

Université de Montréal

**Rôle des acides gras polyinsaturés essentiels dans
l'infarctus du myocarde**

par
Kim Gilbert

Département de pharmacologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en pharmacologie

mai, 2015

© Kim Gilbert, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Rôle des acides gras polyinsaturés essentiels dans
l'infarctus du myocarde**

Présentée par :

Kim Gilbert

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Hélène Girouard, Ph. D., président-rapporteur

Guy Rousseau, Ph. D., directeur de recherche

Réjean Couture, Ph. D., membre du jury

Frédéric Calon, Ph.D., examinateur externe

Angelo Calderone, Ph. D., représentant du doyen de la F.E.S.

Résumé

Les maladies cardiovasculaires représentent la deuxième cause de mortalité en Amérique du Nord. Ceci peut s'expliquer par la consommation riche en gras des Nord-Américains et par un apport élevé en oméga-6. Inversement, des populations qui ont un apport moindre en oméga-6 et plus riche en oméga-3, telles que les Japonais et les Inuits, ont une incidence peu élevée de maladies cardiovasculaires.

Les oméga-3 s'avèrent effectivement bénéfiques pour prévenir l'apparition de maladies cardiovasculaires. Dans le cadre d'un infarctus du myocarde, les oméga-3 sont bénéfiques en prévention secondaire et s'avèrent cardioprotecteurs lorsque consommés avant l'épisode d'infarctus. De manière à utiliser les oméga-3 de façon plus clinique, le but de la première étude était de vérifier si un métabolite des oméga-3 impliqué dans la résolution de l'inflammation, la résolvine D1, pouvait s'avérer cardioprotecteur lorsque donné au moment de l'infarctus. Effectivement, la résolvine D1, donnée juste avant l'ischémie, s'avère cardioprotectrice en entraînant une diminution de l'inflammation, soit en favorisant la résolution de l'inflammation, et en activant une voie de cardioprotection qui entraîne la survie cellulaire.

Par ailleurs, étant donné que la diète de la population canadienne est riche en oméga-6, l'objectif de la deuxième étude était de vérifier si l'effet de la résolvine D1 est conservé en présence d'un oméga-6, l'acide linoléique. Nos résultats nous indiquent que la résolvine D1 perd son effet cardioprotecteur en présence de l'acide linoléique. Celle-ci semble aggraver les lésions ischémiques, possiblement, par, la génération de métabolites pro-inflammatoires et vasoconstricteurs qui accroît les effets de l'ischémie. Ainsi, il est essentiel de tenir compte de l'apport en oméga-6 pour envisager un traitement à la résolvine D1 et d'encourager une diminution des oméga-6 dans l'alimentation au profit des oméga-3.

Enfin, la troisième étude de cette thèse visait à vérifier le mécanisme de cardioprotection des oméga-3 afin de savoir si ce sont les métabolites issus des oméga-3 qui génèrent la cardioprotection. L'utilisation des inhibiteurs du métabolisme des oméga-3, soit la 15-lipoxygénase et la cyclo-oxygénase 2, inhibe la cardioprotection conférée par une diète

riche en oméga-3. De plus, les inhibiteurs diminuent les concentrations de résolvine D1 plasmatique. Puis, la résolvine D1, donnée en présence des inhibiteurs, restaure la cardioprotection. De ce fait, les métabolites générés par les oméga-3, dont la résolvine D1, sont importants dans l'effet cardioprotecteur des acides gras oméga-3.

En conclusion, la résolvine D1 peut s'avérer une option intéressante pour bénéficier des effets des oméga-3 lorsque celle-ci est donnée au moment de l'infarctus. D'ailleurs, les métabolites, tels que la résolvine D1, sont essentiels pour obtenir la cardioprotection avec les oméga-3. Toutefois, l'alimentation des patients doit contenir moins d'oméga-6 afin de bénéficier des aspects cardioprotecteurs des oméga-3. Les oméga-6 sont trop proéminents dans l'alimentation nord-américaine, ce qui est néfaste pour le système cardiovasculaire.

Mots-clés : Oméga-3, Oméga-6, Résolvine D1, Infarctus du Myocarde

Abstract

Cardiovascular diseases are the second most common cause of death in North America. This may be explained by the increase in the consumption of fat, especially in omega-6 polyunsaturated fatty acid, in the last decade. Contrariwise, Inuits and Japanese have a diet rich in omega-3 polyunsaturated fatty acid associated with a low risk of cardiovascular diseases. Omega-3 are beneficial in myocardial infarction, they prevent incidence of secondary infarction and are cardioprotective when consumed before myocardial infarction. The aim of the first study is to use a metabolite of omega-3, resolvin D1, which is implicated in the resolution of inflammation, at the time of myocardial infarction thus in a more clinical context. Indeed, resolvin D1 showed cardioprotection when given just before ischemia by decreasing inflammation and by activating a cardioprotective pathway.

Afterwards, the aim of the second study was to determine if omega-6 could prevent the beneficial effect of resolvin D1, given the high intake of omega-6 in North America. Hence, linoleic acid was given at the same time as resolvin D1 just before ischemia. Resolvin D1 lost its cardioprotective effects when given with linoleic acid. Linoleic acid seems to worsen ischemic lesions by generating pro-inflammatory and vasoconstrictors metabolites, which enhance the effect of ischemia. Thus, it is essential to consider omega-6 intake in patients before using resolvin D1 as a therapeutic option, and to encourage patients to decrease omega-6 consumption while increasing omega-3.

Finally, the aim of the third study was to demonstrate the mechanism of cardioprotection conferred by omega-3, and more specifically by its metabolites. The use of the 15-lipoxygenase and the cyclooxygenase-2 inhibitors inhibited cardioprotection conferred by a diet rich in omega-3. Inhibitors decreased resolvin D1 plasmatic concentration. When resolvin D1 is given with the inhibitors, the cardioprotection is restored. Metabolites issued from omega-3, such as resolvin D1, are essential to show a cardioprotection and a decrease in infarct size.

To conclude, resolvin D1 could be an interesting option to benefit from the effect of omega-3 given to the time of myocardial infarction. Although metabolites of omega-3 are

essential for cardioprotection, it seems that they are source of cardioprotection produced by omega-3. However, omega-6 are highly present in diets, consequently they need to be diminished in order to be able to benefit from omega-3 cardioprotection effect.

Keywords : Omega-3, Omega-6, Resolvin D1, Myocardial Infarction

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xv
Remerciements.....	xx
Introduction.....	21
Chapitre 1. Infarctus du myocarde.....	22
1.1 Ischémie	24
1.1.1 Conséquences biochimiques et cellulaires de l'ischémie	25
1.1.2 Facteurs influençant la sévérité de l'ischémie.....	28
1.2 Reperfusion.....	28
1.2.1 Lésions de reperfusion	29
1.3 Cardioprotection.....	50
1.3.1 Voie de la "Reperfusion Injury Kinase Signalling" (RISK)	51
1.3.2 Voie de la "Survivor Activating Factor Enhancement" (SAFE).....	57
1.3.3 Lien entre la voie RISK et SAFE	58
Chapitre 2. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 et oméga-6.....	60
2.1 Structure et nomenclature	61
2.2 Métabolisme des oméga-3 et oméga-6	63
2.2.1 Voie des prostaglandines et thromboxanes	65
2.2.2 Voie des leucotriènes	71
2.2.3 Métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation	76
2.3 Ratio oméga-3/oméga-6.....	86
2.4 Propriétés des Oméga-3 et Oméga-6.....	93

2.4.1 Maladies cardiovasculaires	95
Chapitre 3. Hypothèses.....	102
Chapitre 4. Méthodologie	103
Chapitre 5. Contribution des auteurs.....	106
Chapitre 6. Premier article: Resolvin D1 reduces infarct size through a phosphoinositide 3-kinase /protein kinase B mechanism.....	107
6.1 Publication	107
Chapitre 7. Deuxième article: Linoleic acid attenuates cardio-protection induced by resolvin D1	136
7.1 Publication	136
Chapitre 8. Troisième article: Metabolites derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids are important for cardioprotection	160
8.1 Publication	160
Chapitre 9. Discussion Générale.....	188
9.1 Traitement cardioprotecteur prometteur	188
9.1.1 Mécanismes impliqués dans la cardioprotection conférée par les oméga-3 et la RvD1	193
9.2 Divergence des études sur l'effet des oméga-3	195
9.3 Effets des ω -3 et de la RvD1 sur les complications reliées à l'IM	201
Conclusion générale	202
Bibliographie	204

Liste des tableaux

Tableaux des articles:

Article 1:

Table I. Weights and hemodynamic parameters in protocol 1 126

Article 2:

Table I. Body weight and hemodynamic data. *indicates $p < 0.05$ compared to baseline data. Values are means+SEM. RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid, HR=heart rate (beats/min), MAP=mean arterial pressure (mm Hg), PRP = $HR * MAP / 100$ 152

Article 3:

Table I. Body weight gain in the different groups in protocols 1, 2 and 3..... 177

Liste des figures

Figures de la thèse :

Chapitre 1:

Figure 1. **Stress oxydatif.** L'oxygène (O_2) qui accepte un électron forme l'anion superoxyde (O_2^-). L'anion superoxide et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) conduisent à la formation du radical hydroxyle (OH^-) qui est grandement toxique en causant des dommages cellulaires sur les lipides, l'ADN et les protéines. Les radicaux libres sont neutralisés par les antioxydants en eau (H_2O) [68].....35

Figure 2. **Activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.** L'activation de la voie intrinsèque (encadré à gauche) implique la relâche du cytochrome c de la mitochondrie qui vient activer Apaf-1, la caspase-9, initiateur de l'apoptose et ainsi former l'apoptosome avec l'ATP. Puis la caspase-3, effectrice de l'apoptose. Le tout est régulé par les protéines de la famille BCL et les facteurs AIF, l'endonucléase g, Omi et Smac encourageant l'apoptose, tandis que IAP vient l'inhiber. La voie extrinsèque (encadré à droite) s'active par la signalisation d'un récepteur de mort cellulaire lors de la liaison de son ligand (TNF est cité comme exemple), il y aura activation de la caspase-8 via un facteur FADD, puis de la caspase-3 ou encore par Bid qui engendra l'apoptose par le sentier mitochondrial.48

Figure 3. **Activation de la voie RISK.** L'activation des récepteurs tyrosine kinase et des récepteurs couplés aux protéines G vont activer les kinases Akt et Erk1/2 pour encourager la survie cellulaire via différents effecteurs : la synthèse du monoxyde d'azote (eNOS), la protéine kinase G (PKG), la protéine kinase C (PKC), le canal potassique sensible à l'ATP (KATP) et la "glycogen synthase kinase 3 beta" (GSK3 β) qui vont inhiber l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) et ainsi inhiber l'apoptose [172].54

Chapitre 2:

Figure 4. **Structure et nomenclature des AG alpha-linolénique (ALA) et linoléique (LA).** La première liaison double rencontrée à partir du carbone en méthyle terminale détermine le type d'AG oméga.62

Figure 5. **Métabolisme des oméga-3 et oméga-6.** L'acide linoléique (LA) et l'acide alpha-linolénique (ALA) acquis par la diète sont métabolisés en différents acide gras oméga-3 (ω -3)

et oméga-6 (ω -6) par les désaturases et élongases pour aboutir à l'acide arachidonique (AA), à l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et à l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui seront incorporés aux membranes cellulaires. L'acide gamma-linolénique (GLA), l'AA, l'EPA et le DHA peuvent aussi être directement consommés à travers l'alimentation [242].64

Figure 6. **Synthèse des prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes à partir des AG essentiels ω -6 (AA) et ω -3 (EPA).** Les AG AA et EPA sont relâchés des membranes par les phospholipases (PLA2) activées par différents stimuli. Puis, les cyclo-oxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2) conduisent à la formation de l'intermédiaire PGH. Les différentes synthèses conduisent à la production des prostaglandines de série 2 pour l'AA et 3 pour l'EPA (PG). Ces dernières iront lier leurs récepteurs respectifs pour induire leur réponse (TP, IP, DP, FP, EP et PPAR). Au niveau des leucotriènes (LT), la 5-lipoxygénase (5-LOX) génère les intermédiaires 5-HPETE et 5-HPEPE pour aboutir à la formation des leucotriènes de série 4 pour l'AA et de série 5 pour l'EPA. Celles-ci iront lier les récepteur des leucotriènes (B-LTR) et ceux de type cystényl leucotriène (CysLTR) ainsi que le GPR17 [249]...... 74

Figure 7. **Mécanismes d'action des résolvines sur les différents types cellulaires.** Les résolvines agissent sur les cellules endothéliales, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages afin d'induire différentes réponses cellulaires dans le but d'encourager la résolution de l'inflammation. Les résolvines activent aussi la voie PI3K/Akt et la voie Erk1/2, toutefois les tissus et types cellulaires cibles restent à valider {Spite, 2010 #1014}..... 84

Figure 8. **Métabolites provenant du DHA et impliqués dans la résolution de l'inflammation.** La 15-lipoxygénase (15-LOX) aboutit à la formation des résolvines (RvD1 à 5) et aux protectines (PD1 et NPD1). La cyclo-oxygénase 2 (COX-2) acétylée par l'aspirine conduit à la formation de la série 17R de résolvine (17R-AT-RvD1-4) et aux protectines (AT-PD1 et AT-NPD1). Les 12 et 15 lipoxygénases aboutissent de plus à la formation des marésines (MaR1) [286]...... 86

Figures des articles :

Article 1:

Figure 1. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion. 128

Values are means \pm SEM (7-8 rats per group). RvD1=Resolvin D1. 128

*indicates significant difference between the experimental group and the vehicle group; p<0.05..... 128

Figure 2 Left. Caspase-3 activity expressed in the heart as the percentage of the mean activity observed in the vehicle group and at 100%, was assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (7-8 rats per group). **Right** Caspase-8, expressed in the heart as percentages of mean activity observed in the vehicle group and set at 100%, was assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (8 rats per group). RvD1=Resolvin D1.

..... 129

*indicates significant difference between the experimental group and the vehicle group; p<0.05..... 129

Figure 3 (A) pNF-κB/NF-κB ratio, (B) pAKT (T308)/AKT ratio, (C) pAKT (S473)/AKT ratio, (D) P-p42/p42 ratio, (E) P-p44/p44, and (F) GPR32/actin ratio expressed in the heart as percentage of the vehicle group mean set at 100% and assessed by Western blotting *in vitro* after 30-min reperfusion (4-7 rats per group). Upper panels are representative Western blots.

RvD1=Resolvin D1. *indicates significant differences between the experimental and vehicle groups: p<0.05. 130

Figure 4. Neutrophil accumulation in the ischemic myocardium evaluated by myeloperoxidase activity (3-6 rats per group). RvD1=Resolvin D1. *indicates significant differences between 0.01, 0.1 and 0.3 μg RvD1 versus the vehicle group: p<0.05..... 131

Figure 5. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion (6 rats per group). RvD1=Resolvin D1.* indicates significant difference between 0.1 μg RvD1 versus the other groups p < 0.05.

..... 132

Article 2:

Figure 1. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion. 153

Values are means±SEM (8-9 rats per group). RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid. 153

*indicates significant difference between RvD1 + 1 μg LA, RvD1 + 5 μg LA and RvD1 + 10 μg LA versus the RvD1 group. #indicates significant difference between RvD1 + 10 μg LA vs RvD1 + 1 μg LA; p<0.05. 153

Figure 2. Caspase-3 activity expressed in endocardial and epicardial areas as percentage of the RvD1 group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (8-9 rats per group). RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid, Endo=endocardial region, Epi=epicardial region..... 154

*indicates significant difference between RvD1 + 5 µg LA and RvD1 + 10 µg LA versus RvD1. # indicates significant difference between RvD1 + 10 µg LA vs RvD1 + 1 µg LA group. § indicates significant difference between RvD1 + 10 µg LA vs RvD1 + 5 µg LA; p<0.05.... 154

Figure 3. Caspase-8 activity expressed in the endocardial and epicardial areas as percentage of the RvD1 group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (7-9 rats per group). RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid, Endo=endocardial region, Epi=epicardial region. 155

*indicates significant difference between RvD1 + 5 µg LA and RvD1 + 10 µg LA vs the RvD1 group. # indicates significant difference between RvD1 + 5 µg LA and RvD1 + 10 µg LA vs RvD1 + 1 µg LA; p<0.05. 155

Figure 4. Caspase-9 activity expressed in the endocardial and epicardial areas as percentage of the RvD1 group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (6-8 rats per group). RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid; Endo=endocardial region; Epi=epicardial region. 156

*indicates significant difference between RvD1 + 1 µg LA, RvD1 + 5 µg LA and RvD1 + 10 µg LA vs RvD1; p<0.05. 156

Figure 5. Neutrophil accumulation in the endocardial and epicardial ischemic myocardium evaluated by myeloperoxidase activity (5-8 rats per group) after 24-h reperfusion. RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid, Endo=endocardial region; Epi=epicardial region..... 157

Article 3:

Figure 1. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion. PD=PD146176; Mel=Meloxicam. Values are means±SEM (7-8 rats per group). *indicates significant difference between the experimental and vehicle groups; p<0.05..... 178

Figure 2. A: Caspase-3 activity expressed in the endocardial (Endo) and epicardial (Epi) areas as percentage of the vehicle group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (6-8 rats per group). **B:** Caspase-8 activity expressed in the endocardial (Endo)

and epicardial (Epi) areas as percentage of the vehicle group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (6-8 rats per group). PD=PD146176, Mel=Meloxicam. *indicates significant difference between the experimental and vehicle groups; p<0.05 179

Figure 3. A: pAkt(T308)/Akt ratio, and **B:** pAkt(S473)/Akt ratio expressed in the endocardial (Endo) and epicardial (Epi) areas as percentage of the vehicle group and assessed by Western blotting after 30-min reperfusion (6-8 rats per group). PD=PD146176, Mel=Meloxicam. *indicates significant difference between the experimental and vehicle groups; p<0.05. Top panel: Representative Western blot of pAkt(T308), pAkt(S473) and total Akt. 180

Figure 4. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion. PD=PD146176, Mel=Meloxicam. Values are means±SEM (5-6 rats per group). 181

Figure 5. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion. RvD1=Resolvin D1, PD=PD146176, Mel=Meloxicam. Values are means±SEM (6-7 rats per group). *indicates significant difference between the Mel+PD and vehicle groups; p<0.05. \$indicates significant difference between the M,PD + RvD1 and Mel+PD groups; p<0.05. 182

Figure 6. Plasma RvD1 concentration assessed by ELISA after 30-min reperfusion (5-8 rats per group) and expressed in pg/mL. RvD1=Resolvin D1, PD=PD146176, Mel=Meloxicam. *indicates significant difference between the Mel+PD and vehicle groups; p<0.05. \$indicates significant difference between the Mel, PD + RvD1 and Mel+PD groups; p<0.05. 183

Liste des abréviations

AA = acide arachidonique

AG = acide gras

AIF = facteur induisant l'apoptose

AINS = anti-inflammatoire non stéroïdien

ALA = acide alpha-linolénique

ALXR = récepteur de la lipoxine A4

AMPc = adénosine monophosphate cyclique

APAF = "apoptotic peptidase activating factor"

ATP = adénosine triphosphate

B-LT = récepteur des leucotriènes

CK = créatine kinase

COX = cyclo-oxygénase

CysLTR = récepteur cystényl des leucotriènes

DAG = diacylglycérol

DD = domaine intracellulaire de mort

DGLA = acide dihomo-gamma-linolénique

DHA = acide docosahéxaénoïque

DISC = "death-inducing signaling complex"

DP = récepteur prostaglandine D

DR = récepteur de mort

EDHF = facteur endothélial hyperpolarisant

eNOS = synthase endothéliale du monoxyde d'azote

EP = récepteur prostaglandine E

EPA = acide eicosapentaénoïque

Erk = "extracellular signal-regulated kinases"

FADH = flavine adénine dinucléotide

FGF = "fibroblast growth factor"

FLAP = 5-lipoxygenase-activating protein

FP = récepteur prostaglandine F

HDL = *high density lipoprotein*

HMG-CoA = enzyme hydroxyl-3-methyl-glutaryl-co-enzyme A

H₂O₂ = peroxyde d'hydrogène

GLA = acide gamma-linolénique

GMPc = guanosine monophosphate cyclique

GP = glycoprotéine

GSK = "glycogen synthase kinase"

IAP = protéine inhibitrice d'apoptose

ICAM = "intercellular adhesion molecule"

IGF = "insulin growth factor"

IL = interleukine

IM = infarctus du myocarde

INF = interféron

IP = récepteur prostacycline

IP₃ = inositol triphosphate

JAK = janus kinase

KO = "knock out"

LA = acide linoléique
LOX = lipoxygénase
LPS = lipopolysaccharide
LT = leucotriène
LTB₄ = leucotriène B₄
LX = lipoxine
MAPK = "mitogen-activated protein kinase"
maR = marésine
MDR = "multidrug resistance-associated protein"
miR = micro-acide ribonucléique
mPTP = pore de transition de perméabilité mitochondrial
NADH = nicotinamide adénine dinucléotide
Nf-κB = facteur nucléaire kappa B
NO = monoxyde d'azote
Notch = "neurogenic locus notch homolog protein"
NP = neuroprotectine
O²⁻ = anion superoxyde
OH = radical hydroxyl
PAF = facteur activateur de plaquette
PG = prostaglandine
PGDH = "hydroxyprostaglandin dehydrogenase"
PGI₂ = prostacycline
PIP₂ = phosphatidylinositol biphosphate
PK = protéine kinase

PLA₂ = phospholipase A₂
PPAR = "peroxisome proliferator-activated receptor"
p70s6k = protéine ribosomale kinase de 70 kDa
RCPG = récepteur couplé aux protéines G
RISK = "reperfusion injury salvage kinase"
ROS = espèces réactives de l'oxygène
Rv = résolvine
RvD1 = résolvine D1
SAFE = "survivor activating factor enhancement"
SERCA = "sarco/endoplasmic reticulum calcium"
SOD = superoxyde dismutase
STAT = "signal transducer activator of transcription"
TAG = triacylglycérol
TGF = "transforming growth factor"
TNF = facteur de nécrose tumoral
TNFR = récepteur du facteur de nécrose tumoral
TP = récepteur thromboxane
TRAIL = "TNF-related apoptosis inducing ligand"
TRPV = "transient receptor potential vanilloid"
TX = thromboxane
VLDL = "very low density lipoprotein"
ω-3 = oméga-3
ω-6 = oméga-6
5-HPETE = acide-5-hydroxyeicosatétraénoïque

«Plus j'apprends, plus je m'aperçois que je ne sais rien»

(Socrate)

Remerciements

Un premier remerciement va à mon directeur de recherche, Guy Rousseau, qui m'a accepté comme étudiante dans son laboratoire tout au long de mes études supérieures. Merci pour l'avancement de mes connaissances scientifiques, pour la confiance et pour la qualité de la formation qui m'a été donnée.

Un remerciement va également aux étudiants gradués avec qui j'ai eu la chance de travailler dans le laboratoire ainsi qu'aux nombreux stagiaires qui m'ont été d'une grande aide pour les nombreuses expériences à faire et à refaire. Parmi les étudiants, merci à Tran Quang Thuy, Ness Madingou et Mandy Malick. Parmi les stagiaires, merci à Judith Bernier, Charles Touchette, Leandro Tomaro et Valérie Bourque-Riel qui ont toujours été présents avec le sourire pour effectuer les nombreuses expériences.

Puis, Caroline Bouchard et Louis Chiochio du service de l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, merci pour votre soutien, vos réponses et votre aide.

Je veux aussi mentionner l'aide financière obtenue par une bourse de formation de l'organisme Fonds de la recherche du Québec-Santé (FRQS).

Pour terminer, merci à mon entourage pour la patience et pour votre encouragement depuis le début dans ce parcours scolaire. Merci à mes parents pour leur soutien à travers ces quelques années d'études supérieures. Merci à mon mari pour m'avoir écoutée et accompagnée dans mes pensées, dans mes interrogations, dans mes réflexions et dans mes congrès. Merci à mon garçon Eliott pour me changer les idées et me faire vivre ces petits moments si précieux. Enfin, merci à mes amis, spécialement à Josiane Yelle, Alison Caron et son mari Gabriel Dulong ainsi que ma chère Amanda Tambasco pour leurs corrections dans mes écrits en français et en anglais.

C'est grâce à tout cet entourage qu'aujourd'hui je peux déposer cette thèse et accomplir la tête haute ces études supérieures.

Introduction

Les maladies cardiovasculaires ont une incidence importante dans les pays industrialisés. Parmi celles-ci, il y a l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque et les maladies coronariennes telles que l'infarctus du myocarde (IM). Plusieurs facteurs prédisposent à l'IM: l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le diabète, l'excès de poids, le tabagisme, l'alcoolisme ainsi que des facteurs génétiques tels que les antécédents familiaux ou l'âge et le genre masculin. L'IM est caractérisé par une période d'ischémie, puis par une période de reperfusion. La reperfusion est toutefois une épée à double tranchant, puisqu'elle permet le retour de la circulation afin de sauver les cardiomyocytes, mais elle entraîne aussi des lésions de reperfusion. Plusieurs stratégies sont utilisées afin de diminuer ces lésions de reperfusion et ainsi diminuer la taille de l'infarctus. Des approches nutraceutiques, telles que l'alimentation, peuvent être utilisées. Les oméga-3 (ω -3), des acides gras (AG) essentiels, montrent d'ailleurs un effet préventif et cardioprotecteur en diminuant la taille des lésions de reperfusion. Toutefois, les ω -3 doivent être présents avant l'infarctus pour montrer leur effet. Le but de nos études est donc de regarder si un métabolite des ω -3, la résolvine D1 (RvD1), peut avoir un effet cardioprotecteur lorsque donnée au moment de l'IM. Sachant que les nord-américains sont de grands consommateurs d'AG oméga-6 (ω -6), les mécanismes impliqués dans l'action des ω -6, des ω -3 et de leurs métabolites, plus précisément la RvD1, seront également observés.

Chapitre 1. Infarctus du myocarde

Les maladies ischémiques cardiaques s'observent lorsqu'il y a un déséquilibre entre le flot sanguin myocardique et la demande métabolique du myocarde. Une diminution du flot sanguin peut être causée par un vasospasme, un thrombus ou encore une hypoperfusion coronarienne due à une sténose ou à une contraction excessive du myocarde [1]. Les syndromes coronariens aigus, lorsqu'il y a une réduction soudaine de l'apport sanguin au myocarde, regroupent d'abord l'angine stable, l'angine instable et l'IM. L'angine est dite stable si les douleurs sont récurrentes, anciennes et qu'il n'y a pas d'aggravation, tandis qu'une angine instable présente une nouvelle douleur ou à une fréquence plus élevée. L'angine s'observe lorsque la lumière du vaisseau a suffisamment rétréci pour que lors d'un effort, durant lequel le cœur doit fournir un effort supplémentaire sans toutefois recevoir un apport en oxygène suffisant, la douleur et l'essoufflement commencent à se faire ressentir. Une diminution de plus de 75% de la lumière du vaisseau va entraîner des symptômes. Bien qu'aucun biomarqueur de lésion cardiaque ne soit observé avec l'angine instable, celle-ci peut conduire à l'IM [2]. L'IM survient lorsqu'il y a un grossissement progressif d'une plaque athéromateuse, que celle-ci devient instable et que l'érosion permet le contact du sang avec la matrice sous-endothéliale engendrant ainsi la formation d'un caillot qui obstrue l'artère ou que le détachement d'une plaque vient occlure une artère coronaire [3]. On estime le nombre d'IM à 75 000 cas par année au Canada, ce qui correspond à un événement toutes les sept minutes [4]. L'ischémie (*iskhaimos* : qui arrête le sang) produite par cette occlusion prive les cardiomyocytes d'oxygène et de nutriments, ce qui nuit à leur fonctionnement. Le terme IM reflète donc la mort cellulaire des cardiomyocytes causée par l'ischémie. Cette dernière entraîne un débalancement dans la perfusion, générant ainsi une hypoxie. Les cellules normalement irriguées par l'artère occluse subissent alors des lésions, conduisant possiblement à leur mort en quelques minutes [5]. Vingt minutes sont suffisantes pour voir apparaître la mort des cellules [6]. À leur tour, les cellules mortes donnent naissance à du tissu fibreux non contractile, ce qui altère la contractilité du muscle cardiaque [5]. Selon l'étendue de l'obstruction et de la région atteinte, les dégâts seront plus ou moins importants, mais pourraient tout de même perturber le système de conduction du cœur et causer la mort via le

déclenchement d'une fibrillation ventriculaire. Toutefois, le muscle cardiaque peut fonctionner au repos avec un apport de seulement 10 à 15% de l'irrigation sanguine normale [3, 5].

