Embo J* **17**(22): 6649-59.
- Si, R., L. Tao, et al. (2010). "Survivin: A novel player in insulin cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury." *J Mol Cell Cardiol*.
- Skyschally, A., P. van Caster, et al. (2009). "Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation." *Circ Res* **104**(1): 15-8.
- Skyschally, A., P. van Caster, et al. (2009). "Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms." *Basic Res Cardiol* **104**(5): 469-83.
- Snyder, M., X. Y. Huang, et al. (2008). "Identification of novel direct Stat3 target genes for control of growth and differentiation." *J Biol Chem* **283**(7): 3791-8.
- Solaini, G. and D. A. Harris (2005). "Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion." *Biochem J* **390**(Pt 2): 377-94.
- Soliman, G. A., H. A. Acosta-Jaquez, et al. (2010). "mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action." *J Biol Chem* **285**(11): 7866-79.
- Staat, P., G. Rioufol, et al. (2005). "Postconditioning the human heart." *Circulation* **112**(14): 2143-8.
- Steenbergen, C. (2002). "The role of p38 mitogen-activated protein kinase in myocardial ischemia/reperfusion injury; relationship to ischemic preconditioning." *Basic Res Cardiol* **97**(4): 276-85.
- Steenbergen, C., M. L. Hill, et al. (1985). "Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity." *Circ Res* **57**(6): 864-75.
- Stoka, V., V. Turk, et al. (2006). "Differential regulation of the intrinsic pathway of apoptosis in brain and liver during ageing." *FEBS Lett* **580**(15): 3739-45.
- Stowe, D. F. and A. K. Camara (2009). "Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function." *Antioxid Redox Signal* **11**(6): 1373-414.
- Sun, J., E. Picht, et al. (2006). "Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca²⁺ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury." *Circ Res* **98**(3): 403-11.
- Suzuki, H., D. N. Watkins, et al. (2004). "Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer." *Nat Genet* **36**(4): 417-22.
- Syntichaki, P., K. Xu, et al. (2002). "Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*." *Nature* **419**(6910): 939-44.
- Takagi, H., Y. Matsui, et al. (2007). "AMPK mediates autophagy during myocardial ischemia in vivo." *Autophagy* **3**(4): 405-7.
- Takagi, H., Y. Matsui, et al. (2007). "The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart." *Antioxid Redox Signal* **9**(9): 1373-81.

- Tamareille, S., N. Ghaboura, et al. (2009). "Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(6): H2035-43.
- Tani, M. and J. R. Neely (1989). "Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange." *Circ Res* **65**(4): 1045-56.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(6): L1005-28.
- Toller, W. G., M. W. Montgomery, et al. (1999). "Isoflurane-enhanced recovery of canine stunned myocardium: role for protein kinase C?" *Anesthesiology* **91**(3): 713-22.
- Tolwinski, N. S. and E. Wieschaus (2004). "Rethinking WNT signaling." *Trends Genet* **20**(4): 177-81.
- Tong, H., W. Chen, et al. (2000). "Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C." *Circ Res* **87**(4): 309-15.
- Tong, H., K. Imahashi, et al. (2002). "Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective." *Circ Res* **90**(4): 377-9.
- Turrens, J. F. and A. Boveris (1980). "Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria." *Biochem J* **191**(2): 421-7.
- Uchiyama, T., R. M. Engelman, et al. (2004). "Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning." *Circulation* **109**(24): 3042-9.
- Umar, S. and A. van der Laarse (2010). "Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart." *Mol Cell Biochem* **333**(1-2): 191-201.
- van der Vusse, G. J., J. F. Glatz, et al. (1992). "Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart." *Physiol Rev* **72**(4): 881-940.
- van Montfort, R. L., M. Congreve, et al. (2003). "Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B." *Nature* **423**(6941): 773-7.
- van Vuuren, D. and A. Lochner (2008). "Ischaemic postconditioning: from bench to bedside." *Cardiovasc J Afr* **19**(6): 311-20.
- Vandeplassche, G., C. Hermans, et al. (1991). "Stunned myocardium has increased mitochondrial NADH oxidase and ATPase activities." *Cardioscience* **2**(1): 47-53.
- Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, et al. (2001). "Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids." *Annu Rev Biochem* **70**: 535-602.
- Vilella-Bach, M., P. Nuzzi, et al. (1999). "The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression." *J Biol Chem* **274**(7): 4266-72.