Il y a deux types d'IM décrits selon les tracés d'électrocardiogramme des patients : soit l'IM avec une élévation du segment ST et celle sans élévation du segment ST. Celle avec altération du segment ST est la plus commune et consiste en l'occlusion artérielle complète d'un gros vaisseau épicaudique. L'IM sans élévation ST se voit lorsque l'artère coronaire est partiellement obstruée mais qu'il reste une certaine circulation sanguine bien que grandement diminuée. Les deux types d'IM aboutiront à de la nécrose myocardique et au relargage de biomarqueurs qui seront représentatifs de la taille de l'infarctus chez le patient [2]. Parmi ces biomarqueurs, il y a les troponines I et II, composantes cardiaques relâchées dans le sang dès les premières heures d'ischémie lors des lésions du myocarde et qui sont présentes jusqu'à 14 jours post IM [7]. Il y a la fraction MB de la créatine kinase (CK-MB) qui est aussi spécifique au cœur, qui est relâchée au bout de trois à quatre heures d'ischémie et qui reste présente dans le sang jusqu'à 36 heures post-ischémie. Plusieurs autres marqueurs sont aussi regardés, tels que la myoglobuline, le peptide natriurétique de type B et la protéine C réactive, mais ceux-ci sont moins spécifiques au cœur [2, 8].

L'occlusion de l'artère coronaire peut être levée par l'injection d'agents thrombolytiques, par l'angioplastie transluminale percutanée ou à l'aide d'un pontage aortocoronarien. Comme agents thrombolytiques, citons les agents de type streptokinase ou encore les activateurs tissulaires du plasminogène. Ceux-ci encouragent la fibrinolyse via l'activation du plasminogène en plasmine. Ces agents doivent être donnés le plus rapidement possible, dans les 12 premières heures d'ischémie, afin d'être efficaces. L'angioplastie percutanée permet de traiter l'artère coronaire bouchée via l'insertion d'une sonde munie d'un ballon gonflable qui va dilater l'artère touchée [9]. Lorsque le ballonnet ne suffit pas, un stent peut être posé dans la lumière de l'artère. Celui-ci dilate et renforce les parois de l'artère. Le stent est imprégné de composés actifs afin d'empêcher la prolifération des cellules et l'inflammation qui pourraient à nouveau diminuer la lumière du vaisseau [10]. Finalement, le pontage aortocoronarien est un traitement chirurgical de deuxième ligne où un vaisseau sera implanté entre l'aorte et le territoire en aval des lésions afin de ramener un flot sanguin

suffisant à l'endroit où son apport a considérablement diminué. Ce traitement est utile lorsqu'il y a plusieurs artères bouchées ou lorsque la levée de l'ischémie ne permet pas de ramener un apport sanguin suffisant [11].

De ce fait, l'IM se divise en deux grandes catégories, soit l'ischémie et la reperfusion.

1.1 Ischémie

L'ischémie myocardique se présente lorsque le flux artériel ne peut amener assez d'oxygène pour combler la demande du tissu afin qu'il maintienne sa fonction. En situation non-pathologique, un équilibre se maintient puisque le débit coronarien s'ajuste à la demande métabolique du myocarde via l'endothélium vasculaire et le muscle lisse. Des agents vasoactifs relâchés par l'endothélium, tels que la prostacycline (PGI_2) et l'acide époxyeicosanoïde, des métabolites de l'acide arachidonique, le monoxyde d'azote (NO) et le facteur hyperpolarisant endothélial (EDHF) vont agir sur leur cible respective au niveau des cellules musculaires lisses. En augmentant les concentrations d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) ou en causant une hyperpolarisation, les cellules musculaires lisses vont se relaxer et engendrer une vasodilatation. Ainsi, cette vasodilatation permettra une augmentation du débit afin de répondre à une demande plus élevée [12-14].

En situation pathologique, le détachement d'une plaque athéromateuse vient bloquer la circulation dans l'artère coronaire. Une dysfonction endothéliale, où l'endothélium ne peut répondre à la demande pour pallier le manque de circulation, s'observe. La demande devient donc supérieure à l'apport, causant ainsi des conséquences biochimiques et cellulaires [14]. De plus, l'ischémie cause une perte des neurones adrénergiques, ce qui entraîne une accumulation des catécholamines dans l'espace interstitiel. Les récepteurs α et β -adrénergiques sont alors stimulés entraînant du même coup une vasoconstriction et une demande métabolique élevée, ce qui peut diminuer la durée de vie des cellules [15]. L'apparition des symptômes commenceront à s'observer chez le patient : douleurs thoracique, douleur irradiante au cou, à la mâchoire ou au bras, essoufflement, sueurs, nausées, étourdissements... [16]

1.1.1 Conséquences biochimiques et cellulaires de l'ischémie

En condition non pathologique aérobie, le cœur soutire de 60 à 80% de son énergie via l'oxydation des AG. Les 20 à 40% restants sont acquis par la glycolyse à partir du glucose [14]. Durant la glycolyse, le glucose est converti en pyruvate, via le fructose-1,6-bisphosphate, et génère deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP) par mole de glucose ainsi que deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). Une première phase préparatoire durant laquelle le glucose est d'abord phosphorylé et scindé en deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate nécessite deux molécules d'ATP. Puis, la seconde phase durant laquelle les glycéraldéhyde-3-phosphate sont transformés en pyruvate aboutira à la formation de quatre ATP. Au total, la réaction génère ainsi deux molécules d'ATP. Du côté des AG, ils sont d'abord activés en acyl-CoA par les acyl-coA synthases, ce qui nécessite deux molécules d'ATP. Les acides gras activés seront ensuite dégradés par β -oxydation dans les mitochondries. La réaction dépend de la présence d'oxygène. Chaque tour de β -oxydation aboutit à la formation d'un NADH, d'un flavine adénine dinucléotide (FADH₂) et d'un acétyl-CoA. Le pyruvate issu de la glycolyse et préalablement converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase ainsi que l'acétyl-CoA issu de la β -oxydation sont utilisés, en présence d'oxygène, par le cycle de l'acide citrique qui conduit à la formation de FADH₂ et NADH pouvant être réoxydés par la phosphorylation oxydative afin de générer de l'ATP. L'oxydation d'un AG génère beaucoup d'énergie puisque, par exemple, un AG de 16 atomes, le palmitate, nécessite sept tours de β -oxydation, le tout conduisant à la formation de 129 molécules d'ATP [17].

En condition ischémique, le myocarde passe d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie. À la suite de quelques secondes d'ischémie (huit à dix secondes), la présence d'oxygène se fait rare. L'oxydation des AG nécessite la présence d'oxygène, le métabolisme dépend donc seulement de la source d'ATP provenant de la glycolyse anaérobie. De 80 à 90% de l'énergie est fournie par celle-ci, bien que son efficacité soit moindre, soit environ 19 fois moins que le métabolisme aérobie. Le flot artériel n'amenant pas de glucose en quantité suffisante, les granules de glycogène sont utilisées [5]. La glycogène phosphorylase débute la dégradation du glycogène en glucose-1-phosphate. Puis, la

phosphoglucomutase catalyse la conversion du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate qui entre dans la glycolyse. Le pyruvate formé par la glycolyse aboutira à la formation de lactate par la lactate déshydrogénase qui catalyse l'oxydation du NADH en NAD⁺. Cette réaction anaérobie génère deux molécules d'ATP par molécule de glucose ce qui est nettement insuffisant pour assurer la fonction cardiaque [17]. La contraction des cardiomyocytes hypoxiques se voit donc altérée, le potentiel membranaire diminue et des changements sur l'électrocardiogramme surgissent [18, 19].

À ce niveau, l'ATP permet la survie via l'alimentation des pompes membranaires pour entretenir les gradients de sodium, de potassium et de calcium à travers la membrane. Jusqu'à environ 15 à 20 minutes d'ischémie, les dommages sont réversibles. Le retour du flot sanguin permet aux cardiomyocytes de retrouver leur fonction, notamment grâce aux 35% d'ATP restant encore à ce niveau d'ischémie. Les changements ultrastructuraux suivants pourront toutefois être observés, bien que les dommages soient encore réversibles : léger œdème cellulaire et mitochondriale, relaxation et étirement des myofibrilles ainsi qu'une légère agglomération de la chromatine [20].

Autour de 20 minutes d'ischémie, des dommages irréversibles, c'est-à-dire la mort des cardiomyocytes, commencent à apparaître. Cette mort survient surtout par nécrose de coagulation. Les étapes conduisant à la mort des cardiomyocytes se succèdent. La concentration en électrolyte des cellules est altérée. Le potassium et le magnésium quitteront la cellule pour laisser entrer le sodium, le calcium, le chlore et l'eau. Ces derniers s'accumuleront dans la cellule en raison, entre autres, de l'affaiblissement de l'activité de la pompe sodium/potassium ATPase et de l'échangeur sodium/hydrogène, ce qui favorise l'entrée d'ions calciques par l'échangeur sodique/calcique. La surcharge sodique entraînera l'œdème cellulaire. Le calcium s'accumulera dans le cytosol par une entrée massive et l'impossibilité d'être recapté par le réticulum sarcoplasmique causée par le manque d'ATP. Une concentration accrue de calcium cytosolique causera une hypercontraction des cellules ainsi qu'une activation de protéases, de lipases et de nucléases, ce qui lèsera les structures du cytosquelette [6, 21].

Le glycogène se trouvera aussi diminué, et, à l'inverse, les concentrations de lactate, de phosphate inorganique et de créatine vont augmenter. Il en résultera donc une augmentation de la charge osmotique, un œdème cellulaire ainsi qu'un pH abaissé. Comme changements ultrastructuraux, il y aura agrégation de la chromatine, accentuation de l'œdème mitochondriale, rupture des bandes Z et des myofibrilles, diminution de la quantité de lysosomes, apparition de densités amorphes dans la matrice mitochondriale et rupture des unités trilaminaires de la membrane. La dégradation de l'ATP fera en sorte d'augmenter la concentration de xanthine, ce qui générera des radicaux libres et causera la peroxydation lipidique des membranes [22].

À 40 minutes d'ischémie, il ne reste que 10% de la quantité initiale d'ATP. À une heure d'ischémie, il y aura œdème mitochondriale prononcée, diminution de la densité de la matrice, désorganisation des crêtes, agglutination de la chromatine et les granules de glycogène auront complètement disparues des cellules cardiaques. À ce niveau, la mort des cellules par apoptose peut aussi être observée en raison de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP). Ce pore s'ouvre lors d'une ischémie sévère et son ouverture cause la mort de la mitochondrie qui relâche son contenu tel que le cytochrome c et des radicaux libres. Ces composés vont activer des caspases pour aboutir à l'apoptose (l'apoptose est détaillée dans une prochaine section) [23].

En résumé, la déplétion en ATP pourrait être à l'origine des lésions irréversibles, tout comme l'accumulation de métabolites ischémiques tels que le lactate et le déséquilibre ionique. Ceux-ci vont engendrer une dysfonction mitochondriale et cellulaire, une détérioration du sarcolemme et de la cellule pour finalement aboutir à la mort de la cellule par nécrose ou par apoptose. Du tissu fibreux va remplacer les cellules mortes, laissant place à des lésions cicatricielles qui, elles, apparaîtront plus tardivement, voire plusieurs semaines à la suite de l'ischémie [20].

1.1.2 Facteurs influençant la sévérité de l'ischémie

Plusieurs facteurs peuvent aussi influencer l'étendue des dégâts. L'ischémie peut se produire selon différents grades de sévérité dépendamment du degré de l'occlusion (de faible à complet), du territoire nourri par l'occlusion et de la présence ou non d'anastomose (vaisseaux collatéraux qui nourrissent une même région). Il y a une relation visible entre le site d'occlusion et l'étendue de la nécrose observée. La zone à risque (région nourrie par l'artère occluse) semble donc être un facteur prédominant dans la taille de l'infarctus [24]. Il y a aussi une relation linéaire entre la taille de l'infarctus et la durée de l'ischémie, du moins durant les trois premières heures de l'ischémie. Plus celle-ci est longue, plus les dommages sont élevés et le risque d'avoir des lésions irréversibles est accru [25]. De plus, la région sous endocardique sera la première à présenter de la mort cellulaire. La région sous endocardique a un besoin énergétique supérieur à la région sous épicaudique. Cette région est également plus sensible à un apport sanguin diminué et est moins tolérante à une ischémie. Avec une durée d'ischémie prolongée, l'atteinte s'étendra vers la région sous épicaudique. Il s'agit du «*wavefront phenomenon*», décrit depuis plusieurs décennies [26]. Puis, la présence d'une circulation collatérale, se caractérisant par un apport sanguin provenant d'anastomoses entre les vaisseaux irriguant la zone à risque, est aussi un facteur important [27]. Les patients ayant un réseau de vaisseaux collatéraux développé montrent une diminution de signes ischémiques et de mortalité à la suite d'un épisode d'ischémie myocardique. L'adulte sain, le cochon, le rat et le lapin ne présentent pas de vaisseaux collatéraux au niveau du cœur contrairement au chien, au chat et au patient possédant des antécédents de maladies coronariennes [26, 28].

Le seul moyen de contrecarrer les effets de l'ischémie est de permettre la reperfusion du tissu.

1.2 Reperfusion

Afin de réduire l'impact de l'ischémie, la reperfusion du tissu myocardique doit se faire le plus rapidement possible. Pour rétablir le fonctionnement des cellules encore atteintes de façon réversible et ainsi diminuer la taille d'un infarctus, le retour du flot sanguin est essentiel. Tel que mentionné précédemment, à la suite de 20 minutes d'ischémie, les lésions

irréversibles commencent à apparaître et les cellules ne peuvent pas être sauvées par la reperfusion. L'efficacité de la reperfusion dépendra donc de la durée de l'ischémie [29].

Toutefois, le retour du flot sanguin peut entraîner des lésions appelées lésions de reperfusion. Le rétablissement de la circulation vient léser le myocarde à la suite d'une période ischémique et peut même conduire à la mort cellulaire des cardiomyocytes qui étaient vivants avant la reperfusion [30].

1.2.1 Lésions de reperfusion

Plusieurs observations ont montré que des phénomènes présents durant la reperfusion étaient à l'origine de la mort des cardiomyocytes qui étaient encore viables auparavant. Effectivement, les lésions de reperfusion seraient responsables de probablement 40 à 50% de la taille d'un infarctus. Le groupe de Lorgneril et al a démontré que la taille de l'infarctus augmentait pendant la période de reperfusion. Celle-ci était de 22% de la zone à risque après trois heures de reperfusion et elle augmentait pour se stabiliser à 35% à six heures de reperfusion [31].

Jennings et coll. ont été l'un des premiers groupes à rapporter les changements des cardiomyocytes reperfusés à la suite d'une ischémie chez le chien. Ils ont décrit un gonflement cellulaire, la contraction des myofibrilles, une rupture du sarcolemme, des granules intramitochondriales de phosphate et de calcium, la perte des mitochondries, une libération d'enzymes cytoplasmiques et la nécrose en bandes de contraction [32, 33].

Deux types de lésions se présentent en reperfusion, soit celles étant non létales ou celles conduisant à la mort des cardiomyocytes dites létales. Les lésions non létales englobent les phénomènes de « *no reflow* » et de « *stunning* » ainsi que les arythmies [30]. Les lésions létales comprennent plusieurs événements qui peuvent aboutir à la mort de la cellule, principalement par nécrose en bande de contraction ou par apoptose [34]. Toutefois, la mort par autophagie a aussi récemment été démontrée lors de l'IM, mais celle-ci serait plutôt bénéfique [35]. Le stress oxydatif couplé avec une dysfonction endothéliale, la surcharge

calcique, les plaquettes, l'accumulation de neutrophiles, l'inflammation et l'apoptose contribuent de façon importante à augmenter la taille de l'infarctus [30].

1.2.1.1 Lésions non létales

1.2.1.1.1 phénomène de "no reflow"

Le phénomène dit de « *no reflow* » survient lorsque, malgré la revascularisation du conduit artériel, il y a une région du myocarde qui ne reçoit toujours pas une reperfusion adéquate. Celle-ci survient dans 40% des interventions par angioplastie coronarienne et peut être associée à un risque accru de mortalité et de complications chez le patient [36]. Le processus de « *no reflow* » débute lors de l'ischémie et s'accroît en période de reperfusion. Des dommages endothéliaux, de l'œdème, le dépôt de plaquettes et de fibrines, les leucocytes, les radicaux libres et la contraction des cellules peuvent tous être à l'origine du « *no reflow* ». Par ailleurs, plus longue est la période d'occlusion coronarienne, pire sera le « *no reflow* ». L'endothélium endommagé présente de l'inflammation et de l'œdème ce qui comprime la lumière du vaisseau. Une contraction soutenue des cellules, qui survient en période de reperfusion, diminue aussi la lumière du vaisseau et l'apport sanguin au myocarde [36, 37].

L'accumulation de fibrines et de plaquettes diminue aussi l'arrivée sanguine. Un modèle de déplétion plaquettaire montre une diminution de la zone touchée par le « *no reflow* » [38]. L'ibuprofène [39], la prostaglandine E1 (PGE₁) [40] et un lavage vasculaire avec de la saline héparinée [41] s'avèrent bénéfiques pour contrer le « *no reflow* ». Un inhibiteur des récepteurs de la glycoprotéine IIb/IIIa démontre un effet bénéfique chez le patient avec angioplastie en diminuant le taux de mortalité, d'infarctus récidiviste et de revascularisation tout en augmentant le flot sanguin en reperfusion [42]. L'accumulation des leucocytes dans la lumière vasculaire semble aussi impliquée de façon importante dans ce processus. Ceux-ci s'accumulent dans la microvasculature dès le début de la reperfusion et pourraient engendrer la relâche de radicaux libres contribuant aussi au « *no reflow* ». Un antagoniste sélectif de l'endothéline-A [43] et un bloqueur du facteur VIIa [44] diminuent l'accumulation des neutrophiles et l'étendue du « *no reflow* ». L'utilisation de vasodilatateurs s'avère aussi bénéfique. De plus, l'utilisation de verapamil [45], un bloqueur des canaux

calciques, a montré un effet bénéfique tout comme l'adénosine chez différents modèles expérimentaux. L'adénosine agit de plusieurs façons : elle diminue le nombre de neutrophile, préserve l'intégralité endothéliale et cause une vasodilatation via possiblement l'ouverture du canal potassique sensible à l'ATP. L'adénosine a montré son efficacité chez le patient lorsque donnée de façon intracoronarienne [46, 47].

Enfin, le « *no reflow* » semble être un processus multifactoriel sans toutefois augmenter la taille de l'infarctus. Il semble toucher essentiellement les cellules déjà nécrosées ou en processus de mort cellulaire.

1.2.1.1.2 "*stunning myocardique*"

Le *stunning* myocardique, c'est-à-dire la sidération myocardique, se définit comme étant une dysfonction contractile qui survient à la suite d'un épisode d'hypoperfusion coronarienne et qui est réversible. Le *stunning* survient dès qu'il y a un moment d'ischémie, même si le temps d'ischémie est trop court pour aboutir à de la nécrose. Une dysfonction contractile est observée chez le chien avec une ischémie de moins de 20 minutes où il n'y a pas de nécrose myocardique [48]. De plus, plus longue est la période d'ischémie, plus grands seront les dommages de dysfonction contractile. Les mécanismes derrière le *stunning* semblent complexes mais impliquent le calcium et les radicaux libres. La reperfusion régénère l'apport en oxygène, mais induit par le fait même une production de radicaux libres issus de l'oxygène [49] ainsi qu'une augmentation excessive de calcium intracellulaire [50, 51]. Une augmentation intracellulaire de calcium peut activer des phospholipases et d'autres enzymes de dégradation endommageant ainsi le mécanisme de contraction. De plus, l'augmentation de calcium peut causer une production de radicaux libres via la xanthine oxidase. La xanthine oxidase génère le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est à la base de la formation du radical hydroxyl (OH). Ces deux radicaux libres ainsi que l'anion superoxyde (O_2^-) auraient un rôle important dans le *stunning* myocardique et les dommages reliés aux lésions de reperfusion (discuté dans une section ultérieure). Ceux-ci agissent comme dépresseur de la fonction contractile en raison de leur action cytotoxique sur différents composants membranaires tels que les protéines contractiles ou encore la peroxydation lipidique qui détériore la perméabilité

membranaire de la cellule et des organelles. De plus, les radicaux libres peuvent contribuer à une augmentation intracellulaire de calcium via une dysfonction du réticulum sarcoplasmique [52, 53].

De ce fait, des inhibiteurs des canaux calciques tels que le verapamil [54] ou le diltiazem [55] ainsi que des antioxydants (la superoxyde dismutase (SOD), la catalase [56] et le diméthylthiourée [57]) s'avèrent bénéfiques contre le *stunning* myocardique.

1.2.1.1.3 Arythmies

Durant les premières secondes de reperfusion, des arythmies apparaissent. Celles-ci peuvent être plus ou moins sévères, soit des salves d'extrasystoles jusqu'à une fibrillation ventriculaire qui est irréversible. Un rythme idioventriculaire accéléré, une fibrillation ventriculaire, une tachycardie, une fibrillation auriculaire ou une palpitation cardiaque ainsi qu'une bradycardie sont celles qui sont davantage retrouvées chez le patient. Lorsque diagnostiquées et traitées rapidement, elles ne sont pas défavorables au pronostic du patient [58]. Celles-ci sont plus sévères lorsque la durée de l'ischémie est plus longue et lorsque la zone à risque est plus élevée. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de ces arythmies. Dans ce sens, l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs α -adrénergique [59], ainsi que des bloqueurs de canaux calciques s'avèrent efficaces à diminuer les arythmies en période de reperfusion [60, 61]. Un mécanisme par lequel les arythmies peuvent apparaître est par exemple l'activation des connexin43 qui cause la fermeture des jonctions gap via l'activation de la calmoduline. Le calcium et l'acidose via un pH diminué peuvent activer la connexin43 [62].

Les arythmies s'observent aussi en ischémie, elles ne sont donc pas exclusives à la reperfusion. Elles ne modifient toutefois pas la taille de l'infarctus.

1.2.1.2 Lésions léthales

Plusieurs événements vont conduire à la mort des cellules en période de reperfusion. La nécrose est une mort cellulaire non programmée qui survient lorsqu'il y a une diminution

d'ATP, voir un arrêt de synthèse d'ATP, une dysfonction dans les pores ioniques ou lorsqu'il y a une augmentation dans la perméabilité membranaire. La nécrose en bande de contraction s'observe en reperfusion. Elle se caractérise par une hypercontraction des myofibrilles ainsi que des dommages mitochondriaux causés par une surcharge calcique et de faible taux d'ATP. La nécrose, de façon générale, se définit par un gonflement et un éclatement de la cellule. Cette dernière relâchera ainsi son contenu cellulaire de façon désordonnée. Les phagocytes n'arriveront alors pas à bien nettoyer le site, ce qui causera leur accumulation et une réponse inflammatoire. Les membranes des organelles peuvent aussi être endommagées, leur contenu sera aussi relâché. C'est le cas des lysosomes qui relâcheront leur contenu, ce qui pourra digérer la cellule elle-même, mais aussi causer des dommages aux cellules avoisinantes. L'apoptose, elle, est plutôt une mort programmée, davantage structurée et qui conduit à une réponse inflammatoire faible. Des dommages dans l'ADN vont davantage activer ce type de mort cellulaire. Celle-ci sera expliquée de façon plus détaillée dans une section ultérieure. Enfin, il y a la mort par autophagie qui a été décrite récemment comme étant impliquée pendant l'ischémie et la reperfusion. Celle-ci se définit comme une digestion des composantes cellulaires par les lysosomes. Il y aura formation de vésicules dans le cytoplasme qui seront délimitées par une double membrane. Ces vésicules englobent une partie du cytoplasme ainsi que ces constituants. Les vésicules vont ensuite fusionner avec les lysosomes, puis ceux-ci digéreront et dégraderont le contenu [63, 64]. L'apoptose et la nécrose survenant pendant l'ischémie et la reperfusion contribuent à augmenter la taille de l'infarctus, tandis que l'autophagie serait davantage protectrice [65]. Cette dernière protège les cardiomyocytes en diminuant le remodelage cardiaque et le développement d'une dysfonction cardiaque [66]. Plusieurs phénomènes peuvent entraîner la mort des cellules en reperfusion et ainsi augmenter la taille de l'infarctus.

1.2.1.2.1 Le stress oxydatif

La reperfusion du myocarde ischémique génère du stress oxydatif. Il y a une augmentation importante de radicaux libres sous forme d'espèces réactives d'oxygène (ROS), dont l'O₂⁻, l'OH⁻ et le H₂O₂ lors des premières minutes, voire les premières secondes de reperfusion. Les deux premiers ont un électron non-pairé qui rend la molécule instable et très

réactive. Leur accumulation débute pendant l'ischémie, mais dès l'arrivée de l'oxygène via la reperfusion, il y a une production massive de ROS.

En condition normale, les ROS générés par le métabolisme aérobique sont bien tolérés et pris en charge par les défenses antioxydantes. Lors de la reperfusion, l'homéostasie tissulaire est chamboulée, les défenses antioxydantes sont diminuées, les ROS sont augmentées, ce qui cause des effets délétères. L' O_2^- , formé par l'oxygène qui accepte un électron, est en équilibre avec sa forme protonée HO_2 . Durant l'ischémie, l'acidose amène de façon plus importante le HO_2 et devient plus réactif. Celui-ci est capable d'oxyder les AG ainsi que les membranes cellulaires. Son action délétère est prévenue par la SOD qui le convertit en H_2O_2 qui lui est seulement toxique à haute concentration. La catalase et le système de glutathion se chargent de neutraliser le H_2O_2 en H_2O . Donc, en condition d'homéostasie, les produits superoxydes de la respiration sont convertis en eau. En condition pathologique d'ischémie et de reperfusion toutefois, le H_2O_2 s'accumule et est converti en OH qui lui est destructeur en causant directement des dommages sur les membranes cellulaires, sur les protéines et en causant la peroxydation lipidique. Les ions métalliques, dont le fer, jouent un rôle important dans la génération d' OH^- [67-69] (voir figure 1 [68]).

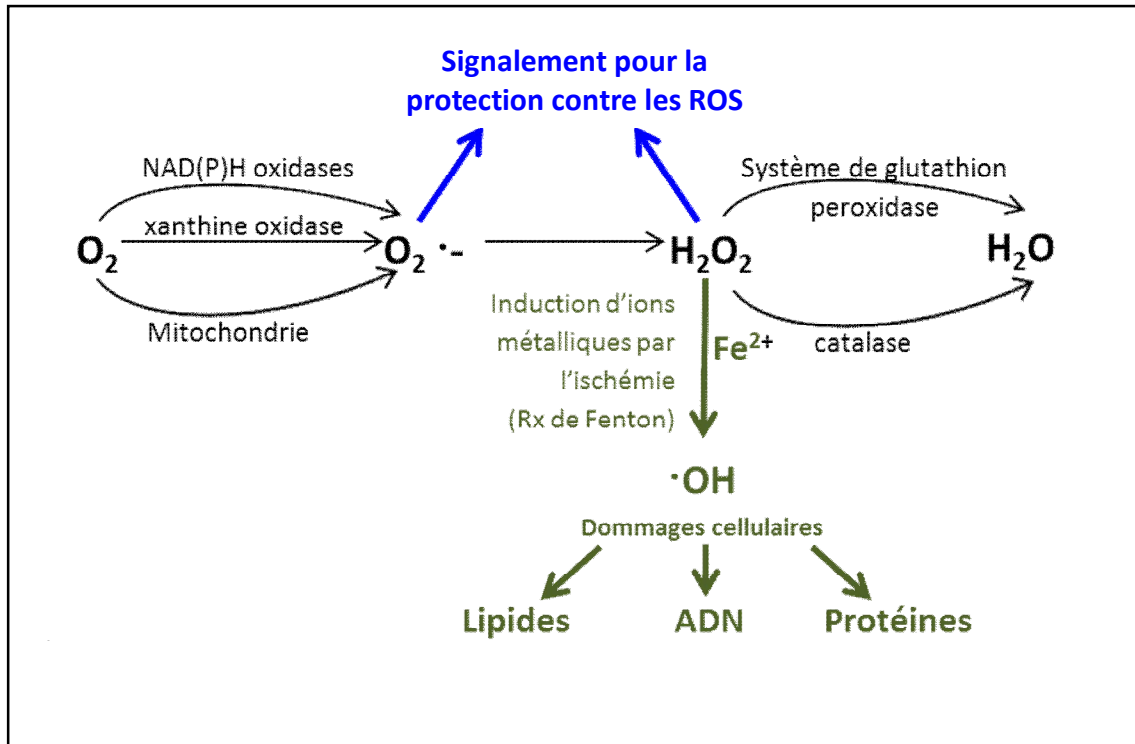


Figure 1. **Stress oxydatif.** L'oxygène (O_2) qui accepte un électron forme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) conduisent à la formation du radical hydroxyle ($\cdot OH$) qui est grandement toxique en causant des dommages cellulaires sur les lipides, l'ADN et les protéines. Les radicaux libres sont neutralisés par les antioxydants en eau (H_2O) [68].

Donc, le stress oxydatif généré par une augmentation des radicaux libres et une diminution de l'activité antioxydante semble jouer un rôle dans la mort des cardiomyocytes conduisant à une augmentation de la taille de l'infarctus et à une dysfonction cardiaque. L'administration de la combinaison SOD et catalase diminue la taille de l'infarctus dans un modèle canin d'IM lorsque donné pendant l'ischémie et au début de la reperfusion [70]. Cependant, certains n'ont pas vu d'effets à utiliser les agents antioxydants et à diminuer le stress oxydatif en utilisant la combinaison d'enzymes précédentes chez le lapin [71]. Le modèle utilisé pourrait influencer les résultats, mais le traitement doit être donné très rapidement en reperfusion, voire pendant l'ischémie, afin qu'il soit efficace puisque les ROS s'accumulent en ischémie et très tôt en période de reperfusion [68, 72]. Il faut d'autant plus tenir compte que les ROS sont aussi bénéfiques. Ils jouent un rôle important dans la régulation

de l'énergie, dans l'activation de kinases de survie cellulaire, dans le contrôle de l'inflammation, dans la régulation du tonus vasculaire et même au niveau du préconditionnement [73]. Toutefois, un certain équilibre doit se maintenir entre les ROS et le système antioxydant afin de prévenir les lésions.

D'autres mécanismes sont aussi impliqués dans les lésions de reperfusion létales et il faut en tenir compte pour mettre au point des stratégies efficaces afin de les limiter.

1.2.1.2.2 *Le calcium*

La seconde hypothèse impliquée dans les lésions de reperfusion est le calcium. Une surcharge calcique cause beaucoup de dommages. Le calcium joue un rôle dans les lésions non-létales dont le *stunning* et les arythmies, mais pourrait aussi causer une augmentation de la taille de l'infarctus. Tel que mentionné précédemment, il y a une accumulation intracellulaire de calcium lors de l'ischémie, mais aussi pendant la reperfusion.

Afin de restaurer le pH durant la période de reperfusion, il y a activation de l'échangeur sodium-hydrogène afin d'éliminer les ions d'hydrogène et de l'échangeur sodium-calcium pour rétablir les concentrations de sodium, ce qui génère une augmentation de la concentration de calcium dans la cellule. Une dysfonction du réticulum sarcoplasmique à maintenir l'homéostasie du calcium contribue aussi à l'augmentation de calcium intracellulaire. Le réticulum sarcoplasmique emmagasine le calcium dans les cardiomyocytes et orchestre le mécanisme d'excitation et de contraction. L'activité de la "sarco/endoplasmic reticulum calcium" (SERCA) ATPase, qui fait entrer le calcium dans le réticulum sarcoplasmique, ainsi que l'activité des récepteurs ryanodines, qui fait sortir le calcium du réticulum sarcoplasmique, sont altérées en reperfusion. L'excès de calcium qui en résulte peut causer une contraction soutenue des cardiomyocytes et entraîner leur mort via la nécrose en bandes de contraction [62, 74].

De plus, durant les premières minutes de reperfusion, le calcium, en combinaison avec les ROS, peut induire l'ouverture du mPTP localisé dans la membrane interne, ce qui abolit la chaîne respiratoire et induit l'affaiblissement de la membrane mitochondriale. Le tout conduit

à la mort de la cellule par apoptose. Le réticulum sarcoplasmique est aussi en étroite interaction avec la mitochondrie via les mitofusines. Une dysfonction mitochondriale, via une augmentation dans la perméabilité mitochondriale et une diminution de la CK, inhibe la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique. Inversement, une concentration accrue de calcium au niveau des récepteurs ryanodines du réticulum sarcoplasmique entraîne une augmentation dans la perméabilité membranaire mitochondriale. Le tout favorisant la mort de la cellule [62].

Puis, une faille dans l'homéostasie du calcium entraîne aussi une activation excessive des protéases calpaïnes qui peuvent conduire à une rupture du sarcolemme, à la fragilisation des membranes et à la mort des cardiomyocytes [75].

L'utilisation d'antagonistes calciques s'avère bénéfique dans certains modèles expérimentaux, mais leur action est limitée à prévenir l'accumulation de calcium au moment de la reperfusion bien que le calcium s'accumule déjà en ischémie [51, 76]. Une approche plus récente consiste à réguler la relation entre le réticulum sarcoplasmique et la mitochondrie. Le postconditionnement (discuté ultérieurement), en régulant cette interaction, montre une diminution de calcium et une limitation de la taille de l'infarctus. Toutefois, d'une façon cliniquement plus intéressante, la prévention des lésions causées par le calcium serait davantage bénéfique. Prévenir l'hypercontraction, inhiber les calpaïnes et inhiber l'ouverture du mPTP pendant la reperfusion diminuent la taille de l'infarctus [62]. La cyclosporine A qui inhibe l'ouverture du mPTP a d'ailleurs montré une diminution de calcium, une atténuation de l'hypercontraction ainsi que de la taille de l'infarctus. Elle s'est montrée efficace dans une étude clinique chez des patients avec angioplastie [77].

1.2.1.2.3 Dysfonction endothéliale, neutrophiles et inflammation

Durant l'ischémie, les cellules endothéliales sont sujettes aux altérations décrites dans la section précédente. Il y a une altération au niveau des potentiels membranaires, une perturbation dans la distribution ionique, une augmentation du volume intracellulaire, une diminution de la fluidité membranaire, une altération dans l'organisation du cytosquelette ainsi qu'une déplétion dans l'emmagasinage de l'énergie. Une diminution de

la production de facteurs vasodilatateurs tels que la PGI₂ ainsi que le NO est observée tandis qu'il y a une augmentation des facteurs vasoconstricteurs tels que les endothélines et la thromboxane A₂ (TXA₂). Il y a induction des gènes impliqués dans la synthèse des cytokines et des molécules d'adhésion, et une diminution de ceux impliqués dans la synthèse de la synthase endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS) et de la trombomoduline. Ces effets sont exacerbés lors de la réoxygénation en reperfusion [78, 79].

Une dysfonction endothéliale est donc observée. Les cellules endothéliales se détacheront de la membrane basale, et des leucocytes activés, principalement des neutrophiles, s'attacheront aux cellules endothéliales. Cette dysfonction endothéliale entraînera, au niveau des artérioles, une altération dans la production de NO, ce qui inhibera la vasorelaxation. La production d'O₂⁻ par les neutrophiles activés pourrait expliquer la diminution de la production de NO étant donné que la SOD et les antioxydants peuvent restaurer la réponse vasodilatatrice [80]. Au niveau des capillaires, il y a principalement une mauvaise perfusion due aux détachements et au gonflement des cellules endothéliales ainsi qu'à l'accumulation des leucocytes. De plus, il y a une augmentation dans la filtration des fluides. Les capillaires laisseront donc passer davantage de liquide [78].

Au niveau des veinules, une réponse inflammatoire marquée, une production de ROS, une augmentation dans la perméabilité vasculaire observée par l'extravasation de l'albumine et une activation des macrophages et des mastocytes s'observent [81]. Il y a adhésion des leucocytes avec les cellules endothéliales, une migration transendothéliale des leucocytes et une adhésion entre plaquettes et leucocytes. Le tout engendre une réponse inflammatoire importante [82]. La reperfusion myocardique induit une importante accumulation de neutrophiles dans la zone précédemment ischémique, nombre variant entre deux et six fois celui que l'on retrouve dans le myocarde non-ischémique [83]. L'accumulation débute immédiatement au moment de la reperfusion et s'étend jusqu'à six heures post-reperfusion. Une deuxième phase d'accumulation s'observe aussi à 24 heures post-reperfusion [84]. Ce sera une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, une production de ROS et une sécrétion de cytokines, dont l'interleukine 1 β (IL-1 β) et le "*tumor necrosis factor*" α (TNF-

α), par les cellules endothéliales et les neutrophiles eux-mêmes qui vont attirer davantage de neutrophiles [85]. Au niveau des cellules endothéliales, les récepteurs P et E sélectines seront déterminants dans le roulement et l'adhésion des leucocytes. La β -intégrine des leucocytes interagit avec ICAM-1 ("*intercellular adhesion molecule*") des cellules endothéliales pour permettre un recrutement important de leucocytes [86]. Les cellules endothéliales et les leucocytes, en période de reperfusion, sont la source de la production de ROS via la xanthine oxydase. L'hypoxanthine accumulée pendant l'ischémie est métabolisée en O_2^- et en H_2O_2 avec l'arrivée de l'oxygène [87]. L'enzyme myéloperoxydase relâchée des neutrophiles génère de l'acide hypochloré en catalysant l'interaction entre le H_2O_2 avec un ion chlore. L'acide hypochloré est un puissant oxydant qui peut endommager ou chloriner de multiples cibles cellulaires et former d'autres puissants oxydants comme les chloramines [86]. Les ROS, couplés à l'accumulation des leucocytes, engendrent une augmentation dans la perméabilité vasculaire des veinules. L'utilisation de la SOD et d'un anticorps contre l'ICAM-1 prévient cette augmentation de la perméabilité vasculaire [78, 87, 88].

Enfin, le NO serait aussi impliqué dans la réponse inflammatoire. Une diminution de la eNOS, l'enzyme aboutissant à la production de NO et dépendante du calcium, ainsi qu'une diminution de nitrate et de nitrite sont observés en reperfusion. La restauration du NO permet une diminution de l'accumulation des leucocytes activés, de l'agrégation de leucocytes-plaquettes, de l'activation des mastocytes et prévient une altération de la perméabilité vasculaire [78, 87, 89].

Ainsi, le rôle des neutrophiles semble majeur pour l'amplification de la réponse inflammatoire. Les neutrophiles vont contribuer au nettoyage de la zone infarctée des cellules mortes et des débris cellulaires. Par contre, en raison du relâchement de leur granule cytoplasmique et des métabolites de l'acide arachidonique en plus de produire des ROS, ils peuvent léser les cellules, voire engendrer leur mort. La relâche d'enzymes protéolytiques comme les protéases sérines et élastases peut altérer la distribution des charges membranaires, augmenter la perméabilité membranaire facilitant la migration des neutrophiles et hydrolyser des protéines de la matrice extracellulaire et du plasma [90]. Les neutrophiles activés vont de

plus stimuler la phospholipase A2 (PLA₂) qui génère la leucotriène B4 (LTB₄) et le facteur activateur de plaquette (PAF). Cela va stimuler les neutrophiles, l'adhésion aux cellules endothéliales, le métabolisme oxydatifs et la dégranulation [86]. Une corrélation s'observe d'ailleurs entre les neutrophiles présents dans le myocarde et les lésions de reperfusion [91]. Il a été démontré, dans diverses études, qu'une délétion en neutrophiles induit une diminution de la taille de l'infarctus comparativement à un groupe témoin, suggérant un rôle contributoire majeur des neutrophiles dans les lésions de reperfusion [92, 93]. Les neutrophiles peuvent aussi sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8, l'« *interferon-inductible protein 10* » et le « *macrophage inflammatory protein-1 α* ». Cette sécrétion de cytokines est régulée par l'interféron γ , l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13. La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires permet l'expression des molécules d'adhésion sur les neutrophiles et cellules endothéliales, ce qui les attire et amplifie la réponse inflammatoire [94]. Une roue s'installe et la réponse inflammatoire ne fait qu'amplifier et causer des dommages au myocarde.

L'activation du complément, impliquée dans l'immunité innée et normalement engagée dans l'élimination des pathogènes, est aussi impliquée dans les lésions de reperfusion. La relâche de constituants membranaires lors des lésions apparentes au moment de l'ischémie et de la période de reperfusion active le système du complément par la voie classique qui stimule la réponse inflammatoire [95, 96]. L'expression de l'ARNm et des protéines composantes de la voie du complément sont augmentés à la suite d'un IM, dont les protéines C3 et C4 [97]. Le système du complément comporte principalement neuf protéines (C1 à C9) et peut s'activer par trois différentes voies : classique, alternative ou lectine. La protéine C réactive semble impliquée dans l'activation de la voie classique lors de la reperfusion. Les précurseurs zymogènes des protéines du complément circulent sous forme inactive, et sont activés localement. Dans ce cas-ci, ils le sont par les débris cellulaires qui lient le C1q pour ensuite activer C1, puis C4, C2 et C3. Finalement, les effecteurs C5 à C9 seront à leur tour activés et permettront le recrutement de cellules inflammatoires, essentiellement les neutrophiles [98]. Cibler les composants du complément lors de l'IM semblerait cardioprotecteur et pourrait

réduire les lésions de reperfusion : l'infusion d'un récepteur soluble du complément a diminué de façon significative la taille d'un infarctus dans un modèle d'ischémie-reperfusion [99].

Les ROS et l'activation du complément activent le "*nuclear factor kappa B*" (NF- κ B), un facteur de transcription nucléaire impliqué dans la réponse inflammatoire, dans l'adhésion cellulaire, dans le contrôle de la réplication, dans la survie cellulaire et dans l'apoptose [100]. NF- κ B se trouve sous sa forme inactive au niveau du cytoplasme lié à des régulateurs I κ B dont I κ B α et I κ B β . Lorsque les régulateurs sont phosphorylés par les I κ B kinase (I κ K), ils sont dégradés et permettent la translocation de NF- κ B au noyau qui vient se lier sur différents promoteurs pour engendrer la transcription de gènes cibles [101]. Un traitement avec un inhibiteur de I κ K β a montré une atténuation de la phosphorylation de I κ B α ainsi qu'une réduction de cytokines pro-inflammatoires et de la taille de l'infarctus [102]. Toutefois, des souris transgéniques exprimant un mutant de I κ B α , prévenant la translocation nucléaire de NF- κ B, ont montré une plus grande zone infarctée, ainsi qu'une augmentation d'apoptose [103]. NF- κ B agit à plusieurs niveaux et pourrait avoir un rôle dans la génération de la phase inflammatoire à l'origine des lésions de reperfusion, mais pourrait aussi avoir un certain effet cardioprotecteur en raison de ses propriétés qui encouragent la survie cellulaire.

L'activation du complément, la génération de ROS et l'activation de la voie NF- κ B stimulent la synthèse de cytokines. Effectivement, de nombreuses études ont montré une activation et une augmentation de la synthèse des cytokines dont le TNF- α et les IL (IL-1 β , IL-6, IL-8) au niveau du myocarde ischémique et reperfusé [104, 105]. TNF- α pourrait tout autant être cardioprotecteur que délétère. Des souris TNF- α KO (*knock out*) sont protégées contre une dysfonction chronique à la suite de l'IM et montrent une réponse inflammatoire moindre ainsi qu'une activité métalloprotéinase diminuée [106]. Toutefois, l'inhibition de TNF- α peut aussi être nuisible au rétablissement du myocarde [107]. De plus, le TNF- α donné avant l'ischémie montre une diminution de la taille de l'infarctus chez le porc au même titre que le préconditionnement [108]. Ces rôles contradictoires pourraient être dus à la double signalisation de cette cytokine via les récepteurs de type 1 (TNFR1) et de type 2 (TNFR2). La signalisation par le premier serait plutôt néfaste, tandis que le second serait protecteur [109]. TNF- α , tout comme l'IL-1, stimule l'expression de cytokines pro-inflammatoires, des

chémokines ainsi que des molécules d'adhésion et est impliqué dans le remodelage cardiaque post-infarctus [110]. L'IL-6 favorise l'hypertrophie cardiaque à la suite de l'IM [111], puis l'IL-8 participe au recrutement des neutrophiles dans le myocarde ischémique et reperfusé [100]. Les cytokines peuvent aussi induire l'apoptose (expliquée ultérieurement), mais ne sembleraient pas avoir un impact sur la taille de l'infarctus [112]. L'administration du récepteur soluble de TNF [113] et l'administration de pentoxifylline (inhibiteur de la synthèse de cytokines) ne montrent pas d'effets cardioprotecteurs lorsque donnés avant et après l'occlusion coronarienne [114].

Donc, une dysfonction endothéliale couplée à une accumulation de neutrophiles génèrent une activation de la réponse inflammatoire qui s'avère délétère, lorsqu'excessive, pour le myocarde. Une période inflammatoire incontrôlée conduit à des dommages tissulaires, à une inflammation chronique, à une cicatrisation et à de la fibrose du tissu ce qui nuit au bon fonctionnement de l'organe [115].

Les lésions de reperfusion décrites dans cette section pourraient aussi entraîner des dommages dans d'autres organes ou encore causer le syndrome de dysfonction multiple des organes. L'inflammation, la xanthine oxidase, qui entraîne la production de ROS, et les neutrophiles pourraient être à l'origine des dommages qui se répercutent sur d'autres systèmes [78]. Notre laboratoire a d'ailleurs démontré que l'inflammation pourrait causer la mort cellulaire par apoptose dans différentes régions du cerveau et pourrait être liée aux symptômes de dépression observés à la suite d'un IM [113, 114]. Une altération dans la perméabilité intestinale a aussi été documentée à la suite d'un IM, le processus inflammatoire pourrait en être la cause [116].

1.2.1.2.4 Les plaquettes

En plus de contribuer à la formation de la plaque athérome à l'origine de l'ischémie, les plaquettes ont un rôle dans les lésions de reperfusion.

La rupture de la plaque athéromateuse va exposer la matrice sous-endothéliale et entraîner l'activation plaquettaire au niveau de la lumière vasculaire. Au site de lésion, des

protéines de la matrice seront exposées dont le facteur de von Willebrand et le collagène. Ceux-ci recruteront les plaquettes via leur complexe de récepteur glycoprotéine Ib-V-IX (GPIb-V-IX) et la glycoprotéine VI (GPVI). Cette dernière a d'ailleurs récemment démontré un rôle essentiel pour l'activation initiale des plaquettes et pour l'adhésion à la matrice sous-endothéliale [117]. Dans un modèle de souris avec lésion vasculaire, l'inhibition du facteur GPVI abolit presque exclusivement la liaison des plaquettes à l'endothélium dénudé [117]. Ensuite, les plaquettes sont stabilisées au site de lésion par l'interaction entre les récepteurs intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ et la matrice. Les plaquettes seront d'abord reliées par des ponts fibrinogènes, mais pour stabiliser davantage les plaquettes entre elles, le facteur GPIIb-IIIa se liera au fibrinogène. Les plaquettes adhérentes et activées vont libérer plusieurs substances telles que la TXA_2 issue de l'acide arachidonique (AA) qui favorisera la formation de l'agrégat plaquettaire en attirant d'autres plaquettes au site et en causant une vasoconstriction. Le thrombus sera alors consolidé [118].

Bien que les plaquettes aient un rôle important dans la rupture de la plaque athérome qui aboutit à l'ischémie, celles-ci ont aussi un impact au moment de la reperfusion, car elles diminuent le flot sanguin localement et de façon distale. Le phénomène de « *no reflow* » a été décrit précédemment. Les plaquettes peuvent être en cause lors du bris du caillot qui expose la matrice sous-endothéliale, ce qui cause un agrégat plaquettaire. Par contre, de façon plus distale du site d'occlusion, une diminution du flot sanguin est aussi observée. D'une part, les plaquettes peuvent se détacher de l'agrégat principal et aller bloquer la circulation de façon plus distale. D'autre part, les plaquettes peuvent entraîner un vasospasme via la relâche de sérotonine, de TXA_2 et de radicaux libres. La prolongation de l'ischémie au niveau du tissu peut entraîner la mort d'autres cardiomyocytes [118].

En plus de se lier à l'endothélium lésé, les plaquettes peuvent aussi se lier directement à l'endothélium sain et aux leucocytes, ce qui génère la relâche de composés inflammatoires. Les plaquettes ont différentes sortes de granules et de substances inflammatoires, soit :

- les granules denses qui emmagasinent la sérotonine, les nucléotides adénines et guanines ainsi que l'histamine;

- les granules alpha qui sont les principales granules et la source de la β -thromboglobuline, du facteur plaquettaire 4, des facteurs de coagulations (fibrinogène et facteur von Willebrand) des facteurs mitogéniques (« *platelet-derived growth factor* », « *vascular growth factor* », « *transforming-growth factor* » (TGF)...), de la fibronectine, des protéines plasmatiques (albumines et immunoglobulines);
- les lysosomes qui contiennent des protéases et glycohydrolases;
- des médiateurs pro-inflammatoires du cytosol IL-1 β , le ligand du CD40;
- des médiateurs lipidiques comme le PAF, la TXA₂, la PGE₂.

Les rôles des différents médiateurs sont essentiellement de recruter des plaquettes, de contracter les vaisseaux ainsi que d'attirer les leucocytes et les cellules inflammatoires générant ainsi une réponse inflammatoire importante [118].

La liaison des plaquettes aux cellules endothéliales entraînera une altération du phénotype des cellules endothéliales en augmentant leurs propriétés chémotaxiques, adhésives et protéolytiques [118]. L'IL-1 β semble un médiateur majeur dans l'activation des cellules endothéliales par les plaquettes [119], ce qui conduira à l'accumulation des leucocytes, principalement les neutrophiles. La chemokine RANTES dérivée des plaquettes semble elle cruciale pour l'arrêt des neutrophiles au site lésé [120]. L'interaction entre les plaquettes et les neutrophiles se fera principalement par la P-sélectine plaquettaire et le "*P-selectin glycoprotein ligand-1*" des neutrophiles [121]. Les neutrophiles ainsi activés vont entraîner les effets inflammatoires et délétères mentionnés précédemment en plus de créer un amas plus important avec les plaquettes.

Plusieurs études ont montré, chez l'animal, que les plaquettes sont associées aux dommages de reperfusion et à une réponse pro-inflammatoire au niveau du myocarde [122, 123]. Par contre, d'autres ont démontré que les plaquettes seules ne contribuaient pas aux lésions de reperfusion [124], d'autant plus que l'agrégat plaquettaire pourrait avoir un certain rôle cardioprotecteur via la relâche par exemple du TGF- β 1 [125]. Toutefois, lors d'une sténose résiduelle, le groupe de Rousseau a montré qu'une thrombocytopenie réduisait la taille

de l'infarctus, mais n'avait pas d'effet sans sténose [126]. De plus, un antagoniste du facteur GPIIB-IIIa s'est montré efficace à améliorer la perfusion et la fonction contractile cardiaque dans une étude clinique chez le patient avec IM traité par angioplastie coronarienne [127]. Donc, inhiber l'adhésion des plaquettes pourrait s'avérer bénéfique à contrer les lésions de reperfusion dues à une mauvaise perfusion. Toutefois, la réponse inflammatoire générée et nocive ne dépend pas seulement des plaquettes, mais aussi des neutrophiles. Donc, l'inhibition des plaquettes n'est pas suffisante pour diminuer la taille de l'infarctus liée à l'inflammation et aux autres lésions de reperfusion.

1.2.1.2.5 L'apoptose

L'apoptose se décrit morphologiquement comme une rétraction progressive de la cellule, un bourgeonnement membranaire, une condensation du noyau et de la chromatine ainsi qu'une fragmentation de la cellule, de l'ADN conduisant à la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés. L'apoptose contribue aux lésions de reperfusion en augmentant la taille de l'infarctus. L'apoptose est une mort cellulaire programmée, déclenchée par une cellule en réponse à un signal, qui nécessite de l'énergie. C'est pourquoi elle survient essentiellement en période de reperfusion [128]. Elle peut s'initier pendant l'ischémie, mais elle survient majoritairement pendant la reperfusion où il y a restauration de l'oxygène et de l'énergie. Contrairement à la nécrose, l'apoptose génère peu d'inflammation. Le groupe de Anversa et al a démontré que la mort cellulaire en reperfusion est composée de 86% d'apoptose et de 14% de nécrose [129]. D'autres groupes ont de plus montré dans un modèle de lapin [130] et de chien [131] que l'ischémie seule ne conduit pas à de l'apoptose. La reperfusion est donc nécessaire pour voir le processus d'apoptose se finaliser et elle contribue donc de façon importante aux lésions de reperfusion.

Du côté moléculaire, l'apoptose peut être initiée par une perturbation de l'homéostasie cellulaire, par des signaux de stress qui activeront la voie intrinsèque [132] ou par des signaux extracellulaires (TNF α , ligand Fas) qui vont plutôt activer la voie extrinsèque de l'apoptose et ainsi déclencher la cascade des caspases [133]. Les caspases sont des protéines à cystéine, exprimées à l'état zymogène, et qui, pour être activées, doivent être clivées au niveau des résidus aspartates, se regroupant ainsi en hétérotétramère. Dans le

cytoplasme, la forme active des caspases peut être inhibée par des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP). Chez l'humain, 14 caspases sont répertoriées, dont certaines sont dites initiatrices (caspases 2,8,9,10) et d'autres effectrices (caspases 3,6,7) [134].

La voie intrinsèque de l'apoptose peut être activée par l'hypoxie, le stress oxydatif ou un manque de facteur de croissance. La famille de protéines BCL-2 régule en partie l'activation de l'apoptose via cette voie. Cette famille se divise en trois classes : anti-apoptotique (Bcl-2 et Bcl-XL), pro-apoptotiques (Bax et Bak) puis protéines BH (Bim et Bid). Ces protéines agissent en homodimère (Bcl-2-Bcl-2) ou en hétérodimère (Bcl-2-Bax). Elles ont toutes un domaine transmembranaire qui leur permettent de s'ancrer dans la membrane des mitochondries [135]. Les membres Bax et Bak forment un canal dans la membrane lipidique et peuvent être inhibés par les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 [136]. Un stimulus apoptotique vient activer les types BH-3 qui peuvent ensuite activer l'apoptose de deux façons: activer Bax ou Bak, leur permettant de s'insérer dans la membrane et ainsi augmenter la perméabilité mitochondriale ou en liant Bcl-2, ce qui permet la libération des protéines pro-apoptotiques afin qu'elles puissent s'ancrer dans la membrane et faire un pore pour augmenter la perméabilité [137]. Tous deux mènent au relâchement du cytochrome c. Puis, il y aura assemblage de l'apoptosome avec le *Apoptotic peptidase activating factor 1* (APAF-1), l'ATP et la caspase-9 [138]. La caspase-9 ira activer à son tour les caspases effectrices, dont la caspase-3 qui conduira à la dégradation de la cellule et à la formation de corps apoptotiques [128, 134].

En plus de relâcher le cytochrome c, qui en liant APAF-1 ira activer la caspase-9 puis la caspase-3, la mitochondrie relâche les facteurs SMAC/DIABLO qui lèvent l'inhibition de la caspase-3 et -9 en inhibant IAP. La mitochondrie relâche aussi d'autres facteurs facilitant l'apoptose, dont le facteur induisant l'apoptose (AIF), l'endonucléase G et les protéines nécessitant des hautes températures (*high-temperature-requirement protein A2*) qui enclenchent le relâchement d'Omi [139] (voir figure 2).