- Vinten-Johansen, J., D. M. Yellon, et al. (2005). "Postconditioning: a simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction." *Circulation* **112**(14): 2085-8.
- Wagner, C., D. Tillack, et al. (2010). "Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis." *Mol Cell Biochem* **339**(1-2): 135-47.
- Wang, R., P. Cherukuri, et al. (2005). "Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation." *J Biol Chem* **280**(12): 11528-34.
- Wang, Y. and P. A. Marsden (1995). "Nitric oxide synthases: gene structure and regulation." *Adv Pharmacol* **34**: 71-90.
- Weihrauch, D., J. G. Krolikowski, et al. (2005). "Morphine enhances isoflurane-induced postconditioning against myocardial infarction: the role of phosphatidylinositol-3-kinase and opioid receptors in rabbits." *Anesth Analg* **101**(4): 942-9, table of contents.
- Weinbrenner, C., G. S. Liu, et al. (1997). "Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart." *J Mol Cell Cardiol* **29**(9): 2383-91.

- Weiss, R. G., V. P. Chacko, et al. (1989). "Fatty acid regulation of glucose metabolism in the intact beating rat heart assessed by carbon-13 NMR spectroscopy: the critical role of pyruvate dehydrogenase." *J Mol Cell Cardiol* **21**(5): 469-78.
- West, M. B., G. Rokosh, et al. (2008). "Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition." *Circulation* **118**(19): 1970-8.
- Whelan, R. S., V. Kaplinskiy, et al. (2010). "Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance." *Annu Rev Physiol* **72**: 19-44.
- Williams, M. R., J. S. Arthur, et al. (2000). "The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells." *Curr Biol* **10**(8): 439-48.
- Wong, R., A. M. Aponte, et al. (2010). "Cardioprotection leads to novel changes in the mitochondrial proteome." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(1): H75-91.
- Woodgett, J. R. (1990). "Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A." *Embo J* **9**(8): 2431-8.
- Wu, R., M. A. Laplante, et al. (2004). "Prevention of angiotensin II-induced hypertension, cardiovascular hypertrophy and oxidative stress by acetylsalicylic acid in rats." *J Hypertens* **22**(4): 793-801.
- Wymann, M. P., M. Zvelebil, et al. (2003). "Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target?" *Trends Pharmacol Sci* **24**(7): 366-76.
- Xu, C., N. G. Kim, et al. (2009). "Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation." *Cell Cycle* **8**(24): 4032-9.
- Yamamura, T., H. Otani, et al. (2001). "IGF-I differentially regulates Bcl-xL and Bax and confers myocardial protection in the rat heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(3): H1191-200.
- Yan, L., J. Sadoshima, et al. (2006). "Autophagy: a novel protective mechanism in chronic ischemia." *Cell Cycle* **5**(11): 1175-7.
- Yan, L., D. E. Vatner, et al. (2005). "Autophagy in chronically ischemic myocardium." *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(39): 13807-12.
- Yellon, D. M., A. M. Alkhulaifi, et al. (1993). "Preconditioning the human myocardium." *Lancet* **342**(8866): 276-7.
- Yellon, D. M. and D. J. Hausenloy (2007). "Myocardial reperfusion injury." *N Engl J Med* **357**(11): 1121-35.
- Yoshida, H., Y. Kusama, et al. (2005). "Pharmacological preconditioning with bradykinin affords myocardial protection through NO-dependent mechanisms." *Int Heart J* **46**(5): 877-87.
- Yu, L. N., J. Yu, et al. (2010). "Sevoflurane postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in rat isolated hearts via activation of PI3K/Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins." *J Zhejiang Univ Sci B* **11**(9): 661-72.
- Zhang, D., R. Contu, et al. (2010). "MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice." *J Clin Invest* **120**(8): 2805-16.
- Zhang, L., L. Yu, et al. (1998). "Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria." *J Biol Chem* **273**(51): 33972-6.
- Zhao, Z. Q., J. S. Corvera, et al. (2003). "Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**(2): H579-88.
- Zhu, M., J. Feng, et al. (2006). "Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway." *Cardiovasc Res* **72**(1): 152-62.
- Zimmer, H. G. (1998). "The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers." *News Physiol Sci* **13**: 203-210.
- Zweier, J. L. and M. A. Talukder (2006). "The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury." *Cardiovasc Res* **70**(2): 181-90.