D'un autre côté, l'apoptose peut aussi être activée par la voie extrinsèque, c'est-à-dire par des signaux extracellulaires. Les signaux de l'environnement sont perçus par des

récepteurs de mort comme le TNFR1, Fas, DR (*death receptor*) 3, DR4, DR5, DR6 qui ont un domaine extracellulaire riche en cystéine responsable de la liaison du ligand et un domaine intracellulaire de mort (DD) [140]. Les ligands reconnus par ces récepteurs sont le TNF- α , le ligand Fas, la lymphotoxine, Apo3 et TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). Leur liaison conduira à la trimérisation de leur récepteur membranaire, puis au recrutement de protéines adaptatrices dont TRADD et FADD via le domaine DD des récepteurs. Celles-ci recruteront ensuite les initiateurs apoptotiques, la pro-caspase 8 et pro-caspase-3; le tout formera le complexe pro-apoptotique DISC (*death-inducing signaling complex*). Par un changement de conformation, la caspase-8 sera activée, tout comme les caspases effectrices pour conduire à l'aboutissement de l'apoptose [128, 134].

La caspase-8 peut aussi cliver Bid et engager le sentier apoptotique via la mitochondrie. Une fois Bid clivé, la partie terminale COOH se dirige vers la mitochondrie et entraîne la relâche du cytochrome c, dirigeant la cellule en apoptose. Les protéines FLIP ont été montrées inhibitrices de la voie extrinsèque en liant le complexe DISC et en inhibant l'activation de la caspase-8. SODD interagit aussi avec la partie DD des récepteurs de mort cellulaire, surtout au niveau de DR3 et du TNFR1, ce qui prévient la liaison des autres facteurs impliqués dans l'activation des caspases et de l'apoptose [141] (voir figure 2).

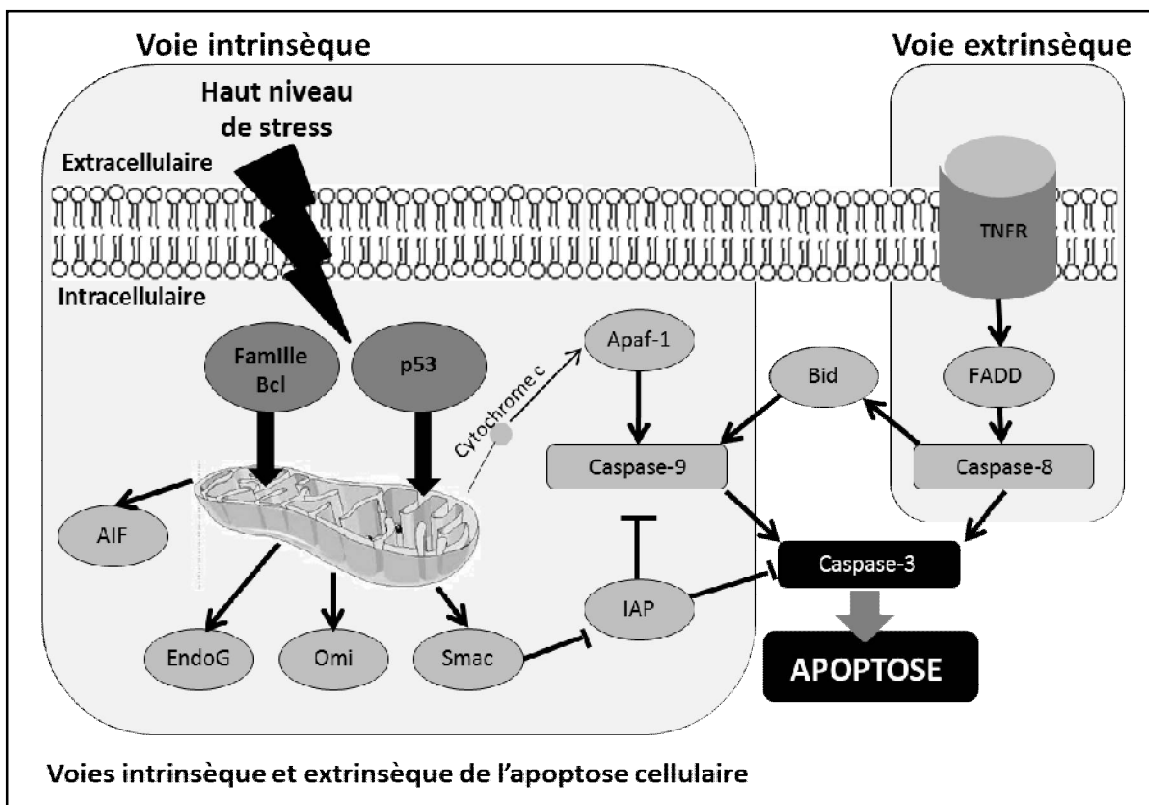


Figure 2. **Activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.** L'activation de la voie intrinsèque (encadré à gauche) implique la relâche du cytochrome c de la mitochondrie qui vient activer Apaf-1, la caspase-9, initiatrice de l'apoptose et ainsi former l'apoptosome avec l'ATP. Puis la caspase-3, effectrice de l'apoptose. Le tout est régulé par les protéines de la famille BCL et les facteurs AIF, l'endonucléase g, Omi et Smac encourageant l'apoptose, tandis que IAP vient l'inhiber. La voie extrinsèque (encadré à droite) s'active par la signalisation d'un récepteur de mort cellulaire lors de la liaison de son ligand (TNF est cité comme exemple), il y aura activation de la caspase-8 via un facteur FADD, puis de la caspase-3 ou encore par Bid qui engendra l'apoptose par le sentier mitochondrial.

L'activation de la voie intrinsèque et de la voie extrinsèques va aboutir à l'ouverture du mPTP et à la relâche du cytochrome c. Lors de la reperfusion, une augmentation du pH ou du calcium peut induire l'ouverture de ce pore, enclenchant ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose [34]. L'inhibition de l'ouverture de celui-ci peut être une stratégie efficace afin de contrer les lésions de reperfusion. La cyclosporine A inhibe l'ouverture du pore et a montré une diminution de la taille de l'infarctus de plus de 50% [142]. Une étude clinique réalisée chez 58

patients avec IM démontre et confirme que la cyclosporine A diminue la taille de l'infarctus [77].

Finalement, le fait d'inhiber pharmacologiquement l'apoptose réduit la mort cellulaire et la taille de l'infarctus. La surexpression de Bcl-2 dans un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion s'est aussi avérée efficace afin de contrer les lésions de reperfusion, le tout confirmant le rôle important de l'activation de la voie intrinsèque et de la voie extrinsèque de l'apoptose dans la détermination de la taille d'un infarctus [143, 144]. Les bloqueurs de canaux ioniques s'avèrent aussi efficaces afin de contrer l'apoptose en reperfusion. Ceux-ci peuvent donc être impliqués dans l'activation de l'apoptose. Les bloqueurs calciques Clevidipine [145] et Nicardipine [146] se sont montrés efficaces pour diminuer l'apoptose et la taille de l'infarctus lorsque donnés à la fin de l'ischémie ainsi qu'en reperfusion. Bloquer l'influx de sodium s'est avéré efficace pour diminuer l'apoptose via l'inhibition de l'échangeur sodium-calcium. La diminution de l'influx de sodium semblerait même davantage importante dans l'activation de l'apoptose que le calcium [147, 148]. Puis, la prévention de l'efflux de potassium montre une diminution de l'apoptose *in vivo* et *in vitro* [149]. Le NO pourrait aussi être impliqué dans l'activation de l'apoptose, son rôle est toutefois contradictoire dans les lésions de reperfusion. Quelques études montrent un effet pro-apoptotique du NO; soit dans des cardiomyocytes isolés de rat [150] et d'humain [151]. Toutefois, la majorité des études montrent plutôt un rôle protecteur du NO en diminuant l'apoptose et la taille de l'infarctus [152]. Une dépolarisation mitochondriale et une accumulation mitochondriale de calcium, libérant ainsi la cellule, sont des mécanismes proposés pour expliquer plutôt l'effet protecteur du NO [153].

L'apoptose et la mort cellulaire générées en ischémie et reperfusion conduisent à un remodelage du ventricule gauche [154]. Du tissu cicatriciel se formera pour remplacer les cellules mortes et endommagées, ce qui va altérer la fonction cardiaque. Le cœur a des voies de cardioprotecteurs endogènes qui peuvent être activées de différentes façons. De plus, différentes approches telles que le pré et post conditionnement ou une approche davantage pharmacologique activent ces voies pour permettre de protéger le cœur contre les lésions de

reperfusion. Ainsi, la taille de l'infarctus et la perte de la fonction cardiaque peuvent être prévenues.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées afin de diminuer les lésions de reperfusion et permettre une diminution de la taille de l'infarctus, et ainsi une cardioprotection. Ces stratégies sont étudiées dans le laboratoire, où différentes approches pharmacologiques ou nutraceutiques peuvent être utilisées pour permettre une cardioprotection et une diminution de la taille de l'infarctus, comme c'est le cas de la présente thèse qui étudie l'effet cardioprotecteur des acides gras.

1.3 Cardioprotection

C'est en 1986 que *Murry et al* ont mis au point un concept afin de protéger le myocarde des lésions de reperfusion : le pré-conditionnement [155]. Il s'agit d'induire, de façon délibérée, de courtes périodes d'ischémie-reperfusion avant l'ischémie de plus longue durée. Cette méthode réduit de façon importante la taille de l'infarctus. Chez le chien, l'occlusion à quatre reprises pendant dix minutes d'une artère coronaire séparée par 20 minutes de reperfusion prévient la mort cellulaire des cardiomyocytes [156]. Le pré-conditionnement a été réalisé chez le patient avec chirurgie de pontage coronarien, mais l'approche étant invasive, une méthode alternative devait être utilisée [157]. Le pré-conditionnement peut aussi se faire par de brèves périodes d'ischémie à d'autres tissus et organes. Le groupe de Przyklenk a démontré, dans un modèle canin, que de brèves périodes d'ischémie de l'artère circonflexe réduisaient la taille de l'infarctus [158]. Cette méthode s'est aussi montrée efficace chez le patient avec chirurgie cardiaque [159]. Deux fenêtres de protection s'observent avec le pré-conditionnement, soit immédiatement après les brèves périodes d'ischémie s'étendant sur trois à quatre heures, puis une deuxième qui débute 24 heures plus tard et qui s'étend jusqu'à 72 heures. Le tout contribue à diminuer la taille de l'infarctus, la dysfonction cardiaque et les arythmies [160]. D'un côté pharmacologique, les anesthésiques volatils halogénés s'avèrent aussi cardioprotecteurs lorsqu'administrés avant la chirurgie cardiaque, tout comme les opioïdes [161]. Toutefois, le pré-conditionnement ne convient pas à une situation pathologique lorsque le patient se présente avec un épisode d'IM.

Dès lors, le post-conditionnement a donc été mis au point. Il s'agit d'un procédé similaire où de brèves périodes d'ischémie sont faites avant la levée définitive de l'ischémie [162]. Ce procédé a été démontré et appliqué à plusieurs reprises chez le patient avec IM et angioplastie coronarienne [163, 164]. Des séries de petites pressions réalisées avec le ballonnet montrent une diminution de la taille de l'infarctus [165]. Par contre, cette approche demeure invasive et exclusive aux patients avec IM et angioplastie.

Les mécanismes impliqués sont une diminution de l'apoptose corrélée avec une diminution du stress oxydatif [166], une diminution des arythmies lors de la reperfusion [167] ainsi qu'une amélioration de la fonction endothéliale. Une diminution de l'œdème cellulaire, de l'expression de la P-sélectine, de l'accumulation des neutrophiles, de la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine, de la peroxydation lipidique et des radicaux libres a été démontrée dans un modèle canin où la fonction endothéliale se montre améliorée avec le post-conditionnement, de manière comparable au pré-conditionnement [162].

De plus, le post-conditionnement, tout comme le pré-conditionnement, peut aussi être induit par l'activation de l'une ou l'autre des deux voies de cardioprotection : *Reperfusion Injury Kinase Signalling* (RISK) [168] ou *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE) [169]. Plusieurs molécules endogènes ainsi que des composés pharmacologiques activent l'une ou l'autre de ces voies et s'avèrent donc cardioprotecteurs. Notre laboratoire étudie différents composés qui activent ces voies de cardioprotection et permettent ainsi une diminution de la taille de l'infarctus.

1.3.1 Voie de la "*Reperfusion Injury Kinase Signalling*" (RISK)

L'activation de la voie RISK implique les protéines kinases Akt (protéine kinase B) [170] et le «p42/p44 extra-cellular signal-regulated kinase» Erk1/2 [171], une protéine de la famille des MAPK : *mitogen-activated protein kinase* qui, lorsqu'activées au moment de la reperfusion, confèrent une cardioprotection. Cette voie implique aussi d'autres kinases comme la protéine kinase C (PKC : l'isoforme PKC-ε), PKG, p70s6K (protéine ribosomale kinase S6 de 70 kDa) et le GSK-3β (*glycogen synthase kinase 3*) qui sont cardioprotectrices. À l'inverse, PKC-δ et rho-kinase A inhibent la voie RISK et conduisent à une augmentation de la taille

d'un infarctus [168, 172]. L'activation de la voie RISK converge vers l'inhibition du mPTP [173].

Les voies PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt et Erk1/2 peuvent s'activer par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les récepteurs tyrosine kinase de par la liaison de leurs ligands. Par exemple, l'adénosine, la bradykinine ainsi que les opioïdes lient leur RCPG, tandis que l'« *insulin growth factor* » (IGF) -1 et le « *fibroblast growth factor* » (FGF) -2 lient leur récepteur de croissance, ce qui aboutit à l'activation de la PI3K et/ou de Erk1/2. La PI3K ira à son tour activer Akt de par sa phosphorylation en position sérine et thréonine [174]. Akt va par la suite phosphoryler et activer des cibles intracellulaires aboutissant à la survie de la cellule. ERK1/2 régule plusieurs cibles impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation ainsi que la survie cellulaire et montre une protection dans le cadre d'une ischémie-reperfusion. Parmi ces cibles, notons :

- les protéines impliquées dans le métabolisme du glucose et des protéines (GSK-3, le transporteur de glucose 4);
- les protéines impliquées dans l'apoptose (BAD, BAX, DIM, p53 et les caspases);
- des facteurs de transcriptions (IKK- α et les protéines Forkhead);
- plusieurs autres protéines telles que la p70s6K, eNOS et la PKC [175].

D'abord, la voie PI3K et Erk1/2 vont phosphoryler et inactiver des protéines pro-apoptotiques. L'activation de la voie PI3K/Akt et de Erk1/2 inhibe le changement conformationnel de la protéine pro-apoptotique Bax, l'empêchant de transloquer vers la mitochondrie et d'ainsi causer l'apoptose [176]. Akt et Erk1/2 peuvent aussi phosphoryler Bad directement [177] ou indirectement via le p70s6K [178], et ainsi l'inactiver. Les deux kinases peuvent aussi inhiber BIM [179]. Puis, en phosphorylant Mdm2, Akt et Erk1/2 encouragent la dégradation du facteur pro-apoptotique p53 [180]. Le tout conduit à une diminution de l'activation de l'apoptose.

Puis, Akt et Erk1/2 vont venir inhiber la relâche mitochondriale du cytochrome c par phosphorylation [181] et l'inactivation des caspases, dont les caspase-9 et 3, puis par

l'inhibition de l'ouverture du mPTP. Erk1/2 a montré une inhibition de la caspase-3 dans des cellules hématopoïétiques [182], tandis qu'Akt a montré une phosphorylation et l'inactivation de la pro-caspase-9 [183]. D'autres protéines activées par Akt et Erk1/2 se sont aussi montrées efficaces à inhiber l'ouverture du mPTP. Akt phosphoryle eNOS [184], entraînant la production de NO et ce dernier peut inhiber l'ouverture du mPTP [185]. La voie PI3K/Akt peut activer la PKC, ce qui cause l'activation de Raf-1 entraînant ainsi la phosphorylation et l'inactivation de BAD [186].

Enfin, Akt et Erk1/2 peuvent phosphoryler des modulateurs de facteurs de transcriptions. IKK- α , qui cause la translocation de NF- κ B au noyau, est phosphorylé et activé par Akt [187]. NF- κ B peut induire l'apoptose lorsque généré par la réponse inflammatoire, par exemple, mais peut aussi activer la transcription des gènes impliqués dans la survie cellulaire comme dans le cas d'Akt. Akt phosphoryle aussi le facteur de transcription *Forkhead* pour le séquestrer dans le cytosol ce qui prévient la transcription de gènes impliqués dans la mort cellulaire comme le Fas ligand [188]. Erk1/2 phosphoryle la protéine ribosomale p90rsk qui régule les gènes exprimés par le « *cAMP-response element binding* » impliqués dans la survie cellulaire [189] (voir figure 3 [172]).

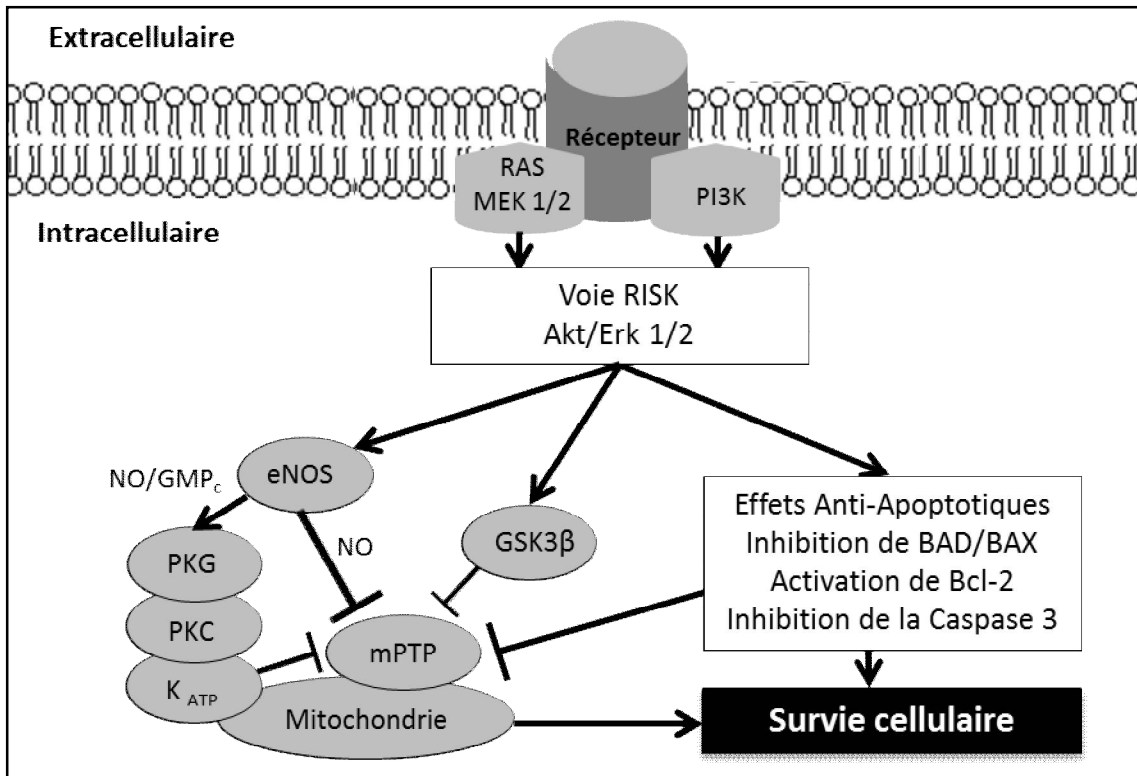


Figure 3. **Activation de la voie RISK.** L'activation des récepteurs tyrosine kinase et des récepteurs couplés aux protéines G vont activer les kinases Akt et Erk1/2 pour encourager la survie cellulaire via différents effecteurs : la synthèse du monoxyde d'azote (eNOS), la protéine kinase G (PKG), la protéine kinase C (PKC), le canal potassique sensible à l'ATP (K_{ATP}) et la "glycogen synthase kinase 3 beta" (GSK3β) qui vont inhiber l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) et ainsi inhiber l'apoptose [172].

L'activation de la voie RISK via Akt et Erk1/2 dans les premières minutes de reperfusion montre une cardioprotection. Plusieurs facteurs endogènes montrent une activation de la voie RISK : l'insuline, les facteurs de croissance, la cardiotrophine-1, l'urocortine, l'enzyme hydroxyl-3-méthylglutaryl-co-enzyme A (HMG-CoA) reductase via son inhibition, et les ligands des RCPG (bradykinine, adénosine, opioïdes) [175].

L'insuline administrée au moment de la reperfusion s'avère cardioprotective en diminuant l'apoptose. L'activation de la voie PI3K/Akt est impliquée dans cette cardioprotection où l'activation d'Akt conduit à la phosphorylation de p70s6K, de Bad ainsi

que de eNOS ce qui contribue à l'effet protecteur [190, 191]. L'IGF1 diminue aussi la taille de l'infarctus lorsque surexprimé au moment de la reperfusion en diminuant la mort cellulaire par apoptose et par nécrose. Les mécanismes impliqués sont une activation de Akt, de ERK1/2, la stimulation de l'expression de Bcl-2, l'inhibition de Bax, de Bad et de la caspase-3 ainsi que l'inhibition de l'ouverture du pore mPTP [192, 193].

Le TGF β 1 diminue la taille de l'infarctus et la mort cellulaire par apoptose de manière dépendante de Erk1/2 lorsque donné au début de la reperfusion [194]. Le FGF induit aussi une cardioprotection dépendante de Erk1/2 en raison de la production de NO et de l'activation de la PKC impliquant possiblement le canal potassique dépendant de l'ATP [195, 196]. Les facteurs de croissance "*vascular endothelial growth factor*", "*hepatocyte growth factor*", "*endothelium growth factor*", "*nerve growth factor*" et "*platelet derived growth factor*" pourraient aussi activer Erk1/2 et donc s'avérer cardioprotecteurs [175].

La cardiotrophine-1 a une action hypertrophique, mais est aussi cardioprotectrice via l'activation de Erk1/2 et de la voie PI3K/Akt. L'urocortine est exprimée après une longue période d'ischémie. Elle peut activer Erk1/2 et la voie PI3K/Akt en reperfusion afin de diminuer l'apoptose et la taille de l'infarctus. Son effet est aboli par le PD-098059, un inhibiteur de Erk1/2, puis par la Wortmannin et le LY294002, des inhibiteurs de la PI3K [197].

L'activation des RCPG s'avère aussi cardioprotectrice par les voies MAPK et PI3K/Akt. L'adénosine a un effet cardioprotecteur en activant la voie RISK en liant ses récepteurs A1 (associé à une protéine Gi), A2 (A_{2A} et A_{2B} associés à une protéine Gs) et A3 (associé à une protéine Gi) de l'adénosine [198]. L'activation de ses récepteurs est associée à une augmentation de l'activité de Erk1/2 où l'effet d'un agoniste de ces récepteurs est bloqué par l'utilisation du PD-098059, un inhibiteur de Erk1/2 [199]. L'activation du récepteur A_{2A} de l'adénosine au moment de la reperfusion montre une diminution significative de la taille de l'infarctus par la voie PI3K/Akt et la diminution de la caspase-3 [200]. Aussi, la bradykinine, par l'activation de son RCPG B2 associé à la protéine Gq, active la PI3K et son effet cardioprotecteur semble dépendant de la eNOS. L'utilisation de la Wortmannin, un inhibiteur

de la PI3K, prévient l'effet cardioprotecteur de la bradykinine [201]. Toutefois, celle-ci active aussi Erk1/2 et promeut la survie cellulaire d'une manière PI3K indépendante [202]. Les opioïdes exercent un effet cardioprotecteur en activant la voie PI3K/Akt et en diminuant la taille de l'infarctus. Ils agissent sur différents RCPG, soit les mu (μ), delta (δ) et kappa (κ) [203] tous associés à une protéine Gi. Ainsi, l'activation de plusieurs RCPG active la voie RISK et confère une cardioprotection.

L'activation de la voie PI3K/Akt indépendante des récepteurs tyrosine kinase et des RCPG peut aussi se faire. L'inhibition de la HMG-CoA reductase protège le cœur indépendamment de l'effet hypocholestérolémiant. Les statines ont effectivement montré une activation de la voie PI3K/Akt dans des cellules endothéliales [204], et aussi dans un cœur isolé de souris avec ischémie et reperfusion [205]. Cet effet serait dépendant de l'activation de la eNOS. Donc, l'activation de la voie RISK peut se faire d'une autre façon que par l'activation de récepteurs.

Plusieurs autres composants endogènes peuvent activer la voie RISK, tout comme de nombreux composés pharmacologiques. Selon les mécanismes d'activation mentionnés ci-haut, les statines, en inhibant la HMG-CoA reductase [206, 207], les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, en inhibant la dégradation de la bradykinine, la morphine, en activant les récepteurs aux opiacées [208], une thérapie utilisant l'insuline [209], diminuent la taille de l'infarctus par l'activation de la voie RISK. Chez le patient avec IM et reperfusé à l'aide d'agents thrombolytiques ou par angioplastie coronarienne, l'adénosine s'est avérée efficace pour diminuer la taille de l'infarctus lorsque donnée de façon intra-veineuse dès le début de la reperfusion [210, 211]. Les perspectives concernant l'utilisation d'une thérapie adjuvante à la thrombolyse et à l'angioplastie afin de diminuer les lésions de reperfusion seraient d'administrer des agents cardioprotecteurs directement dans les coronaires au niveau de la région myocardique à risque. Ainsi, des facteurs de croissance pourraient être injectés directement au niveau du cœur pour permettre l'activation de la voie RISK, mais aussi possiblement pour permettre une régénération tissulaire afin de régénérer le muscle cardiaque détruit lorsque couplé à des cellules souches, par exemple [212, 213].

Dans cette présente thèse, la voie RISK sera impliquée et discutée dans l'effet des acides gras sur l'IM.

1.3.2 Voie de la "*Survivor Activating Factor Enhancement*" (SAFE)

La voie de cardioprotection SAFE implique l'activation de la voie « *Janus Kinases* »/ « *Signal transducer activator of transcription* » JAK/STAT, le TNF- α , la PKG ainsi que la sphingosine [169]. Tel que mentionné précédemment, l'augmentation de TNF- α a été démontrée lors de l'ischémie et de la reperfusion [104]. Le TNF- α peut occasionner des lésions de reperfusion par son signalement via le TNFR1. La taille de l'infarctus des souris déficientes en TNF- α est moindre que dans le cas des souris de type sauvage. L'expression de NF- κ B est aussi diminuée, tout comme l'expression des chémokines et des molécules d'adhésion. En ce qui a trait à la fonction cardiaque, elle est améliorée en période de reperfusion lors d'une ischémie-reperfusion [214]. Tout autrement, des cardiomyocytes pré-traités au TNF- α montrent une résistance accrue au stress ischémique [215]. Cette même cytokine est donc aussi cardioprotectrice en raison de son récepteur TNFR2. Ainsi, le TNF- α a un effet cytotoxique en activant son récepteur TNFR1, mais il est protecteur, à faible dose, grâce à son récepteur TNFR2 [216]. Une étude réalisée dans le laboratoire du Dr Rousseau chez le porc a aussi démontré un rôle protecteur de TNF- α de façon similaire au pré-conditionnement [108].

Le TNF- α exerce son effet protecteur par l'activation de la sphingosine, la PKC, le canal potassique ATP dépendant, l'activation de NF- κ B et la fermeture du mPTP, mais de manière indépendante à la voie RISK [217]. Dans des cœurs isolés de rats soumis à une ischémie-reperfusion, le TNF- α a montré une cardioprotection par l'activation de canaux potassiques par le calcium, ce qui entraîne l'inhibition de l'ouverture du mPTP [218]. La sphingosine est aussi une cible effectrice du TNF- α . La sphingosine peut être phosphorylée par la sphingosine kinase de type 1 ou 2 pour aboutir à la formation de la sphingosine-1-phosphate. Elle joue un rôle dans la régulation de la mitose, dans l'apoptose cellulaire et dans le réarrangement du cytosquelette [219]. Puis, il a aussi été démontré que l'effet cardioprotecteur du TNF- α n'est pas dépendant de la voie PI3K/Akt ni de Erk1/2. Le TNF- α

ne montre pas d'activation de ces kinases. Le Wortmannin, un inhibiteur de la PI3K, ainsi que le PD-98059, un inhibiteur de Erk1/2, n'abolissent pas l'effet du TNF- α . Cet effet est davantage STAT-3 dépendant [220]. TNF- α est donc impliqué dans une voie de cardioprotection par l'activation de la voie JAK/STAT-3.

La liaison du TNF- α sur son récepteur engendrera la phosphorylation de deux protéines JAK. Celles-ci vont s'autophosphoryler et recruter les protéines STAT, puis vont les phosphoryler pour les activer. La forme phosphorylée de STAT va entraîner sa dimérisation et sa translocation au noyau afin de promouvoir la transcription de gènes cibles. L'activation de STAT-3 entraîne l'expression de gènes impliqués dans la survie et dans la prolifération cellulaire. STAT-3 augmente entre autres l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-Xl et Mcl-1. De plus, STAT-3 diminue l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax ou encore STAT-3 phosphoryle Bad pour le rendre inactif. Ces effets anti-apoptotiques font de lui un facteur impliqué dans la cardioprotection [169, 220].

L'inhibition de la phosphorylation de STAT-3 abolit l'effet cardioprotecteur [221]. Le pré [222] et le post conditionnement [223] montrent une activation de STAT-3. De plus, d'autres composés montrent une activation de STAT-3 et une cardioprotection, dont l'insuline [224], l'érythropoïétine [225] et la morphine [226]. STAT-3 est donc bénéfique au moment de la reperfusion.

1.3.3 Lien entre la voie RISK et SAFE

La voie RISK et SAFE ne sont pas totalement exclusives l'une de l'autre. Plusieurs composés montrent une action au niveau des deux voies : insuline, érythropoïétine, opioïdes... De même, il pourrait y avoir un lien existant entre les deux voies. Il a été démontré que la sous-unité p85 de la PI3K peut lier STAT-3 phosphorylé, ce qui entraîne la phosphorylation des tyrosines kinases et l'activation d'Akt [227]. Au niveau du pré-conditionnement, une déficience en STAT-3 empêche la phosphorylation d'Akt dans des cardiomyocytes. Inversement, l'inhibition de la PI3K via le Wortmannin inhibe la phosphorylation de STAT-3 [228]. Avec les opioïdes, afin de préserver l'effet cardioprotecteur, la voie PI3K/Akt ainsi que

la voie JAK/STAT sont nécessaires [226]. Puis, autrement, la PGE2 a un effet cardioprotecteur via l'activation de STAT-3, mais de manière dépendante à Erk1/2 [229].

Notre laboratoire étudie l'impact de l'alimentation sur l'IM et sur l'activation des voies de cardioprotection. Plus spécifiquement, sur le rôle des AG essentiels, ω -3 et ω -6, sur l'IM. Bien que notre laboratoire ait établi qu'une diète riche en ω -3 s'avère cardioprotectrice contrairement à une diète riche en ω -6, celle-ci doit être présente dans la diète avant l'IM pour montrer une cardioprotection [230]. Le but des études de cette thèse était donc de se pencher sur une approche davantage clinique et d'utiliser un métabolite des ω -3, soit la résolvine D1 (RvD1) au moment de l'IM. Puis, d'élucider l'effet des AG essentiels et de leurs métabolites lors d'un IM.

Chapitre 2. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 et oméga-6

Les AG sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe. Ils sont dits insaturés ou saturés dépendamment s'ils contiennent une liaison double ou non. De plus, ils sont polyinsaturés s'ils en possèdent plusieurs, ou monoinsaturés s'il n'en possède qu'une seule. Les AG diffèrent par le nombre de carbone qui les constitue ainsi que par la structure conférée par les liaisons doubles [231]. Les AG oméga-3 (ω -3) et oméga-6 (ω -6) sont des AG polyinsaturés tandis que l'oméga-7 (ω -7) et l'oméga-9 (ω -9) sont monoinsaturés. Seuls les deux premiers sont dits essentiels; ils ne sont pas synthétisés par les mammifères, ils sont donc requis dans l'alimentation [232].

Les gras monoinsaturés sont retrouvés dans les avocats, les noix (noix de cajou, pacanes, amandes, arachides) et les huiles végétales (canola, olive, arachide, carthame, sésame, tournesol). Comparativement aux gras saturés qui se retrouvent dans la viande (bœuf, poulet, agneau, porc, veau), l'huile de coco, les produits laitiers (beurre, fromage, lait entier), le saindoux et le shortening, les gras insaturés, mono ou polyinsaturés, sont à privilégier, particulièrement les polyinsaturés [233].

L'apport alimentaire principal d' ω -3 s'obtient à travers les poissons, puisqu'ils se nourrissent de phytoplanctons, principales sources d' ω -3. Le maquereau, le hareng, les anchois, le saumon, le thon rouge ou blanc, la sardine ou la truite sont d'ailleurs des sources importantes d'AG ω -3 [234, 235]. Les principales sources végétales d' ω -3 sont les huiles de lin et de canola, les noix de Grenoble, les graines de lin, de chia ou de chanvre, l'huile et les graines de citrouille ainsi que certains légumes verts. Les ω -6, eux, s'obtiennent à partir des céréales, des œufs, des graisses animales, des huiles végétales, de tournesol, de sésame, de bourrache, d'onagre, de cassis, la spiruline ainsi que l'acide linoléique conjugué. Enfin, les ω -7 proviennent de l'huile de palme ainsi que de l'huile de noix de macadam tandis que les ω -9 proviennent de l'huile d'olive, de l'huile de colza, du clou de girofle et des graines de moutarde. Ils ne sont toutefois pas essentiels, car ils sont synthétisés à partir d'acétyl-CoA, un

produit émanant, tel que décrit précédemment, du métabolisme des glucides, lipides et acides aminés [236].

2.1 Structure et nomenclature

La structure des AG est une longue chaîne de carbone, dont la plupart possèdent un nombre pair d'atomes. Ils sont généralement synthétisés par enchaînement de deux molécules de carbones. Les AG diffèrent entre eux par le nombre d'atomes de carbone les constituant : les AG dits volatils en ont de deux à quatre, ceux portant une chaîne courte de six à dix, ceux avec une chaîne moyenne de 12 à 14, puis ceux avec une chaîne longue ont plus de 16 atomes de carbone [231]. De plus, selon leur orientation spatiale, ils sont dits cis ou trans. Le premier terme signifie que les atomes d'hydrogène de la double liaison sont du même côté, tandis que dans l'autre cas, ils sont de part et d'autre de celle-ci [17, 237]. Les gras dits trans sont à éviter, car ils sont le résultat d'une transformation chimique nommée hydrogénation partielle résultant du passage de l'huile d'un état liquide à solide. Les margarines dites hydrogénées, les aliments commerciaux frits, les produits de pâtisseries (beignes, aliments frits ou panés, muffins, etc.) contiennent généralement des gras trans industriels. Il y a toutefois aussi les gras trans naturels qui eux ne représenteraient pas un grand risque pour la santé cardiovasculaire [238]. Ceux-ci sont le résultat d'une hydrogénation biologique des gras insaturés de l'alimentation des ruminants qui subissent une transformation par l'action de leurs bactéries intestinales. Donc, les produits provenant des ruminants (vaches, moutons, chèvres) contiennent des gras trans naturels en quantité infime.

Selon la nomenclature nationale normalisée, une fois le total d'atomes de carbone de la molécule dénombré, le premier carbone est identifié à partir du groupement carboxyle (carbone 1), puis les autres sont identifiés dans l'ordre (2,3...). Les AG sont notés **n:m**, où **n** représente le nombre total de carbone, **m** le nombre de liaison double, et entre parenthèse on y retrouve les numéros du ou des carbones portant l'insaturation. Une autre méthode, plus couramment utilisée par les nutritionnistes, est la nomenclature oméga. Dans ce cas, le dernier carbone de la chaîne, celui du groupe méthyle (CH₃), est le premier carbone et il est nommé oméga (ω). Depuis celui-ci, les autres carbones sont numérotés, et celui portant l'insaturation détermine le type d'AG ω -() [17, 231]. Cette méthode est utilisée dans la présente thèse.

Les AG ω -3 ont donc une première liaison double entre le 3^e et le 4^e carbone, tandis que les AG ω -6 regroupent ceux ayant une première liaison double entre le 6^e et le 7^e carbone à partir du méthyle terminale. Les composés les plus simples des familles ω -3 et ω -6 sont respectivement l'acide alpha-linolénique (ALA) ainsi que l'acide linoléique (LA). Ils sont obtenus à travers les sources végétales et sont représentés à la figure 4 [232].

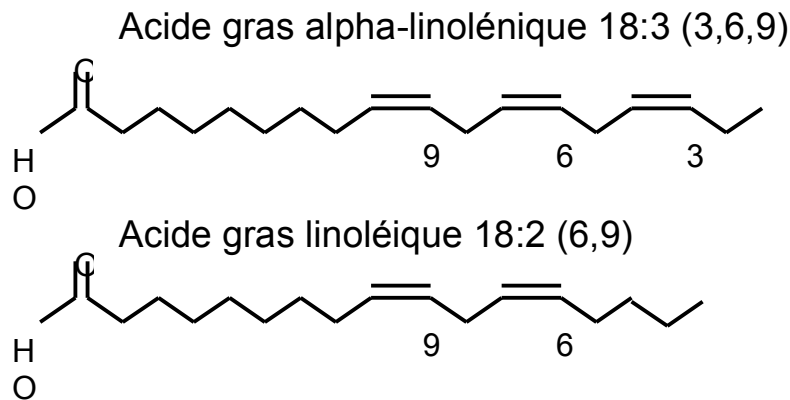


Figure 4. **Structure et nomenclature des AG alpha-linolénique (ALA) et linoléique (LA).** La première liaison double rencontrée à partir du carbone en méthyle terminale détermine le type d'AG oméga.

De plus, l'ALA peut être métabolisée en acide eicosapentaénoïque (EPA) ainsi qu'en acide docosahéxaénoïque (DHA), et le LA en acide arachidonique (AA). Ces derniers peuvent aussi être consommés directement via le poisson ou les graisses animales. Par ailleurs, le LA aboutit à la formation d'acide- γ -linoléique (GLA) qu'on retrouve dans plusieurs huiles végétales et qui est un précurseur de l'acide dihomog- γ -linoléique (DGLA). L'ALA, le LA, l'EPA, le DHA, l'AA et le DGLA représentent les principaux ω -3 et ω -6 biologiquement actifs, mais on en retrouve plusieurs autres formes [231].

2.2 Métabolisme des oméga-3 et oméga-6

Une fois ingérés, les AG sont dégradés par β -oxydation afin d'en libérer de l'énergie ou sont stockés dans les graisses selon les besoins. L'oxydation des AG est un procédé fortement exergonique qui assure la formation de nombreux ATP comme il a été décrit précédemment. À poids égaux, les AG fournissent deux fois plus d'énergie que le métabolisme des glucides et protéines [17]. Sinon, ils sont constituants des membranes, et sont emmagasinés dans les graisses où ils sont nécessaires pour le fonctionnement de divers organes et systèmes tels le système cardiovasculaire, cérébral et hormonal. Enfin, ils ont un impact important dans la réponse inflammatoire. À titre d'exemple, les ω -6 sont indispensables au maintien de la perméabilité de la peau. Une déficience nutritive en cet AG aboutit à des maladies de peau ou à une perte d'eau excessive par l'épiderme [239]. Les ω -3 sont une partie importante de régions cérébrales, car ils participent à la maturation de la rétine ainsi qu'au développement du système nerveux central [240]. Finalement, les ω -3 et ω -6 sont précurseurs des eicosanoïdes prostaglandines, leucotriènes, lipoxines et des métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation.

Une fois acquis par la diète, le LA, précurseur des ω -6, et l'ALA, des ω -3, seront pris par la Δ 6 désaturase qui leur ajoutera une liaison double. Cette étape, essentielle au début de la réaction, est aussi celle limitante. Celle-ci permettra d'aboutir à la formation de la GLA (18 :3 n-6) membre des ω -6 et à l'acide stéaridonique (18 :4 n-3) pour les ω -3 [241]. Comme l'activité de la Δ 6 désaturase est lente, le précurseur alimentaire ω -6 GLA peut être utilisé de façon plus efficace pour le métabolisme des ω -6. Puis, l'élongase leur ajoute deux atomes de carbone chacune pour aboutir à la DGLA (20 :3 n-6) et à l'acide eicosatétraénoïque (20 :4 n-3). Une autre désaturase, la Δ 5, vient compléter la molécule en y ajoutant une seconde liaison double afin d'obtenir pour les ω -6 l'AA (20 :4 n-6) et pour les ω -3 l'EPA (20 :5 n-3). Une étape additionnelle avec l'élongase permet d'obtenir l'acide adrénique (22 :4 n-6) et l'acide docosapentaénoïque (22 :5 n-3). Pour les ω -6, la Δ 4-désaturase aboutira à la formation de l'acide tétracosapentaénoïque (22 :5 n-6). Du côté des ω -3, une élongase ajoutera à nouveau deux carbones pour obtenir l'acide tétracosapentaénoïque (24 :5 n-3), la Δ 6-désaturase

aboutira à la formation de l'acide tétracosahexaénoïque (24 :6 n-3) et un tour de β -oxydation conduira à la formation du DHA (22 :6 n-3) [242] (voir figure 5 [242]).

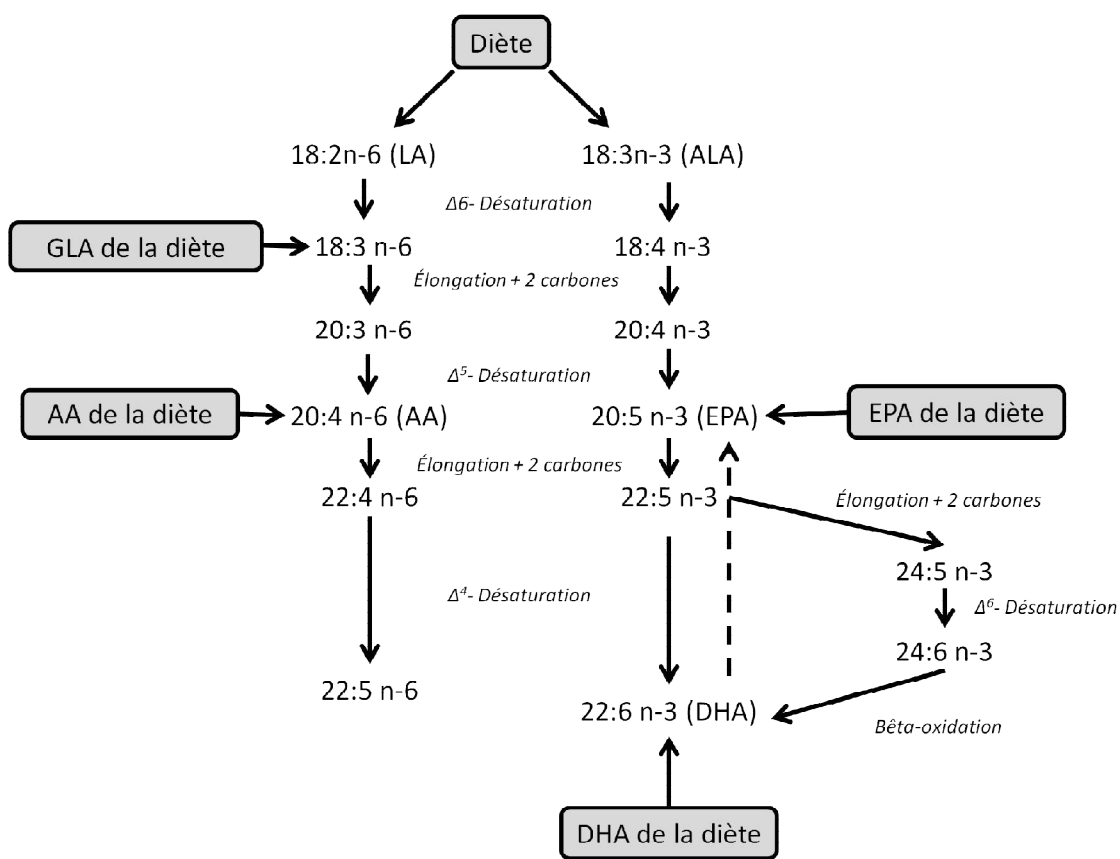


Figure 5. **Métabolisme des oméga-3 et oméga-6.** L'acide linoléique (LA) et l'acide alpha-linolénique (ALA) acquis par la diète sont métabolisés en différents acide gras oméga-3 (ω -3) et oméga-6 (ω -6) par les désaturases et élongases pour aboutir à l'acide arachidonique (AA), à l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et à l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui seront incorporés aux membranes cellulaires. L'acide gamma-linolénique (GLA), l'AA, l'EPA et le DHA peuvent aussi être directement consommés à travers l'alimentation [242].

La synthèse d'EPA à partir d'ALA obtenu par la diète via les sources végétales est plutôt faible chez l'humain. Effectivement, l'organisme humain ne peut que synthétiser une petite quantité d'EPA ainsi que de DHA à partir d'ALA [235, 236]. Il est donc avantageux de consommer directement de l'EPA et du DHA produits par les phytoplanctons et acquis par l'homme dans la diète par le poisson ou l'huile de poisson. De plus, le corps utilise préférentiellement ces derniers. Lorsqu'ils sont ingérés, il y a inhibition des élongases et désaturases [242].

Les AG provenant de l'alimentation ou obtenus par la voie des élongases/désaturases seront incorporés aux membranes en position sn-2 des phospholipides membranaires par estérification [17, 242].

À la suite de divers stimuli comme l'inflammation, la famille des enzymes PLA₂ relâche les AG ω -3 et ω -6 des membranes. Ces enzymes hydrolysent le lien ester sn-2 des phospholipides libérant ainsi les AG à 20 carbones (AA, DGLA et EPA), permettant leur conversion en eicosanoïdes (eicosane venant du Grec qui veut dire 20, pour dérivé d'AG à 20 carbones) [243, 244]. Les phospholipases n'ont pas d'affinité plus grande pour l'une ou l'autre des molécules à 20 carbones [245]. Chez le mammifère, toutes les cellules peuvent synthétiser les eicosanoïdes, à l'exception des érythrocytes. Les eicosanoïdes ont une action à de très faibles concentrations et agissent via des RCPG. Les eicosanoïdes sont les prostaglandines, les thromboxanes, les leucotriènes et les lipoxines [244].

2.2.1 Voie des prostaglandines et thromboxanes

D'abord, la voie des prostaglandines et des thromboxanes débute par l'action de cyclo-oxygénases (COX). La première étape consiste en la production de PGH par la PGH synthase ou communément appelée COX, à partir de l'AA ou de l'EPA. Deux isoformes de COX se présentent : la cyclo-oxygénase 1 (COX-1) et la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). Les deux COX catalysent deux réactions : la première catalyse l'addition de molécule d'oxygène à l'AA, ou l'EPA, la convertissant en intermédiaire endoperoxyde PGG (activité cyclooxygénase). La seconde réalise la conversion de PGG en PGH (activité peroxydase) [236, 246]. Pour que les réactions suivantes se fassent, l'hydroperoxyde est nécessaire pour activer les COX. La COX-

1 est exprimée de façon constitutive dans les muqueuses gastriques, le rein, les plaquettes et les cellules endothéliales vasculaires. La COX-1 est responsable de la production basale d'eicosanoïdes, tandis que la COX-2 est induite par des agents inflammatoires tels que les cytokines. La COX-2 est exprimée dans les macrophages et les monocytes.

Ces enzymes sont insérées dans les membranes du réticulum endoplasmique et nucléaire, la poche liant le substrat est orientée de façon à prendre l'AA ou l'EPA. La structure des deux isoformes est similaire. La séquence d'acide aminé diffère au niveau de la poche d'interaction, tout comme il y a une différence dans le domaine liant la membrane, de façon à ce que la COX-2 ait une ouverture plus grande pour le substrat, donc plus accommodant et flexible [247]. De plus, le substrat préférentiel aux deux COX est l'AA. Il faut par contre dix fois plus d'hydroperoxyde pour activer la COX -1 que la COX-2. L'EPA a une affinité semblable pour les deux, mais la COX-2 peut oxygéner l'EPA sans source importante d'hydroperoxyde contrairement à la COX-1 qui en nécessite une grande quantité [245].

De la PGH à la formation des autres prostaglandines et thromboxanes, les enzymes de synthèse (prostacycline synthase et thromboxane synthase) impliquées sont spécifiques aux cellules ou tissus. Les prostaglandines et thromboxanes de série-2 seront obtenues à partir de l'AA : la thromboxane A₂ (TXA₂), la prostacycline (PGI₂), la prostaglandine D₂ (PGD₂), la prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}) et la prostaglandine E₂ (PGE₂), tandis que la série-3 sera obtenue à partir de l'EPA : thromboxane A₃ (TXA₃), prostaglandine I₃ (PGI₃), prostaglandine D₃ (PGD₃), prostaglandine F_{3α} (PGF_{3α}) et la prostaglandine E₃ (PGE₃) [248, 249] (voir figure 6 [249]).

2.2.1.1 Métabolites et récepteurs impliqués dans la voie des prostaglandines et leucotriènes

La TXA₂, produite majoritairement par les plaquettes, stimule l'agrégation plaquettaire, la constriction des muscles lisses et la prolifération des lymphocytes [244]. La TXA₃, au contraire, diminue la réactivité plaquettaire [250], mais semblerait moins puissante que la TXA₂ [245]. Le récepteur des thromboxanes (TP) est couplé à la protéine Gαq et cause l'activation de la phospholipase C qui catalyse la formation d'inositol triphosphate (IP3) et de

diacylglycérol (DAG) à partir de phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂). L'IP₃ provoque la libération de calcium du réticulum endoplasmique et le DAG active la PKC qui cause la phosphorylation et l'activation de diverses cibles cellulaires. Ce récepteur peut aussi entraîner une diminution d'AMPc via la protéine G α i qui inhibe l'adénylate cyclase [251]. La TXA₂ a une demi-vie très courte, de 30 secondes. Elle aboutit donc à la formation de la TXB₂ qui est plus stable et moins réactive.

Les PGI₂ et PGI₃ sont produites au niveau du cœur et des cellules endothéliales vasculaires. Elles inhibent de façon importante l'agrégation plaquettaire et les neutrophiles, diminuent la prolifération des cellules T, diminuent la migration des lymphocytes et la sécrétion d'IL-1 α et d'IL-2 puis causent une vasodilatation par l'interaction avec leur récepteur (IP) couplé à la protéine G α s qui augmente l'AMPc [252].

La PGD₂ est produite par les mastocytes et les éosinophiles, puis se retrouve davantage au niveau du cerveau. Elle a une action surtout pro-inflammatoire et stimule la production de cytokines. À faible dose, elle cause une vasodilatation tandis qu'à dose plus élevée, elle cause une vasoconstriction. Elle contribue aussi à la migration des neutrophiles à travers les cellules endothéliales, tandis que la PGD₃ inhibe cette action par une compétition pour les mêmes récepteurs (DP1 et DP2) [253]. Le DP1, couplé à la protéine G α s, augmente les concentrations d'AMPc tandis que le DP2, couplé à G α i, diminue l'AMPc ou stimule la phospholipase C [244].

Les prostaglandines E sont exprimées majoritairement au niveau du rein, de la rate et du cœur. Elles entraînent une panoplie d'effets expliqués en raison de leur interaction avec quatre récepteurs distincts (EP 1 à 4). Ces récepteurs diffèrent en raison de leur propriété à lier le ligand, de la distribution tissulaire et de leur puissance. Ils sont aussi couplés à différents second messagers : l'EP1 est couplé à la protéine G α q causant l'activation de la phospholipase C et une augmentation de calcium. Les EP2 et EP4 sont couplés à la protéine G α s, ce qui augmente les concentrations d'AMPc. L'EP3, qui est le plus abondant, est couplé à une protéine G α i, ce qui diminue les concentrations d'AMPc [251] ou peut activer la phospholipase C. La PGE₂ est davantage mitogénique et pro-inflammatoire que la PGE₃ [254].

Les prostaglandines de série E entraînent davantage une vasodilatation et possèdent une action tachycardisante et inotrope positive [255].

La $\text{PGF}_{2\alpha}$, exprimée aussi dans le rein, la rate et le cœur, produit une bronchoconstriction ainsi qu'une constriction des muscles lisses. Elle entraîne d'ailleurs une augmentation de la pression artérielle dans des modèles expérimentaux. Elle cause aussi des contractions utérines à la parturition et entraîne la régression du corpus luteum [251]. Les prostaglandines F interagissent avec leur récepteur (FP) couplé à $\text{G}\alpha\text{q}$ qui augmente les concentrations de calcium par l'activation de la phospholipase C [244].

Il est à noter que la production d'AMPc cause davantage un relâchement du muscle lisse vasculaire et inhibe l'agrégation plaquettaire tandis qu'une augmentation de calcium cause la contraction du muscle lisse vasculaire et induit l'agrégation plaquettaire.

Le DGLA, un ω -6, est aussi relâché des membranes cellulaires par la PLA_2 et entre en compétition avec l'AA pour les COX. Toutefois, le DGLA aboutit à des prostaglandines et thromboxanes de série 1 qui sont des structures similaires à la série 2 obtenue des ω -3 [256]. Ils sont donc davantage anti-inflammatoires, ils induisent une vasodilatation et inhibent l'agrégation plaquettaire.

En plus des récepteurs nommés précédemment, les eicosanoïdes pourraient interagir avec des récepteurs nucléaires. Le candidat retenu jusqu'à présent est le *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR). Cette famille de récepteur est de type facteur de transcription; elle régule l'expression de gènes associés au métabolisme lipidique ou encore sur la production de cytokines. L'activation de ces récepteurs par certaines prostaglandines issues des ω -3 a permis de constater une diminution de la production de cytokine [251].

Les prostaglandines ne sont pas emmagasinées, elles sont synthétisées *de novo* à partir d'AG à 20 carbones relâchés des membranes lors d'un stimulus tel un trauma mécanique, les cytokines, des facteurs de croissance ou autres (collagène et adénosine diphosphate des plaquettes, bradykinine et thrombine des cellules endothéliales). Ces stimuli activent soit la

phospholipase et/ou les COX. De plus, contrairement aux hormones qui agissent de façon systémique, les prostaglandines agissent de façon autocrine et paracrine, leur demi-vie est très courte [244].

2.2.1.2 Inhibition de la voie des prostaglandines et des thromboxanes

Considérant leur action physiologique, plusieurs composés pharmacologiques mimant ou inhibant l'effet des prostaglandines et thromboxanes sont utilisés en clinique. L'effet de vasodilatation de la PGE₁ est utilisé dans le traitement des dysfonctions érectiles via l'alprostadil [257].

Comme la PGE₂ et la TXA₂ ont des effets davantage pro-inflammatoires, l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), qui bloquent leur synthèse, s'avère bénéfique pour contrer la réponse inflammatoire. L'acide acétylsalicylique, communément appelé aspirine, en est un qui est utilisé de façon très courante à travers le monde pour ses effets antipyrétique (via l'inhibition de la production de prostaglandines au niveau de l'hypothalamus), antalgique, anti-inflammatoire et anti-agrégant plaquettaire. L'aspirine inhibe de manière irréversible les COX-1 et -2 de par leur acétylation. En acétylant les COX plaquettaires, elle prévient la formation de TXA₂ de manière irréversible, donc tout au long de la durée de vie des plaquettes qui est de huit à dix jours. Ainsi, l'aspirine est utilisée dans la prévention de l'IM afin de prévenir la formation de thrombus. La production hépatique d'un métabolite actif de l'aspirine, l'acide salicylique, est aussi actif et inhibe les COX, mais de manière réversible. L'effet anti-inflammatoire de l'aspirine ne serait pas uniquement dû à l'inhibition de la production des prostaglandines et leucotriènes. À forte dose, elle diminue aussi la production de cytokines et inhibe l'augmentation de la perméabilité vasculaire lors d'un procédé inflammatoire. Ces effets anti-inflammatoires peuvent être expliqués par la formation de résolvines, des métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation et issus des ω -3, de par l'acétylation de la COX-2 (discuté ultérieurement) [258].

Il y a aussi les AINS non salicylés de type réversible ou irréversible via l'inhibition des COX. Ceux-ci peuvent être compétitifs et réversibles, comme la majorité des AINS tels que l'ibuprofène et le naproxène, ou peuvent être irréversibles tels que l'indométacine ou le flurbiprofène. Il y a aussi des inhibiteurs compétitifs réversibles liés à la capture des radicaux libres qui inhibent l'activité peroxidase des COX. Cependant, étant donné que l'inhibition de la COX-1 est associée à des effets gastriques importants, tels que des ulcérations, des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 ont été mis au point : le célécoxib, le lumiracoxib, le rofécoxib, le valdécoxib ainsi que le méloxicam. Toutefois, le rofécoxib a été retiré du marché en 2004 en raison des effets cardiovasculaires indésirables. Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 sont effectivement associés à un risque d'événements cardiovasculaires comme l'IM. Les AINS non salicylés sont utilisés très couramment en clinique, notamment pour diminuer la fièvre, la douleur et l'inflammation [259]. Dans une étude présentée dans cette thèse, le méloxicam est utilisé comme inhibiteur sélectif de la COX-2. Il est surtout utilisé pour contrer la douleur lors de crise d'arthrose, chez les patients souffrants de polyarthrite rhumatoïde, lors d'une opération ou pour diminuer l'inflammation dans un cadre vétérinaire. Il est associé à un risque très faible d'événement cardiovasculaire étant donné qu'il démontre peu d'effet au niveau cardiovasculaire et hémodynamique [260].

Les corticostéroïdes inhibent aussi la voie des thromboxanes et prostaglandines via le blocage de la PLA₂. Les corticostéroïdes empêchent donc le relâchement des AG membranaires et l'aboutissement aux eicosanoïdes inflammatoires issus de l'AA. Ils sont utilisés dans des pathologies inflammatoires telles que le rhumatisme [261].

L'utilisation d'antagonistes des récepteurs des prostaglandines et thromboxanes n'est pas encore courant en clinique. Il existe, par contre, de nombreux composés en étude. Par exemple, des antagonistes des récepteurs TP ont montré un effet *in vivo* et *in vitro* sur l'agrégation plaquettaire et la vaso et broncho constriction de par l'inhibition de l'action de la TXA₂ [262]. Un antagoniste du récepteur de la TXA₂ a démontré de manière expérimentale, chez le chien, une diminution de la taille de l'infarctus [263].

2.2.1.2.1 Inhibiteurs et infarctus du myocarde

Durant l'IM, il y a une augmentation de l'expression des COX, principalement de la COX-2, ainsi que des prostaglandines et thromboxanes. Inhiber cette voie pourrait donc s'avérer bénéfique dans le traitement de l'IM.

Comme mentionné précédemment, l'aspirine s'avère efficace dans la prévention secondaire de l'IM en réduisant le risque d'épisode récurrent et de complications [258, 264]. Un prétraitement à l'aspirine et ses dérivés montre de plus une réduction de la taille de l'infarctus dans un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion [265]. L'inhibition spécifique de la COX-2 a des effets contradictoires au niveau de l'IM. Chez le cochon, le célécoxib a montré une augmentation dans la mortalité, une augmentation dans le remodelage du ventricule gauche ainsi qu'une dysfonction systolique à la suite d'un IM [266]. Inversement, chez la souris, deux inhibiteurs sélectifs de la COX-2 ont montré une amélioration dans la fonction cardiaque à la suite d'un IM où il y aurait une diminution du collagène dépendante du TGF- β [267]. Notre laboratoire a démontré qu'un prétraitement chronique au célécoxib diminue la taille de l'infarctus chez le rat [268], tandis que le célécoxib donné au moment de la reperfusion ne montre pas de diminution de la taille de l'infarctus [269]. Donc, dépendamment du contexte et du modèle expérimental, l'inhibition de la COX-2 pourrait s'avérer bénéfique ou plutôt nocive.

2.2.2 Voie des leucotriènes

D'un autre côté, les leucotriènes sont générés par les lipoxygénases 5, 12 ou 15, principalement par les cellules inflammatoires telles que les leucocytes polymorphonucléaires, les macrophages ou les mastocytes. Une activation cellulaire par le complexe immunitaire, des peptides bactériens, des cytokines inflammatoires ou d'autres stimuli causent l'activation des phospholipases, mais aussi de la 5-lipoxygénase (5-LOX). La 5-LOX se retrouve dans le cytosol ou dans le noyau, dépendamment du type cellulaire. Son activation cause sa translocation aux membranes [244]. Les 12 et 15-LOX sont davantage reliées au processus inflammatoire pathologique tel que l'insuffisance cardiaque [270] ou au développement de la cardiomyopathie diabétique [271]. De façon contradictoire, les 12 et 15-LOX peuvent aussi limiter l'inflammation par la génération de métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation (discuté ultérieurement).

Une fois relâchée par les phospholipases, l'AA est convertie en série 4 de leucotriènes par l'action de lipoxygénases : leucotriène B₄ (LTB₄), leucotriène C₄ (LTC₄), leucotriène D₄ (LTD₄) et leucotriène E₄ (LTE₄), tandis que l'EPA dessert la série 5 de leucotriènes, dont la leucotriène B₅ (LTB₅), leucotriène C₅ (LTC₅) et leucotriène E₅ (LTCE₅) [235, 236] (voir figure 6 [249]).

Dans un premier temps, la 5-LOX transforme l'AA en intermédiaire 5-HPETE (Acide 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque), puis en leucotriène A₄ (LTA₄) avec l'action conjointe de FLAP (*5-lipoxygenase-activating-protein*). LTA₄ est ensuite orientée dans différentes voies : hydrolyse, conjugaison aux glutathions ou au métabolisme transcellulaire. Des eicosanoïdes bioactifs sont alors générés.

2.2.2.1 Éicosanoïdes

L'attaque hydrolitique de LTA₄ par la leucotriène A₄ hydrolase conduit au LTB₄, un puissant chimioattractant des leucocytes qui stimule aussi l'adhésion leucocytaire aux cellules endothéliales, l'augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que la production de cytokines dont l'interféron- γ (INF- γ) et l'IL-1 [272].

La conjugaison de LTA₄ au glutathion forme le LTC₄. Cette action est catalysée par la LTC₄ synthase. LTC₄ stimule aussi la synthèse de collagène, l'augmentation de la sécrétion de mucus, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la production de cytokines dont l'INF- γ , le recrutement des leucocytes et la contraction des muscles lisses dans plusieurs tissus. LTC₄ peut être transporté en dehors de la cellule par un transporteur (tel MDR1 : *multidrug resistance-associated protein*), ce qui régule la migration des cellules dendritiques aux ganglions lymphatiques.

LTC₄ peut enfin être transformée par un métabolisme extracellulaire en LTD₄ et LTE₄. Ces dernières causent une contraction lente et soutenue du muscle lisse ainsi que des actions similaires à la LTC₄ [244].

Pour résumer, le rôle des leucotriènes de série 4, obtenues à partir de l'AA, est essentiellement d'augmenter la perméabilité des capillaires, d'attirer les neutrophiles via des propriétés chimiotactiques et ils sont prolifératifs.

La série-5 de leucotriènes obtenue à partir des ω -3 (EPA) antagonise l'effet de la série-4 des ω -6. Le LTC₅ utilise le même transporteur que LTC₄, donc diminue son exportation et ainsi son activité via le métabolisme extracellulaire. Bien que LTB₅ soit beaucoup moins puissant que LTB₄, LTC₅ a une puissance comparable à LTC₄, et peut donc antagoniser son activité [272]. Des suppléments d'huile de poisson ont d'ailleurs montré une diminution de la production de cytokines inflammatoires stimulée par la série 4 de leucotriènes [273].

2.2.2.2 Récepteurs

Les leucotriènes agissent via des RCPG. Cinq d'entre eux sont décrits ci-dessous. Le récepteur B-LT₁ à haute affinité lie le LTB₄ à de faibles concentrations, le B-LT₂ lie aussi le LTB₄ mais avec des concentrations plus élevées. Le LTB₅ lie aussi les récepteurs du LTB₄, mais moins activement. Ce dernier cause une augmentation de calcium intracellulaire moins importante que le LTB₄ lors de la liaison aux récepteurs B-LT [274]. Deux récepteurs de type cystényl leucotriène CysLT₁ et CysLT₂ médient l'action de LTC₄, LTD₄ et LTE₄ ainsi qu'à plus faible niveau l'action de LTC₅, LTD₅ et LTE₅. CysLT₁R se retrouve sur les muscles lisses respiratoires et sur les cellules endothéliales vasculaires promouvant la bronchoconstriction et la régulation positive des molécules d'adhésion cellulaire. CysLT₂R se situe au niveau des veines pulmonaires, de la rate, des fibres de Purkinje cardiaques et sur les surrénales [244]. Plus récemment, le récepteur GPR17 a aussi été démontré comme étant un récepteur des leucotriènes, celui-ci est exprimé au niveau du cœur [275].

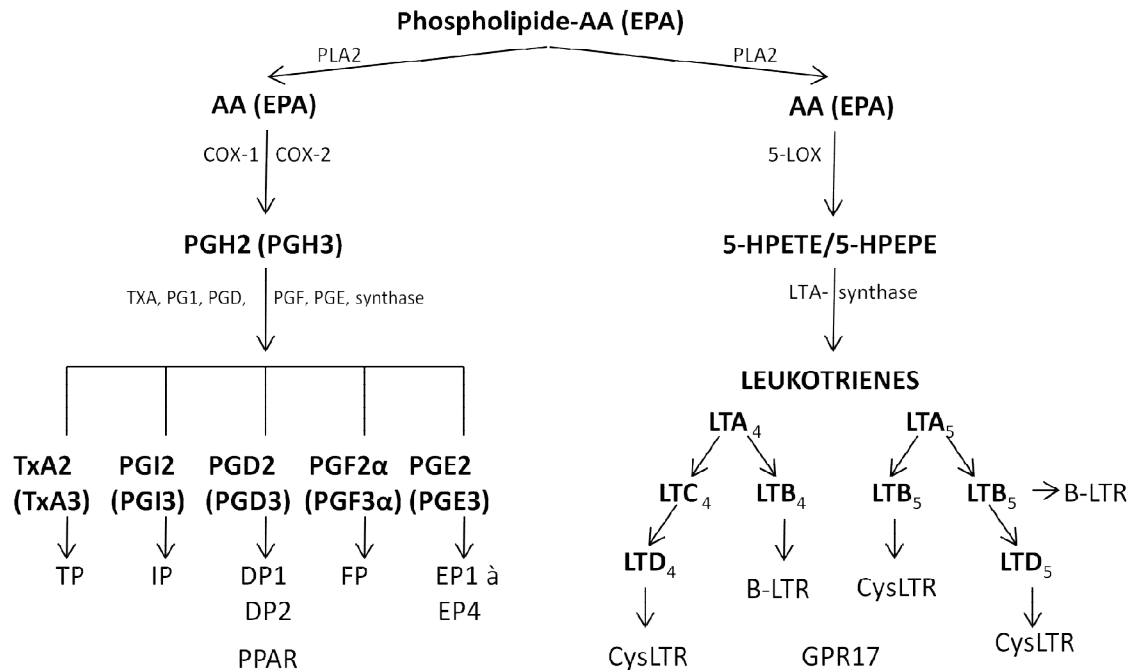


Figure 6. **Synthèse des prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes à partir des AG essentiels ω -6 (AA) et ω -3 (EPA).** Les AG AA et EPA sont relâchés des membranes par les phospholipases (PLA2) activées par différents stimuli. Puis, les cyclo-oxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2) conduisent à la formation de l'intermédiaire PGH. Les différentes synthèses conduisent à la production des prostaglandines de série 2 pour l'AA et 3 pour l'EPA (PG). Ces dernières iront lier leurs récepteurs respectifs pour induire leur réponse (TP, IP, DP, FP, EP et PPAR). Au niveau des leucotriènes (LT), la 5-lipoxygénase (5-LOX) génère les intermédiaires 5-HPETE et 5-HPEPE pour aboutir à la formation des leucotriènes de série 4 pour l'AA et de série 5 pour l'EPA. Celles-ci iront lier les récepteur des leucotriènes (B-LTR) et ceux de type cystényl leucotriène (CysLTR) ainsi que le GPR17 [249].

2.2.2.3 Inhibiteurs

Des inhibiteurs de la voie des leucotriènes ont été mis au point soit en inhibant l'activité des LOX ou en inhibant les récepteurs des leucotriènes. Un inhibiteur de FLAP empêche la 5-LOX d'être active et s'avère efficace pour traiter l'athérosclérose dans un modèle expérimental chez la souris [276]. Aussi, des antagonistes du récepteur CysLT1 se montrent efficaces pour traiter l'asthme en diminuant la bronchoconstriction, l'inflammation et la production de mucus [277]. À cet effet, le médicament montélukast (Singulair) est utilisé

dans le traitement de l'asthme et le soulagement des allergies de par l'antagonisme des récepteurs aux leucotriènes [278].

Dans une étude présentée dans cette thèse, l'inhibiteur sélectif de la 15-LOX PD146176 est utilisé. Cet inhibiteur a montré un effet positif contre l'athérosclérose dans un modèle d'hypercholestérolémie chez le lapin en limitant les lésions athérosclérotiques causées par les macrophages [279]. Le PD146176 a aussi montré une diminution de l'apoptose dans des cellules endothéliales [280] ainsi qu'une diminution des protéines amyloïdes β reliées à la maladie d'Alzheimer [281].

2.2.2.3.1 Inhibiteurs et infarctus du myocarde

Au niveau de l'IM, les leucotriènes sont relâchées en période d'ischémie et de reperfusion [100, 282]. Leur expression peut entraîner une réponse inflammatoire exagérée et causer des dommages myocardiques. De ce fait, inhiber la production massive de leucotriènes ou bloquer l'activation de certains de leurs récepteurs peut s'avérer bénéfique lors de l'IM.

L'inhibition de la 12 et de la 15-LOX par la baicaléine, un composé bactérien de la famille des flavones, se montre efficace pour contrer les lésions d'ischémie et de reperfusion dans un modèle expérimental d'IM chez la souris. Ce composé montre une diminution de l'apoptose des cardiomyocytes, une diminution de la taille de l'infarctus, une diminution de l'inflammation et du stress oxydatif [283].

Au niveau des récepteurs, une expression augmentée du récepteur CysLT2 a montré une aggravation des lésions lors de l'IM, une augmentation de la taille de l'infarctus de par une augmentation de la perméabilité vasculaire et une exacerbation de la réponse inflammatoire [284]. De ce fait, un antagoniste spécifique du CysLT2R est efficace pour diminuer les lésions de reperfusion chez la souris grâce à une diminution de l'infiltration des leucocytes et à l'expression des molécules d'adhésions leucocytaires [285].

Le rôle des thromboxanes, des prostaglandines et des leucotriènes issus des ω -6 est davantage pro-inflammatoire et s'avère délétère lors de l'IM. Toutefois, des métabolites

impliqués dans la résolution de l'inflammation et issus autant des ω -6 que des ω -3 peuvent au contraire être bénéfiques lors d'un procédé inflammatoire [286]. De ce fait, l'utilisation des inhibiteurs des lipoxigénases peuvent s'avérer bénéfique en présence d'une surproduction de métabolites inflammatoires. Par contre, ils peuvent s'avérer nocifs en bloquant la production des métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation, c'est d'ailleurs ce qui a été observé dans une étude présentée dans cette thèse.

2.2.3 Métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation

Comme mentionné précédemment, l'inflammation aiguë est un procédé essentiel pour la défense et la protection de l'organisme. Toutefois, lorsqu'elle devient incontrôlée, des dommages peuvent apparaître. La résolution de l'inflammation prévient ce passage du processus inflammatoire d'aigu à chronique, et ramène le tissu à l'homéostasie normale. Ce processus était auparavant perçu comme étant passif, mais nous savons aujourd'hui qu'il s'agit d'un procédé actif. Lors de l'inflammation, il y a d'abord production des prostaglandines et des leucotriènes inflammatoires, puis il y a un transfert vers la résolution de l'inflammation via la synthèse des médiateurs pro-résolution de l'inflammation [287]. La synthèse de ces médiateurs va limiter l'infiltration leucocytaire et encourager l'action des macrophages non-inflammatoires, mais plutôt dans le but de nettoyer le site inflammatoire des débris et des leucocytes apoptotiques. Durant la résolution de l'inflammation, il y a donc cessation de l'infiltration des leucocytes, un retour à la normale de la perméabilité vasculaire, la mort des leucocytes au site lésé par apoptose et l'infiltration de monocytes et de macrophages non-inflammatoires pour y phagocyter les débris et cellules mortes. Les médiateurs impliqués dans la résolution de l'inflammation et issus des ω -3 et des ω -6 sont les lipoxines, les résolvines, les protectines et les marésines. Elles ont une action biologique lorsque présentes en concentration de l'ordre du picomolaire au nanomolaire [288].

2.2.3.1 Lipoxines

Les lipoxines sont désignées comme telles puisque ce sont des produits issus des lipoxigénases. Elles sont des médiatrices impliquées dans la résolution de l'inflammation et les premières qui ont été découvertes et décrites en 1984 par le groupe de Serhan. Les

lipoxines sont synthétisées à partir de l' ω -6 AA. Le groupe de Serhan a identifié la production des lipoxines A4 et B4 (LXA4 et LXB4) par les leucocytes activés via les 5 et 15-LOX [289]. D'une part, la 15-LOX des cellules épithéliales du système respiratoire ou des monocytes couplés à la 5-LOX des neutrophiles va conduire à la synthèse des lipoxines. Aussi, la 5-LOX des leucocytes, précédée de la 15-LOX ou de la 12-LOX des plaquettes, va conduire à la production de la LXA4 et de la LXB4. D'un autre côté, l'acétylation de la COX-2 au niveau de cellules endothéliales et épithéliales ainsi que l'action de la 5-LOX des leucocytes vont entraîner la production des lipoxines dérivées de l'aspirine. Les 15-epi-LXA4 et 15-epi-LXB4 font parties des lipoxines dérivées de l'aspirine.

Les lipoxines sont rapidement synthétisées en réponse à plusieurs stimuli. Par exemple, les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 augmentent la synthèse de la 15-LOX, ce qui conduit à la synthèse des lipoxines. Elles agissent localement et sont rapidement inactivées par la 15-PGDH (*15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*) en composés 15-oxo-LXA4 et 5-oxo-LXB4 inactifs. Ainsi, des analogues des lipoxines ont été mis au point afin d'être plus résistants à la désactivation pour agir plus longtemps dans un cadre thérapeutique [290].

Les lipoxines agissent via des récepteurs membranaires tels que le récepteur de la LXA4 (ALXR) qui est exprimé au niveau des leucocytes ou encore via le récepteur des leucotriènes CysLT1. Les lipoxines sont vasodilatatrices et elles sont anti-inflammatoires. Elles participent à la résolution de l'inflammation lorsque présentes en quantité minime de l'ordre du pico et du nanogramme. Elles régulent de façon négative l'infiltration leucocytaire, en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires et en encourageant la phagocytose via les monocytes [291, 292].

Les lipoxines peuvent s'avérer efficaces pour traiter plusieurs pathologies. Chez des patients asthmatiques, l'inhalation de la LXA4 a montré une diminution de l'obstruction respiratoire causée par la LTC₄ [293]. De plus, les lipoxines ont un rôle d'immunomodulation via la régulation des macrophages, des cellules dendritiques et des effecteurs reliés aux lymphocytes T, ce qui en ferait de bons candidats pour traiter les allergies et les maladies de désordre immun [294, 295]. De ce fait, bloquer l'expression des 12 et 15-LOX et ainsi de la

LXA4 s'avère nocif dans des modèles d'arthrite. Cette délétion en LOX est associée à une inflammation incontrôlée et des dommages tissulaires importants. Une diminution de la production de LXA4 est associée à une augmentation des gènes inflammatoires comme le TNF- α [296]. L'utilisation des inhibiteurs des cyclo-oxygénases et des lipoxygénases peut donc aussi s'avérer délétère en empêchant la résolution de l'inflammation et le retour à l'homéostasie du tissu.

2.2.3.2 Résolvines et protectines

Autrement, les résolvines (« resolution phase interaction products ») et protectines sont des médiateurs impliqués dans la résolution de l'inflammation dérivés des ω -3 EPA et DHA. L'EPA et le DHA sont distribués partout à travers le corps. L'EPA est toutefois prédominant au niveau des muscles, du foie, de la rate et des globules rouges tandis que le DHA au niveau de la rétine, du sperme, du cortex cérébral, de la rate et des globules rouges [297]. Les résolvines et protectines ont été identifiées par une approche de spectrométrie de masse en chromatographie liquide, une méthode lipidomique couplée à l'informatique, à partir d'exudat murin dans un modèle inflammatoire de « poches d'air ». Il s'agit d'un modèle où il y a injection sous-cutanée d'air stérile dans le dos du rat ou de la souris. Puis, l'injection d'un irritant inflammatoire tel que le LPS (lipopolysaccharide) permet d'induire une réponse inflammatoire locale [298].

L'EPA aboutit à la formation des résolvines de série E (RvE) tandis que le DHA conduit à la série D de résolvine (RvD) ainsi qu'aux neuroprotectines.

2.2.3.2.1 Résolvines E

L'EPA est converti via la COX-2 acétylée par l'aspirine en intermédiaire 18R-hydroperoxy-EPE qui est relâché et rapidement converti en différents intermédiaires 5S-hydroperoxy,18R-hydroxy-EPE et en 5,6-epoxy,18R-hydroxy-EPE via la 5-LOX des leucocytes activés pour enfin aboutir à la formation de RvE1 : acide eicosapentaénoïque-5S,12R,18R-trihydroxy-6Z,8E,10E,14Z,16E par l'action finale de la LTA₄ hydrolase. La RvE2 peut aussi être formée à partir du même procédé. La RvE1, bien qu'augmentée en présence d'aspirine, est aussi présente en absence d'aspirine [299]. La p450 microbienne peut

générer l'intermédiaire 18-hydroperoxy-EPE et ainsi aboutir à la formation de résolvines de manière COX indépendante [300]. Les résolvines de série E sont rapidement inactivées par la 15-PGDH. Tout comme les lipoxines, elles sont converties en intermédiaires 18-oxo-RvE1 qui sont inactifs [301]. Des analogues ont ainsi été synthétisés afin d'augmenter leur durée d'action, comme par exemple le 19-p-fluorophenoxy-RvE1.

La RvE1 est la résolvine de série E qui est davantage décrite, toutefois la RvE2 montre aussi des effets de résolution de l'inflammation, voir des effets qui peuvent s'additionner à la RvE1. Cette dernière pourrait agir via des récepteurs et des voies d'activation distinctes de la RvE1 bien que peu décrit. La RvE1 agit via des RCPG ChemR23 et le récepteur de la leucotriène B4 (BLT1). Via le récepteur ChemR23, la RvE1 atténue l'activation de NF- κ B et active des voies de signalisation intracellulaires par phosphorylation [299]. La RvE1 lie le BLT1 sur les leucocytes et atténue l'action pro-inflammatoire de la LTB₄ [302]. Le récepteur ChemR23 est abondant sur les monocytes et à plus faible niveau sur les neutrophiles et lymphocytes T. Il est exprimé au niveau du système cardiovasculaire, du cerveau, des reins et du système gastro-intestinal [299].

À des concentrations nanomolaires, la RvE1 réduit l'infiltration des leucocytes, la migration des cellules dendritiques et la production d'IL-12 [303]. La RvE1 bloque l'agrégation plaquettaire excessive et limite l'effet de certains pathogènes en activant la phagocytose par les leucocytes [304]. La RvE2 a aussi une action régulatrice du trafic des neutrophiles, augmente la phagocytose et stimule la production de cytokines anti-inflammatoires [305].

Dans des modèles de maladies, comme les colites et les maladies parodontales, la RvE1 protège contre les lésions causées par les leucocytes et l'expression excessive de molécules inflammatoires. La RvE1 est aussi bénéfique dans des modèles inflammatoires de peau, de péritonite, d'asthme et d'inflammation oculaire en diminuant le recrutement des neutrophiles, la production de cytokines inflammatoires, en augmentant la survie cellulaire et en régulant la néovascularisation ainsi que l'angiogénèse. La RvE2 s'avère bénéfique dans un modèle de péritonite [292]. Récemment, la compagnie Resolvix Pharmaceuticals conduisait

une première étude clinique avec un analogue de la RvE1 pour traiter les yeux chez les patients avec le syndrome modéré à élevé de yeux secs, non lubrifiés [306].

La RvE1, dans l'ordre du mg, s'avère efficace pour diminuer la taille de l'infarctus lorsqu'administrée par voie intraveineuse avant la reperfusion chez le rat [307]. Les mécanismes impliqués sont une diminution de l'infiltration des leucocytes ainsi que l'activation de la voie de cardioprotection RISK via la voie PI3K/Akt et Erk1/2.

2.2.3.2.2 Résolvine D

La série D de résolvine est obtenue par le DHA. Les résolvines D ont aussi été découverts dans l'exsudat de souris lors de la résolution de l'inflammation lorsque les souris consommaient du DHA et de l'aspirine. La RvD1 a aussi été identifiée dans le sang humain activé, dans le cerveau murin [308] et même chez le poisson [309]. La COX-2 acétylée au niveau des cellules endothéliales vasculaires va aboutir à la formation du 17R-hydroxy-DHA qui sera pris en charge par la 5-LOX des leucocytes pour former les intermédiaires 7S-hydroperoxy-17R-hydroxy-DHA et 7S,(8)-epoxy-17R-hydroxy-DHA et enfin aboutir à la formation des 17R-résolvines D (AT-RvD1 à 4). La 15-LOX des leucocytes peut aussi former l'intermédiaire 17S-hydroxy-DHA à partir du DHA qui sera pris en charge par la 5-LOX des leucocytes pour aboutir aux intermédiaires 7S-hydroperoxy-17S-hydroxy-DHA et 7S(8)-epoxy-17S-hydroxy-DHA et à la formation des 17S-résolvines D (RvD 1 à 4) : RvD1 : acide hexaénoïque 7S,8R,17S-trihydroxy-docosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z. Une voie additionnelle est aussi décrite où la 5-LOX va aboutir à la formation des intermédiaires 17R-hydroperoxy-7S-hydroxy-DHA puis au 16, 17R-epoxy-7S-hydroxy-DHA provenant de la COX-2 acétylé ou en intermédiaire 17S-hydroperoxy-7S-hydroxy-DHA puis 16, 17S-epoxy-7S-hydroxy-DHA provenant de la 15-LOX. Le tout conduisant à la formation des résolvines. Les résolvines de série D sont aussi désactivées par oxydation via l'eicosanoïde oxidoreductase en métabolites 8-oxo et 17-oxo RvD. Leur action biologique est moindre que les RvD [310]. Des analogues de la RvD1 existent aussi afin d'augmenter la durée d'action de celle-ci comme le 17-(R/S)-methyl-RvD1.

La RvD1 signale via ses RCPG GPR32 et FPR2/ALX, le récepteur de la LXA4. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G de type Gi/o. Le GPR32 est constitué de 356 acides aminés et a une séquence similaire aux récepteurs de la famille des chimioattractants. Le récepteur FPR2/ALX est présent au niveau des leucocytes, des monocytes, des lymphocytes T et au niveau des cellules résidentes comme les macrophages, fibroblastes et cellules épithéliales. L'expression de ce récepteur est détectée au niveau de la rate, du poumon, du placenta, du foie et du cœur [311]. Le récepteur GRP32 est exprimé sur les leucocytes, sur le tissu artériel et veineux, sur les cellules myéloïdes, sur les monocytes et sur les macrophages. Des anticorps spécifiques contre les récepteurs FPR2/ALX et GPR32 montrent que l'action de la RvD1 est 10 fois plus sensible au niveau du GPR32 que du FPR2/ALX, tandis que lors d'un stimulus inflammatoire, l'expression du FPR2/ALX est augmentée, mais pas celui du GPR32 [312].

La RvD1 peut aussi lier le récepteur PPAR γ , toutefois cette activation n'a pas lieu dans les niveaux de concentration où la RvD1 génère son action anti et pro résolution de l'inflammation. Par contre, la RvD1 montre une atténuation de l'inflammation pulmonaire dans un modèle d'inflammation induit par le LPS de manière partiellement dépendante au PPAR γ en diminuant l'activité de NF- κ B et des cytokines inflammatoires [313]. Donc, le récepteur PPAR γ peut avoir une implication dans l'action de la RvD1, mais son activation n'explique pas totalement l'activité de la RvD1.

Les RvD et AT-RvD réduisent l'expression des molécules d'adhésions, donc régulent l'interaction leucocyte/endothélium. Elles réduisent aussi l'infiltration excessive et l'activation des neutrophiles en plus de promouvoir la phagocytose ainsi que la clairance des cellules apoptotiques et des microbes autant chez les rongeurs que chez l'humain. Les RvD et les AT-RvD montrent une action similaire aux mêmes concentrations, de l'ordre du nanomolaire. Au niveau des cellules microgliales, les RvDs bloquent la transcription de l'IL-1 β induite par le TNF- α [308]. La majorité des effets sont décrits pour la RvD1 ou la AT-RvD1, toutefois la RvD2 diminue aussi la production de cytokines pro-inflammatoires et est exprimée fortement par les cellules dendritiques. Puis, les RvD3 à 6 sont répertoriées, elles ont des actions similaires à la RvD1.

L'action de la RvD1, via ses récepteurs, régule différentes cibles intracellulaires. D'abord, la voie de signalisation PI3K/Akt et Erk1/2 semble impliquée. Dans un modèle d'induction d'inflammation dans des fibroblastes pulmonaires, la RvD1 inhibe l'expression de la COX-2 lors de la période inflammatoire, de manière dépendante à l'activation de la voie PI3K/Akt et Erk1/2, afin d'empêcher la production d'eicosanoïdes inflammatoires. La RvD1 induit toutefois l'expression de la COX-2 après 48 heures d'induction de l'inflammation afin de promouvoir la production de métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation [314]. L'activation des récepteurs FPR2/ALX et GPR32 régule aussi l'expression de microARN (miR). L'utilisation de l'AT-RvD1 et de la RvD1 montre une activation de ces récepteurs et une régulation des miR208a et miR219. La miR208a est associée à la régulation de l'IL-10. Des souris KO pour le récepteur FPR2/ALX montrent qu'une administration de la RvD1 ne diminue pas le trafic leucocytaire, ni la régulation de la miR208a, ni de l'IL-10 dans un modèle de péritonite induit par le zymosan [315]. Une autre étude confirme le tout dans un modèle de péritonite où la RvD1 régule positivement la miR-21, la miR-146b et la miR-219 et régule de façon négative la miR-208a. L'activation de la miR146b est associée à une répression de l'activité de NF- κ B. L'activation de la miR-219 est associée à l'inhibition de la 5-LOX et à la l'inhibition de la production de leucotriènes. Ces observations sont aussi observées in vitro dans des macrophages humains qui expriment les récepteurs de la RvD1 FPR2/ALX et GPR32 puis mis en contact avec la RvD1. Enfin, dans cette étude, la RvD1 montre une réduction de la translocation nucléaire de NF- κ B avec une diminution de phospho-IkappaB et de SMAD, une protéine intracellulaire impliquée dans le signalement du TGF- β [316]. Ainsi, la RvD1, de par la liaison et l'activation de ses récepteurs, régule des microARNs qui sont impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire.

Dans un modèle d'auto-résolution de l'inflammation, il est montré que les concentrations de RvD1 sont au départ plutôt faibles, mais que pendant la période de résolution, elles augmentent afin de permettre la résolution. Ainsi, la RvD1 montre un potentiel thérapeutique intéressant, où elle peut être donnée au moment de la résolution de l'inflammation afin d'empêcher l'inflammation de devenir excessive [317]. De ce fait, la

RvD1 est bénéfique dans plusieurs modèles expérimentaux de maladies inflammatoires. Elle réduit l'infiltration des leucocytes dans des modèles inflammatoires de peau et de péritonite. La RvD1 protège les yeux contre la néovascularisation [292]. Dans un modèle d'inflammation pulmonaire, l'AT-RvD1 ou un analogue de la RvD1 diminue les lésions pulmonaires en prévenant l'augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire, en diminuant l'accumulation de neutrophiles et de cytokines inflammatoires dans le fluide bronchoalvéolaire et en inhibant l'activité de NF- κ B [318]. Dans un autre modèle inflammatoire pulmonaire, induit par le LPS, un pré-traitement à la RvD1 montre, en plus des effets précédemment décrits, une diminution du stress oxydatif [319]. Ainsi, la RvD1 pourrait s'avérer bénéfique dans les maladies respiratoires telles que l'asthme. Dans un modèle d'endométriose, la RvD1 diminue la perméabilité vasculaire et diminue la sévérité de l'hyperplasie vaginale [320]. Au niveau d'un modèle d'infection, la RvD1 augmente la clairance bactérienne et prévient le développement d'une réponse inflammatoire excessive [321]. La RvD1 a une action anti-nociceptive de par l'inhibition des récepteurs TRPV (*transient receptor potential vanilloid*). Elle pourrait donc agir comme traitement analgésique [322]. Enfin, les modèles où la RvD1 s'avère bénéfique sont multiples.

Au niveau des problèmes d'ischémie, la RvD1 montre aussi des effets bénéfiques. Dans un modèle d'ischémie-reperfusion du rein, la RvD1 diminue les lésions morphologiques et fonctionnelles du rein. Elle a une action anti-inflammatoire et antifibrotique [323]. Dans un modèle d'ischémie cérébrale, des souris surexprimant l' ω -3 désaturase afin de synthétiser des ω -3 sans qu'ils soient requis dans l'alimentation, montrent une augmentation de la RvD1 avec une suppression de NF- κ B, une diminution des médiateurs pro-inflammatoires et un effet neuronal protecteur au niveau de la région hippocampale CA1 [324]. Donc, la RvD1 pourrait s'avérer bénéfique dans le cadre d'une ischémie-reperfusion telle que l'IM.

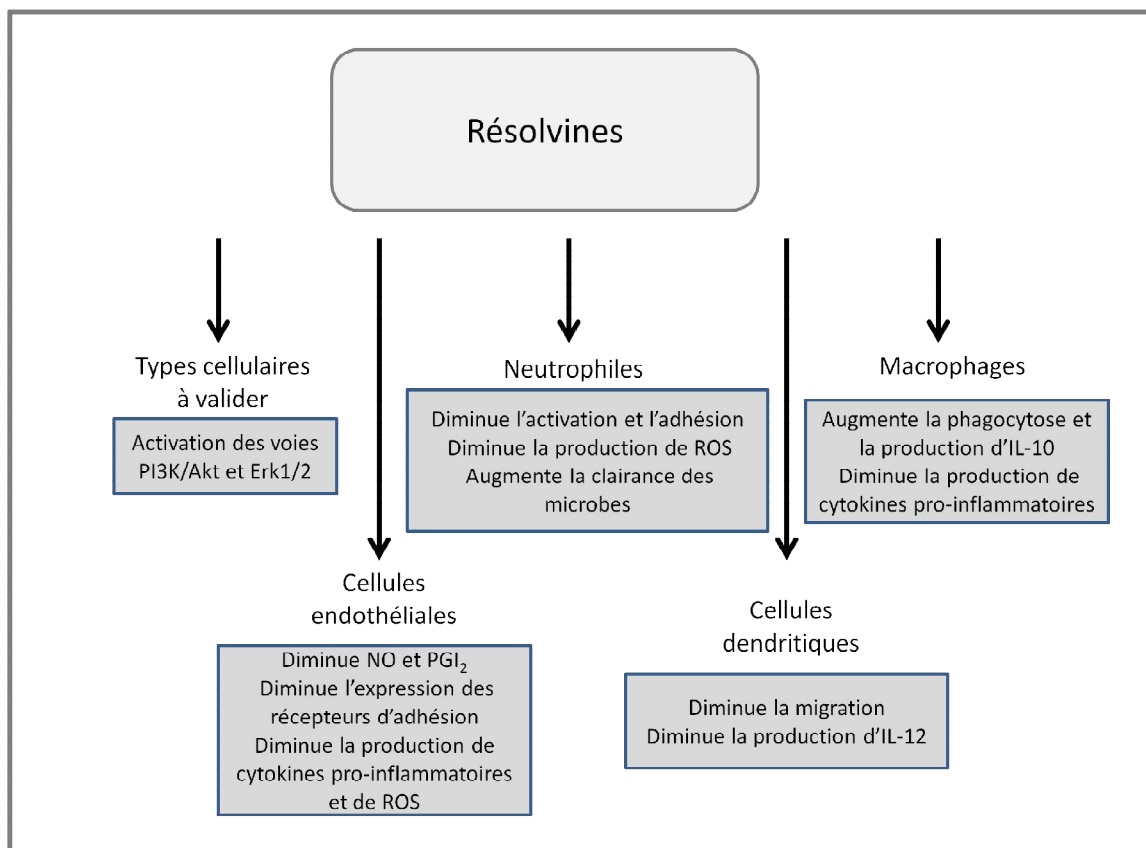


Figure 7. **Mécanismes d'action des résolvines sur les différents types cellulaires.** Les résolvines agissent sur les cellules endothéliales, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages afin d'induire différentes réponses cellulaires dans le but d'encourager la résolution de l'inflammation. Les résolvines activent aussi la voie PI3K/Akt et la voie Erk1/2, toutefois les tissus et types cellulaires cibles restent à valider [288].

2.2.3.2.3 *Protectines*

Le DHA aboutit aussi à la formation des protectines, communément appelées neuroprotectines puisqu'elles sont principalement formées dans le cerveau. Les lipoxygénases forment les intermédiaires 17S-hydroperoxy-DHA et 16,17-epoxy-docosatriène à partir du DHA pour aboutir à la formation de la neuroprotectine D1 (acide hexaénoïque 10R, 17S-dihydroxy-docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z) (NPD1). La NPD1 est produite en réponse à un stress oxydatif ou via l'activation des neutrophiles. La NPD1 a une action anti-inflammatoire,

elle atténue la transmigration des neutrophiles et protège les cellules épithéliales de la rétine contre l'apoptose induite par le stress oxydatif [325]. Elle montre aussi des effets de protection dans des modèles d'ischémie cérébrale [326] et d'Alzheimer [327]. La NPD1 augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, diminue l'expression de protéines pro-apoptotiques Bax et Bad et diminue l'activité de la caspase-3 [328]. La NPD1 diminue aussi l'inflammation des voies respiratoires dans des modèles d'asthme et d'allergie [329]. Elle réduit de plus l'infiltration de leucocytes dans un modèle de péritonite [330] et protège le rein lors d'une ischémie-reperfusion [323].

Il apparaît maintenant évident que les résolvines et protectines ont un rôle bénéfique dans plusieurs modèles expérimentaux d'inflammation chronique en permettant le retour du tissu à la normal à la suite d'une période inflammatoire sans compromettre la défense de l'organisme en causant une suppression immune. De ce fait, les ω -3 peuvent améliorer les symptômes cliniques de plusieurs maladies inflammatoires par la synthèse des résolvines et protectines. Dans une étude publiée dans les dernières années, les concentrations plasmatiques de résolvine présentes chez des patients sains qui reçoivent des suppléments d' ω -3 quotidiennement sont dénombrées. Les patients se sont nourris de capsules d' ω -3 à raison de 4g/jour contenant 35% d'EPA et 25% de DHA. Des concentrations de 26 pg/mL de RvD2, de 31 pg/mL de RvD1 et de 161 pg/mL de At-RvD1 sont dénombrées avec des niveaux de NPD1 sous la limite de détection [331]. Donc, avec des ω -3 consommés chez l'humain, il est possible d'obtenir des quantités de résolvines semblables aux concentrations observées dans les modèles expérimentaux ayant des effets bénéfiques dans le cadre de la résolution de l'inflammation.

2.2.3.2.4 Marésines

Enfin, le DHA peut être converti en marésines, un médiateur issu des macrophages. Les LOX exprimées par les macrophages convertissent le DHA en 14S-HpDHA, suivie d'une époxydation en intermédiaire 13(14)-époxyde qui est ensuite convertie en Marésine 1 (maR1). Ce dernier diminue aussi l'infiltration des leucocytes et active la phagocytose [292, 332], ces effets sont démontrés dans un modèle de péritonite [332].

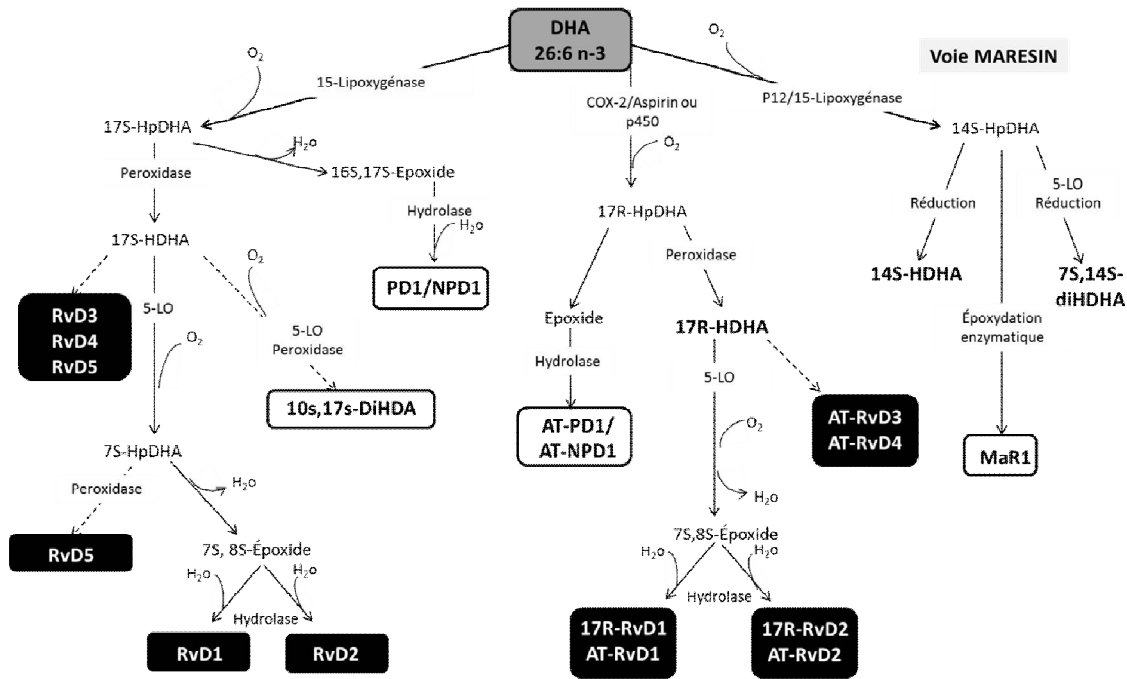


Figure 8. **Métabolites provenant du DHA et impliqués dans la résolution de l'inflammation.** La 15-lipoxygénase (15-LOX) aboutit à la formation des résolvines (RvD1 à 5) et aux protectines (PD1 et NPD1). La cyclo-oxygénase 2 (COX-2) acétylée par l'aspirine conduit à la formation de la série 17R de résolvine (17R-AT-RvD1-4) et aux protectines (AT-PD1 et AT-NPD1). Les 12 et 15 lipoxygénases aboutissent de plus à la formation des marésines (MaR1) [286].

2.3 Ratio oméga-3/oméga-6

Les AG essentiels, ALA et LA, utilisent les mêmes enzymes afin d'aboutir aux ω -3 et ω -6 à longues chaînes EPA-DHA et AA, respectivement. Puis, les COX et LOX conduisent à la formation d'eicosanoïdes prostaglandines, thromboxanes et de leucotriènes. Elles sont aussi partagées, tout comme les synthases. Le ratio d'AG acquis par la diète est donc à prendre en considération puisque ceux-ci partagent le même métabolisme [248, 333].

D'abord, la série d'elongases et de désaturases permet d'obtenir l'EPA-DHA et l'AA à partir de l'ALA et de LA. Certaines études montrent une inhibition de la formation d'AA avec des suppléments en ALA et avec de l'huile de poisson [334, 335]. L'action des désaturases semblerait avoir une préférence pour les ω -3, mais une alimentation élevée en LA interfère avec le métabolisme d'ALA [249, 336]. Une étude réalisée chez l'homme démontre une faible conversion, voire une impossibilité à détecter les niveaux d'AA avec une diète contenant de LA et de l'ALA versus des niveaux plus élevés de DHA et d'EPA. Ce sont les lipides plasmatiques qui ont été mesurés par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse [336]. Toutefois, cette expérience a été réalisée chez quatre hommes seulement. Le substrat favorisé par la Δ 6-désaturase dépendrait de l'espèce, du tissu et plutôt des concentrations de chaque acide gras présentes [337]. De plus, la Δ 6-désaturase est davantage perçue au niveau du foie, du cerveau, du coeur et du poumon. Donc, ce sont à ces endroits que la formation d'AA, d'EPA et de DHA, à partir de LA et d'ALA, serait favorisée. Plusieurs composantes affectent l'expression de cette enzyme, dont l'âge, les hormones [338] et certaines maladies comme le cancer [339] et le diabète [340]. Son expression se voit diminuée. C'est donc à prendre en considération puisque la formation des AG à longues chaînes sera défavorisée. Plusieurs facteurs alimentaires influencent aussi l'activité des désaturases et elongases. Il a été démontré qu'une diète riche en gras saturés ou en gras trans ainsi que l'alcool et la caféine diminue l'activité de ces enzymes [341]. Également, le zinc, le magnésium, le sélénium, le complexe de vitamine B et la vitamine C sont des cofacteurs importants pour l'activité des elongases et des désaturases. Une déficience ou une faible alimentation en ces cofacteurs peuvent diminuer la conversion d'ALA et LA en EPA-DHA et AA [342]. Des variations génétiques dans les gènes codants pour la Δ 5 et Δ 6 désaturase influencent aussi les niveaux d'AG à longues chaînes au niveau plasmatique [343]. De ce fait, l'analyse de ces gènes devrait être prise en considération dans les études abordant la conversion des AG à longues chaînes à partir d'ALA et de LA. Ces polymorphismes peuvent aussi expliquer les divergences dans les résultats. Enfin, l'aboutissement à l'EPA et au DHA serait plutôt obtenu d'après la quantité ingérée d'ALA, non pas nécessairement selon le ratio ALA/LA consommé [344]. Une étude réalisée chez des sujets sains démontre que la conversion en EPA et DHA dépend de la quantité présente d'ALA plutôt que du ratio ALA:LA. Les sujets ont reçu durant quatre semaines une diète contrôle (ratio ALA (0,4%): LA (7%) 1:19). Puis, pendant six autres

semaines, ils ont reçu la diète contrôle, une diète pauvre en LA (ratio ALA (0,4%): LA (3%) 1:7) ou une diète riche en ALA (ratio ALA (1.1%) : LA (7%) 1:7). Bien que le ratio reste le même, la conversion d'ALA en EPA a été démontrée dans tous les groupes, mais de manière supérieure dans le groupe avec la diète riche en ALA. La conversion en DHA était très faible, mais augmentée dans le groupe avec la diète riche en ALA aussi. De ce fait, la conversion d'ALA serait davantage perçue selon la quantité présente plutôt que le ratio [344].

Les facteurs cités précédemment peuvent donc expliquer la controverse dans la littérature quant au taux de conversion d'ALA et de LA en EPA-DHA et en AA. La plupart des études démontrent qu'une quantité faible d'EPA-DHA serait obtenue à partir d'ALA. Il serait donc plus efficace d'en consommer directement [345]. Une étude réalisée chez l'humain montre que 5% d'ALA, obtenu à travers une alimentation enrichie en ALA, est converti en EPA au niveau plasmatique et moins de 0,5% en DHA plasmatique. Les mêmes résultats s'obtiennent en retraçant le métabolisme d'ALA. La conversion chez l'humain en santé, même en consommant une grande quantité d'ALA, montre peu d'augmentations de DHA plasmatique. Il en est de même pour l'AA où LA est peu converti en AA, soit moins de 0,1% au niveau plasmatique [346]. Pour l'AA, LA est peu convertie en AA, soit moins de 0,1% au niveau plasmatique [345]. Une autre étude réalisée chez une population japonaise où l'huile de soya a été remplacée par de l'huile de périlla riche en ALA et ramenant un ratio ω -6/ ω -3 de 4:1 à un 1:1, démontre des niveaux plasmatiques augmentés d'ALA (de 0,8% à 1,6%), d'EPA (de 2,5% à 3,6%) et de DHA (de 5,3% à 6,4%) après dix mois d'intervention. Par contre, aucun effet n'a été observé au niveau du cholestérol, du triacylglycérol et de la glycémie [347]. La conversion est aussi limitée dans cette étude. Les femmes ont toutefois plus de facilité à convertir ALA en EPA et DHA que les hommes afin de permettre un apport adéquat au fœtus lors d'une grossesse ou au bébé lors de la lactation [348]. Néanmoins, chez des gens ne consommant pas de poisson, les taux d'EPA sont semblables aux personnes qui en consomment. Donc, la conversion d'ALA en EPA se fait dans ce cas-ci, mais l'AA est présente en quantité très faible et la conversion en DHA est moindre [349]. Lorsque les AG à longues chaînes sont consommées par la diète, leur synthèse à partir d'ALA et LA est inhibée, ce qui peut expliquer le faible taux de conversion présent chez l'homme non végétarien avec une alimentation variée [242]. La plupart des études réalisées chez l'humain converge vers une

faible conversion de ALA en EPA et une quasi impossibilité à produire du DHA à partir d'ALA ou de l'EPA [350]. Par contre, chez l'animal, les études semblent davantage être contradictoires. En effet, chez le poulet, une étude a démontré qu'avec une diète enrichie en graine de chia, les niveaux plasmatiques d' ω -3 totaux augmentent, dont l'EPA et le DHA, de manière croissante avec une augmentation de chia (soit une diète contenant 7, 14, 21 ou 28% de graine de chia) [351]. Il est toutefois à noter que l'alimentation des poulets ne présente pas d'EPA et de DHA ni d' ω -6 pouvant interférer avec la conversion d'ALA. Chez le rat, le même groupe a démontré, avec une diète enrichie en graine et en huile de chia versus une diète contenant de l'huile de maïs (riche en LA), une diminution de TAG plasmatique, une augmentation de HDL plasmatique ainsi qu'une diminution du ratio ω -6/ ω -3 avec une augmentation plasmatique d'ALA, d'EPA et de DHA. Le tout suggérant une bonne alternative à consommer de l'ALA chez les gens ne consommant pas de poisson [352, 353]. Par contre, dans une étude réalisée chez le rat, il est démontré qu'avec une diète contenant seulement de l'ALA versus de l'EPA et du DHA, il y a de 10 à 30 fois moins d'EPA et de DHA au niveau du foie, du cœur, du cerveau et dans le sérum qu'une diète contenant aussi de l'EPA et du DHA. La conversion est donc moindre comparativement au fait de consommer directement de l'EPA et du DHA [354]. La conversion de l'ALA en EPA et en DHA se fait autant chez l'humain que chez l'animal, bien qu'elle semble être moins perçue chez l'humain. Bref, plusieurs paramètres doivent être pris en considération pour qu'une telle conversion se fasse, soit la prise d'EPA, de DHA, d'AA et de LA qui pourrait interférer dans le métabolisme de ALA ainsi que l'expression des désaturases et élongases.

Quant à l'incorporation des AG au niveau des membranes, les ω -3 et ω -6 entrent en compétition pour la position C-2 des phospholipides [355]. L'incorporation des ω -3 et des ω -6 dans les phospholipides du foie, au niveau du plasma et au niveau du cœur a été étudiée chez le rat nourri avec de l'huile de poisson et de l'huile de maïs pendant deux semaines. La quantité totale d'AG insaturés était de 53% à 60% au niveau du foie et du plasma et de 70% à 73% au niveau du cœur. Les ω -3 et ω -6 ont été incorporés de manière semblable et se sont substitués l'un à l'autre en fonction de la quantité ingérée, le tout suggérant qu'ils compétitionnent pour la position C-2 des phospholipides membranaires. De plus, LA peut aussi inhiber l'incorporation de l'EPA dans les membranes cellulaires [355]. De ce fait, une alimentation riche en ω -3

entraîne une accumulation plus importante de ces AG au niveau des membranes au détriment des ω -6. L'inverse est aussi vrai, un apport important en ω -6 cause leur accumulation dans les membranes au détriment des ω -3 [356]. Un apport élevé en poisson ou huile de poisson montre que l'EPA et le DHA remplacent l'AA dans les membranes cellulaires, spécialement au niveau des plaquettes, des érythrocytes, des neutrophiles, des monocytes et des cellules du foie. Le niveau membranaire d'AA dépend de l'alimentation, ce qui n'est pas le cas des protéines prises dans l'alimentation par exemple [249]. De plus, LA peut aussi inhiber l'incorporation de l'EPA dans les membranes cellulaires [357]. ALA et LA peuvent aussi s'incorporer aux phospholipides membranaires. La quantité plasmatique semble se faire en fonction de la quantité ingérée, toutefois la quantité retrouvée dans les tissus pourraient différer. Une étude réalisée dans des cellules épithéliales humaines du tractus respiratoire démontre que les deux AG sont incorporés au niveau des membranes cellulaires dans deux lignées de cellules différentes, toutefois LA est davantage incorporé pour la même quantité administrée d'ALA. Il faut de 5 à 10 mg/mL de LA pour atteindre 50% d'incorporation tandis qu'il en faut de 10 à 20 mg/mL pour ALA. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse que ALA pourrait être métabolisé plus rapidement ou encore rapidement oxydé par le foie [358].

Puis, la formation des eicosanoïdes se fait en fonction du ratio d' ω -3/ ω -6 présent. Pour aboutir à la formation des prostaglandines, des thromboxanes et des leucotriènes, la première étape consiste en la libération des AG à longues chaînes par les phospholipases. Celles-ci ne semblent toutefois pas avoir de préférence pour l'un ou l'autre des AG. La compétition se fait au niveau des COX et des LOX. Le substrat favorisé pour les COX est l'AA, toutefois l'EPA utilise aussi la COX-1 et la COX-2 à plus faible niveau, et peut inhiber la formation de prostaglandines à partir de l'AA par la COX-1 [245]. Un ratio ω -3/ ω -6 plus élevé semble diminuer la formation des prostaglandines de série 2 au profit de la série 3. Une étude réalisée chez le rat a démontré l'effet d'une huile riche en ω -3, d'une huile riche en ω -6 ou d'un placebo (de l'eau) dans les lésions du foie causées par une ischémie-reperfusion du foie. Ils ont montré que les rats recevant l'huile riche en ω -3 ont une augmentation du ratio ω -3/ ω -6 au niveau du sang et du tissu hépatique. Après la reperfusion, les niveaux de TXB₂ et de PGE₂ dans le foie ont diminué avec le groupe ω -3 contrairement au groupe recevant les ω -6. Le tout démontre qu'un apport élevé en ω -3 prévient la formation des métabolites issus des ω -6. Les niveaux

plasmatiques de TNF- α et d'IL-6 ont aussi diminué avec les ω -3. L'expression de l'ARNm de la COX-2 est augmentée dans tous les groupes, sans toutefois y avoir de différence entre les groupes [359]. Il en est de même chez l'humain. Des hommes en santé recevant des suppléments d'huile de poisson (EPA et DHA) pendant quatre semaines ont montré une diminution de la production de PGE₂ [360]. De la même manière, un ratio plus élevé en ω -3 inhibe la formation de leucotriènes de type 4 pour avantager celle de la série-5 par compétition pour les lipoxygénases. Des neutrophiles et des monocytes de huit volontaires en santé ont démontré une diminution de la réponse chémotaxique à LTB₄ (de 69% après trois semaines et de 93% après dix semaines) avec des suppléments contenant 9.4g d'EPA et 5g de DHA [361]. Une autre étude a aussi démontré, dans des granulocytes humains, que la formation des leucotriènes de série 5 (LTC₅, LTD₅ et LTE₅) dépendait du niveau d'EPA exogène, tandis que la série 4 (LTC₄, LTD₄ et LTE₄) dépendait du niveau d'AA exogène. Toutefois, l'administration d'EPA ne changeait pas la formation de la série 4 de l'AA. Chez des patients sains recevant 7g/jour d'EPA + DHA pendant six semaines, il y avait des niveaux équivalents de LTE₅ et de LTE₄ au niveau plasmatique. Toutefois, l'excrétion urinaire de LTE₄ a diminué de 35% chez ces patients [362]. Un apport plus élevé en ω -3 augmente la production de ses métabolites, toutefois tous ne s'entendent pas à savoir si la production de ceux émanant des ω -6 en est altérée. Pour ce faire, il faudrait, en plus d'augmenter l'apport en ω -3, diminuer l'apport en ω -6. Finalement, les différentes synthèses pourraient aussi avoir une affinité plus ou moins grande pour l'une ou l'autre des voies comme discuté précédemment. L'impact ne semble toutefois pas majeur [363].

Un important changement dans l'apport des ω -3 et -6 est apparu dans les dernières 150 années. Auparavant, les ω -3 se retrouvaient partout : viande, plantes, œufs, poissons, noix et baies. Avec les changements apportés dans l'agriculture moderne, les quantités d' ω -3 ont grandement diminuées en raison de l'alimentation des animaux constituée principalement de grains et à la production d'huile végétale à partir de grains de maïs, de tournesol et de soya, favorisant ainsi un apport élevé en ω -6 au détriment des ω -3. Avec l'industrialisation des sociétés, une augmentation de l'apport énergétique consommé, une diminution de l'énergie dépensée, une augmentation dans l'apport en gras saturés, en ω -6 et en gras trans ont été observés [249]. Les gras trans interfèrent de plus avec les désaturases et élongases impliquées

dans la synthèse des ω -3 et ω -6, donc diminuent la synthèse d'AA, d'EPA et de DHA [364]. Ainsi, le ratio ω -3/ ω -6 consommé par les nord-américains est passé de 1/1 à 1/15-20 en quelques décennies seulement, ce qui peut certainement expliquer la progression de maladies inflammatoires et cardiovasculaires dans nos sociétés, bien que le vieillissement de la population puisse aussi être responsable de cette progression [365].

Le métabolisme des AG semble être fait pour atteindre un équilibre entre les ω -3 et ω -6 consommés. Lorsque des cellules possèdent l'habilité de transformer les ω -6 en ω -3 via l'expression de la désaturase de l'AG ω -3, peu importe la quantité consommée d' ω -6, le ratio s'équilibre autour d'un ω -3 pour un ω -6 [366, 367]. Le gène *fat-1* (*FAT Atypical Cadherin 1*) contient la séquence pour permettre l'expression de l' ω -3 désaturase qui permet la conversion des ω -6 en ω -3. Celui-ci est retrouvé chez le ver *Caenorhabditis elegans* mais il est absent chez les mammifères. Le gène de *C. elegans* a été transféré dans des cellules humaines et de souris afin de convertir les ω -6 en ω -3 [367]. Dans les cellules exprimant le gène comparativement aux cellules contrôles, le ratio ω -3: ω -6 est passé de 1:9-15 à un 1:1. Ceci est observé au niveau des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et au niveau des cellules neuronales de souris [367]. De plus, les cellules exprimant l' ω -3 désaturase produisent de 30 à 50% fois moins de PGE₂ et expriment moins de molécules d'adhésion (ICAM-1, E-sélectine, VCAM-1) que les cellules qui ne l'expriment pas. Les cellules exprimant le gène montrent aussi une diminution de l'apoptose neuronale. Dans des cardiomyocytes de rats, les cellules exprimant le gène *fat-1* montrent un effet antiarythmique lors de la présence accrue de calcium, tel qu'observé en présence de suppléments d' ω -3 [368]. De plus, le gène implanté chez la souris a montré une augmentation des quantités d' ω -3 et une diminution des ω -6 dans les organes et tissus sans qu'il y ait d' ω -3 dans l'alimentation [369]. Le ratio dans les tissus de ces souris se rapproche du 1:1. Ces souris ont des taux plasmatiques de triglycérides plus bas et sont moins susceptibles à développer de l'athérosclérose que des souris sauvages. Le tout démontrant l'importance de l'équilibre entre les ω -3 et les ω -6. D'autant plus que ce modèle pourrait permettre d'élucider les bienfaits des ω -3 sans que les facteurs tels que l'alimentation et la quantité de suppléments donnée influencent la quantité d' ω -3 incorporée aux cellules.

L'effet bénéfique sur la santé des ω -3 a d'abord été observé chez les Eskimos du Groenland qui consomment beaucoup de poisson et qui ont par le fait même peu de maladies cardiovasculaires, d'asthme, de psoriasis, de diabète de type 1 et de sclérose en plaque [370, 371]. Depuis, les ω -3 se sont avérés bénéfiques dans le développement du cerveau, les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies inflammatoires intestinales, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la santé mentale et les maladies neurodégénératives [372].

2.4 Propriétés des Oméga-3 et Oméga-6

Les membranes forment la barrière des cellules et des organelles qui leur confère une perméabilité sélective. Elles sont constituées en majeure partie de lipides et de protéines ainsi qu'en plus faible mesure de glucides sous forme de glycoprotéine ou de glycolipide. Les AG polyinsaturés consommés à travers la diète jouent sur la composition membranaire, ils sont rapidement intégrés à son contenu. Ils ont la propriété de diminuer le point de fusion et d'augmenter la fluidité membranaire [373]. Les AG ω -3 et ω -6 influencent la conformation des protéines membranaires en facilitant leur déplacement et leur arrangement en microdomaine, conduisant ainsi à un équilibre conformationnel. Un changement au niveau des protéines membranaires a un impact important sur le signallement cellulaire et le trafic membranaire. En favorisant l'équilibre, les AG polyinsaturés contribuent au fonctionnement optimal de la cellule [374, 375]. Le DHA, l'AG ayant le plus grand nombre d'insaturations, a un rôle essentiel dans la fluidité membranaire, modulant la structure et la fonction des membranes et jouant un rôle important au niveau cérébral [376]. Une déficience membranaire de DHA altère les fonctions mentales et l'acuité visuelle [377, 378]. Les AG contenus dans la membrane des mitochondries ont un rôle important dans divers processus mitochondriaux, dont le contrôle de l'homéostasie du calcium, de l'expression de gènes, de la chaîne respiratoire, de la production de ROS ainsi que sur l'apoptose mitochondriale [379].

Une fois relâchés des membranes, l'EPA, le DHA et l'AA aboutissent à la formation de leurs métabolites qui ont un rôle important dans le contrôle et le maintien d'une réponse inflammatoire [380]. Les dérivés eicosanoïdes de l'AA sont associés à un état davantage pro-inflammatoire, toutefois ce n'est pas le cas pour tous ces médiateurs. Rappelons que les lipoxines générées à partir de l'AA via les enzymes lipoxygénases ont une action anti-

inflammatoire et pro-résolution de l'inflammation. De façon générale, les prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes issus de l'AA ont une action bioactive à de très faibles quantités, donc en grand nombre ils peuvent contribuer à la formation de thrombus, d'athérome, aux allergies, à des désordres inflammatoires et à la prolifération cellulaire, notamment des adipocytes qui conduisent à l'obésité. Un apport élevé en ω -6 conduit à une situation physiologique pro-thrombotique, pro-agrégante avec une augmentation de la viscosité sanguine, au vasospasme et à une vasoconstriction prononcée [249]. Les dérivés des ω -3 EPA et DHA participent à une action anti-inflammatoire en inhibant la production de médiateurs inflammatoires issus des ω -6 par compétition enzymatique, mais aussi par d'autres médiateurs. Les résolvines E et D ainsi que les protectines en découlant ont une action anti-inflammatoire et pro-résolution de l'inflammation [288, 381]. De plus, certains des métabolites issus des ω -3 ont une action pro-inflammatoire, mais moindre que celle obtenue des ω -6, donc sont souvent sans conséquence à ce niveau. Pour citer un exemple, le LTB₅ obtenu des ω -3 est un agent chimioattractant, mais plus faible que le LTB₄ issu des ω -6 [382]. Une diète riche en ω -3, au détriment des ω -6, montre une diminution des cytokines et des marqueurs pro inflammatoires IL-1 β , IL-6, TNF- α et de la protéine C réactive [383-385] ainsi que des molécules d'adhésion [386]. Une étude réalisée chez 1123 sujets en santé démontre des niveaux plasmatiques élevés d' ω -3 (ALA, EPA et DHA) associés à une diminution de marqueurs pro-inflammatoires (IL-6, IL-1ra, TNF- α et protéine C réactive) ainsi qu'à des niveaux de marqueurs anti-inflammatoires augmentés (IL-6r soluble, IL-10, TGF β) [383]. Une autre étude réalisée chez des patients avec la maladie d'Alzheimer démontre qu'une consommation quotidienne de 1,7g de DHA et de 0,6g d'EPA versus un placebo est associée à une augmentation plasmatique d' ω -3 ainsi qu'une diminution d'IL-6 et d'IL-1 β [384]. Puis, une étude réalisée chez des hommes et femmes du Japon tend à démontrer qu'une consommation plus élevée d'EPA et de DHA est associée à une diminution de la protéine C réactive dans le sérum. Cette relation n'est toutefois pas significative, mais une consommation plus élevée en ALA ou en LA est associée de manière significative à des niveaux plus bas de la protéine C réactive chez les hommes seulement. Ils ont utilisé la méthode d'agglutination au latex mesurée par néphélométrie [385]. Les ω -3 peuvent aussi avoir leur action anti-inflammatoire et pro-résolution de l'inflammation de par leur liaison au RCPG GPR120. L'activation du GPR120 entraîne une augmentation de calcium et l'activation de ERK suggérant qu'il est lié à

une protéine Gαq. Le récepteur GPR120 est exprimé sur les cellules adipeuses ainsi que sur les macrophages pro-inflammatoires. L'EPA et le DHA peuvent s'y lier et diminuer la réponse inflammatoire générée par le LPS ou le TNF-α en inhibant le NF-κB, ce qui a été démontré *in vitro* [387]. Donc, les ω-3 ont des propriétés anti-inflammatoires et pro-résolutions de la phase inflammatoire.

Finalement, les AG jouent un rôle sur l'expression génique via leur action sur des récepteurs nucléaires [388]. Les ω-3 et ω-6 s'avèrent des ligands des récepteurs de la famille PPAR, soit directement ou par leurs dérivés eicosanoïdes. Les AG à longues chaînes s'y lient plus facilement. Quatre isoformes de PPAR sont actuellement décrits : alpha, beta, delta et gamma. La liaison du ligand au récepteur cause une dimérisation avec le *retinoid X receptor*. Cette dimérisation va réguler des gènes possédant un élément de réponse à PPAR dont ceux impliqués dans le métabolisme des lipides et de l'inflammation [388, 389]. La réponse obtenue par la liaison des AG aux PPAR va dépendre du type cellulaire. La liaison à PPARα encourage la β-oxydation, les ω-3 semblent plus efficaces à l'induire [390]. D'autre part, les AG peuvent aussi lier PPARγ, réduisant ainsi l'expression de gènes inflammatoires, tout comme ils peuvent inhiber ceux induits par NF-κB codant pour des cytokines inflammatoires, molécules d'adhésion ou chémokines [391]. En amont, les ω-3 ont montré une diminution de la phosphorylation de l'inhibiteur κB du NF-κB, le gardant ainsi inactif [392].

2.4.1 Maladies cardiovasculaires

Un regard s'est porté sur les ω-3 en raison de l'observation du peu d'incidences de maladies cardiovasculaires chez les populations du Grand Nord [393]. De plus, des études épidémiologiques arrivent à la conclusion qu'un apport important en fruit de mer ou poisson à haut niveau d'ω-3 diminue l'incidence de pathologies cardiovasculaires. La conclusion à ce niveau est qu'un apport élevé en ω-3 confère un ratio élevé ω-3 /ω-6 et une diminution d'atteintes cardiovasculaires, contrairement aux nord-américains qui présentent un ratio qui tourne autour de 1/15 à 20 [394]. De nombreuses études ont démontré qu'une consommation élevée de poisson ou d'huile de poisson diminue les chances d'être atteint de plusieurs maladies cardiovasculaires : IM, mort subite cardiaque, maladies coronariennes, fibrillation auriculaire et défaillance cardiaque. Ceci est dû aux effets bénéfiques que procurent les ω-3,

plus précisément les longues chaînes EPA/DHA sur le plan cardiovasculaire impliquant une action hypotriglycéridémique, hypotensive, anti-inflammatoire, anti-athérosclérotique et anti-arythmique [395].

En premier lieu, des concentrations élevées sanguines de triglycérides sont liées à un risque accru de maladies cardiovasculaires. Toutefois, il est intéressant de noter que les ω -3, obtenus par une consommation maritime plus que végétale, diminuent les niveaux de triglycérides sanguins [396, 397]. Une consommation de 3,8g d'EPA, de 3,6g de DHA ou de 4,0g d'huile de maïs (groupe contrôle) chez des hommes en santé a démontré une diminution des triacylglycérols (TAG) sanguin dans les groupes recevant l'EPA et le DHA. L'EPA a aussi montré une diminution de l'apolipoprotéine A et du cholestérol total, tandis que le DHA a montré une augmentation du *high density lipoprotein* (HDL). Puis, le groupe EPA a montré une augmentation d'EPA plasmatique (de 297%) avec une diminution du DHA plasmatique (de 15%) suggérant que l'EPA n'est pas allongé en DHA. Le groupe DHA a montré une augmentation plasmatique de DHA (de 69%) et d'EPA (de 29%) suggérant une possible rétroconversion [397]. Les AG ω -3 diminuent aussi la synthèse de particules *very low density lipoprotein* (VLDL) qui transportent les triglycérides vers le foie, augmentent la clairance des triglycérides associés aux VLDL et aux chylomicrons via l'action possible d'enzymes telle la lipoprotéine lipase. Ceci contribue à une diminution des triglycérides sanguins [398]. D'autre part, les AG et eicosanoïdes dérivant des ω -3 sont des ligands des récepteurs PPAR, ce qui contribue à une augmentation de la β -oxydation des AG et à une diminution de la lipogenèse hépatique. Puis, le *sterol-regulatory-element-binding-proteins*, régulé de façon négative par les ω -3, diminue l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des AG [399]. Donc, par leurs actions, les ω -3 collaborent à la diminution des triglycérides sanguins. Cela s'avère efficace chez des patients hypertriglycéridémiques. Une dose de trois à quatre grammes par jour permet de réduire les niveaux de triglycérides de 30 à 45% [396].

Dans un deuxième temps, l'hypertension artérielle entraîne un risque accru d'atteintes cardiovasculaires. Il est estimé que 20% de la population mondiale adulte souffrent d'hypertension, la prévalence augmentant avec l'âge [400]. Les ω -3 peuvent moduler la pression sanguine. Ils se sont d'ailleurs montrés efficaces dans bons nombres de modèles

expérimentaux [401-403] ainsi que chez des patients hypertendus [404-406]. Les mécanismes d'action proposés pour cette action antihypertensive des ω -3 sont une inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, une augmentation de la biodisponibilité du NO, une diminution de la production de vasoconstricteurs et l'action de prostanoides vasoactives. De plus, les ω -3 activent le système nerveux parasympathique, produisant une vasodilatation [407, 408].

Troisièmement, l'effet anti-inflammatoire des ω -3 décrit précédemment peut contribuer à une incidence plus faible de maladies cardiovasculaires. De par cette action, ces AG peuvent stabiliser les plaques athéromateuses, l'inflammation étant un processus important contribuant à l'athérosclérose [409]. Une étude conduite sur une période de deux ans montre qu'un supplément d'huile de poisson (EPA et DHA), chez des patients avec antécédents de maladies coronariennes, diminue la progression des plaques athéromateuses et encourage même leur régression. Celle-ci a été observée par une augmentation du diamètre du vaisseau [410]. De plus, les ω -3 s'incorporent aux plaques athéromateuses lorsque consommés, ce qui les stabilise, contrairement aux ω -6 [411]. Cette étude a été réalisée chez des patients en attente d'une endartériectomie carotidienne. Trois groupes ont été formés, soit un groupe contrôle, un groupe recevant de l'huile de tournesol (source de LA) et un groupe recevant des capsules d'huile de poisson (1,4g d'EPA et de DHA par jour). Les plaques des patients recevant l'huile de poisson ont montré moins de capsules fibreuses minces, moins d'inflammation mesurée par les macrophages résidents dans la plaque et davantage de capsules fibreuses épaisses contribuant à la stabilité de la plaque [411]. Les effets bénéfiques des ω -3 peuvent aussi s'expliquer par une diminution de l'agrégation plaquettaire encouragée par les ω -3 [412]. Rappelons que les eicosanoïdes dérivés des ω -3 antagonisent ceux obtenus des ω -6. De ce fait, la TXA_3 issue des ω -3 antagonise l'effet pro-agrégant de la TXA_2 .

Dans un quatrième temps, les ω -3 ont un effet antiarythmique, mais celui-ci dépendrait de l'état pathologique cardiaque et des mécanismes à la cause de l'arythmie, celle-ci étant caractérisée par une activité irrégulière du tissu cardiaque [413]. Ces AG modulent les canaux ioniques, principalement les canaux sodiques dépendants du voltage, les canaux calciques de type L et les canaux potassiques sortants, encourageant une action antiarythmique [414].

En somme, les ω -3 contribuent à la santé cardiovasculaire et peuvent diminuer la mortalité y étant reliée tout en étant bénéfiques en prévention secondaire. Toutefois, plusieurs études aboutissent à des conclusions négatives sur l'effet des ω -3 sur la santé cardiovasculaire. La méta-analyse de Rizos et de ses collaborateurs parue dans JAMA en 2012 arrive à la conclusion que des suppléments d' ω -3 ne montrent pas de diminution de mortalité, de mort cardiaque ni d'IM [415]. Une étude évaluant l'effet de suppléments d' ω -3, EPA, DHA et ALA donnés dans une margarine à des patients survivants d'un IM, ne montre pas non plus d'effet sur l'incidence d'événements cardiovasculaires [416]. Ce ne sont donc pas toutes les études qui sont concluantes quant à l'effet des ω -3 sur la santé cardiovasculaire. Plusieurs paramètres doivent être à prendre en considération lorsque des suppléments d' ω -3 sont envisagés, comme la prise d' ω -6 par exemple qui compétitionne avec le métabolisme des ω -3.

2.4.1.1 Infarctus du myocarde

Les ω -3 ne semblent pas avoir d'effet sur la survenue d'un premier IM [417]. Toutefois, ils diminuent l'incidence de mort cardiaque soudaine et s'avèrent ainsi bénéfiques en prévention secondaire pour l'IM [418]. Deux études ont été réalisées chez un bon nombre de patients survivants d'un IM : l'étude GISSI-prevenzione (*Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico*) où des patients ont eu des suppléments d' ω -3 sous forme végétale et marine à une dose d'un gramme par jour sur une période de trois à cinq ans [419] ainsi que l'étude DART (*diet and reinfarction trial*) où les patients ont ajouté à leur alimentation deux portions de poisson par semaine pendant une période de deux ans [420]. Ces études ont démontré une diminution de toute cause de mortalité celle reliée au système cardiovasculaire. De plus, un bas niveau d'EPA est un indicateur de mortalité chez les patients ayant subi un IM [421]. Une étude danoise a de plus évalué le risque d'épisode de syndrome coronarien en fonction de l'ingestion de poisson riche en ω -3. Celle-ci était évaluée avec un journal alimentaire effectué par des patients. Cette étude a montré que les patients ayant une consommation plus élevée en poissons gras avaient un risque plus faible de syndrome coronarien [422]. De plus, une autre étude a démontré que les patients avec un IM ont des niveaux plasmatiques d'ALA, d'EPA, de DHA et d' ω -3 totaux plus faibles qu'un groupe

contrôle. La quantité d' ω -3 consommée serait donc un risque négatif d'épisode d'IM [423]. Par contre, comme mentionné précédemment, certains groupes de chercheurs, dont le groupe de Rizos, n'arrivent pas à la même conclusion quant aux effets des ω -3 sur la santé cardiovasculaire. Ces études seront davantage discutées dans la section discussion.

De plus, une prise d' ω -3 avec de l'huile de poisson avant l'apparition d'un IM diminue la taille de l'infarctus évaluée par la créatine phosphate et l'activité du lactate déshydrogénase chez les patients [424, 425]. Bien que chez le patient les études soient davantage contradictoires quant à l'effet des ω -3, dans les modèles expérimentaux, l'effet s'observe avec moins de controverses. Ceci peut s'expliquer par les multiples facteurs présents chez l'humain qui ne sont pas contrôlés comme la population étudiée, la taille de l'échantillonnage étudiée, le type de supplément, la compliance au traitement, les autres traitements, les points limites, etc. versus chez l'animal, où il y a moins de variables incontrôlables. Une étude qui donnera beaucoup de renseignements sur l'effet des ω -3 chez des survivants d'un IM est en cours. Les résultats devraient apparaître dans les prochaines années. Il s'agit de l'étude OMEMI qui étudie l'effet d'un placebo (huile de maïs) versus des capsules de 1,8g d'EPA + DHA données quotidiennement à des patients âgés sur une période de deux ans. Dans cette étude, la compliance au traitement sera mesurée par le profil sanguin d'AG des patients [426]. Chez le patient, peu d'études sont réalisées avant l'IM puisqu'il n'est pas possible de prédire un tel événement donc, elles ne peuvent pas être comparées aux études expérimentales. Par contre, une étude réalisée en prévention chez des patients survivants à un IM a démontré un effet antiarythmique des ω -3 à la suite d'une chirurgie de pontage aortocoronarien. Cinq jours précédents la chirurgie, les patients ont reçu deux grammes d'EPA+DHA de manière quotidienne et ont été comparés à des patients recevant la même chirurgie, mais sans ω -3. Les patients recevant des ω -3 ont démontré moins de fibrillations auriculaires que ceux n'en recevant pas [427].

Toutes les études cliniques ne sont pas concluantes quant à l'effet des ω -3 sur la santé cardiovasculaire. L'étude "Alpha Omega Trial" réalisée aux États-Unis, ne démontre pas de prévention secondaire à la suite de l'IM avec les ω -3. Des patients âgés entre 60 et 80 ans (4837 patients) ont reçu, à la suite de l'IM, une margarine contenant soit 400mg d'EPA et de

DHA, 2g D'ALA, l'EPA-DHA et l'ALA ou une margarine contrôle, sur une période de 40 mois. L'issue de cette étude ne démontre pas d'effet sur les événements cardiaques secondaires. Par contre, cette étude utilise de faible dose d' ω -3, chez des patients âgés, utilisant une thérapie anti-hypertensive, anti-thrombotique et qui modifie les lipides [416]. Puis, l'apport en ω -6 n'est pas mentionné dans cette étude, chez ses patients américains. Ces patients ne démontrent pas non plus de changement dans l'expression de la protéine C réactive [428]. L'étude ORIGIN, impliquant des patients avec haut risque de problèmes cardiovasculaires et avec des problèmes de gestion de la glycémie, ne démontre pas de bénéfice cardiovasculaire à utiliser des suppléments d'un gramme d' ω -3 chaque jour sur une période de six ans. Par contre, les patients démontrent une diminution des triglycérides sanguins avec la prise d' ω -3. Dans cette étude, la prise d' ω -6 ou des autres gras n'est pas mentionnée. Toutefois, étant donné que les patients sont à risque de maladies cardio-vasculaires, il est probable que ceux-ci consomment d'autres médicaments pouvant interférer avec le métabolisme des ω -3 et possiblement une alimentation élevée en ω -6 et autres gras [429].

Autrement, les études réalisées chez les animaux tendent à démontrer un potentiel cardioprotecteur prometteur des ω -3. Chez le rat, des ω -3 consommés via des sources végétale et animale montrent une augmentation de leur présence dans le plasma, dans les membranes, dans les mitochondries cardiaques et corrélient avec une diminution de la taille d'un infarctus [430]. Chez le lapin, une infusion d' ω -3 diminue la taille de l'infarctus par une régulation positive potentielle de la protéine de choc thermique 72, une protéine impliquée dans la cardioprotection, et montre une diminution des lésions oxydatives [431, 432]. Chez le cochon, une infusion péricardiaque de DHA montre aussi une diminution de la taille de l'infarctus ainsi que d'arythmie ventriculaire responsable de nombreuses mortalités chez des patients à la suite d'un IM. La diminution dans la taille de l'infarctus par les ω -3 pourrait s'expliquer par un rythme cardiaque plus lent en période ischémique diminuant ainsi la demande en oxygène, par une diminution de l'inflammation, de l'agrégation plaquettaire ou encore par une inhibition du procédé apoptotique [433]. Plus précisément, des travaux montrent, dans notre modèle expérimental d'IM, qu'une diète riche en ω -3 (ratio de un ω -3 pour un ω -6) diminue la taille de l'infarctus et active la kinase Akt. La voie RISK serait possiblement impliquée dans la cardioprotection que confèrent ces AG à la suite d'un IM [230]. Il n'est toutefois pas connu

comment et où les ω -3 activent la voie RISK, soit par les AG à longues chaînes EPA et DHA qui activent directement GPR120, ou par leurs métabolites et leurs récepteurs respectifs. Les mécanismes restent à être élucidés. De plus, les ω -3 doivent être présents avant l'épisode pour voir son effet cardioprotecteur autant dans les études cliniques qu'expérimentales. Le but de cette présente thèse est de comprendre les mécanismes d'action des ω -3 afin de les utiliser d'une manière plus clinique et thérapeutique.

Finalement, les ω -3, en plus d'être bénéfiques en prévention primaire en raison d'une diminution dans la taille d'un infarctus, s'avèrent hautement importants en prévention secondaire. Ils diminuent l'incidence d'épisodes récurrents ainsi que la mortalité. Il est d'ailleurs recommandé aux patients post-IM d'en consommer sur une base régulière [434]. Bien que plusieurs analyses ne montrent pas d'effets des ω -3 sur le plan cardiovasculaire [415], l'absence de documentation sur l'apport en ω -6 est à considérer. Si cet apport est supérieur aux ω -3, bien que les patients prennent des suppléments, le ratio en restera déséquilibré et il y aura absence d'effets bénéfiques cardiovasculaires, assurément. Le ratio est important à prendre en considération dans de telles études.

Chapitre 3. Hypothèses

Lorsque consommée avant l'IM, une diète riche en ω -3 s'avère cardioprotectrice dans notre modèle expérimental, celle-ci diminue la taille de l'infarctus via l'activation de la voie PI3K/Akt et une diminution de l'inflammation. Comme la diète doit précéder l'IM pour avoir ses bénéfices cardioprotecteurs, l'hypothèse d'une première étude est que l'utilisation d'un métabolite issu des ω -3 pourrait s'avérer cardioprotecteur lorsque donné au moment de l'infarctus. Nous avons donc utilisé la RvD1, un métabolite issu de l' ω -3 DHA et impliqué dans la résolution de l'inflammation, pour diminuer la taille de l'infarctus lorsqu'administrée au moment de l'infarctus via possiblement la voie PI3K/Akt et une diminution de l'inflammation.

Autrement, les ω -6 sont prédominants dans la diète nord-américaine et ont une action davantage pro-inflammatoire, proagrégante et vasoconstrictrice, effets qui sont négatifs dans une maladie telle que l'IM. Dans ce contexte, où il y a un apport élevé en oméga-6, l'effet cardioprotecteur et de résolution de l'inflammation de la RvD1 peut se voir contrecarré. L'hypothèse de la deuxième étude est qu'une injection conjointe d'un ω -6, le LA, avec la RvD1 peut prévenir son effet cardioprotecteur, soit dû à une période inflammatoire plus marquée ou à l'inhibition de la voie de cardioprotection PI3K/Akt activée par les ω -3 et la RvD1.

Enfin, la troisième étude vise à élucider si ce sont les métabolites des ω -3, tels que la RvD1, qui confèrent la cardioprotection. L'inhibition du métabolisme des ω -3 par un inhibiteur de la COX-2 (Meloxicam) et de la 15-LOX (PD146176) prévient la formation de métabolites clés issus des ω -3, dont la RvD1. De ce fait, l'hypothèse de cette troisième étude est que les inhibiteurs vont prévenir la cardioprotection normalement conférée par une diète riche en ω -3, présente 10 jours avant l'IM, en prévenant le métabolisme de ceux-ci en RvD1. Il n'y aura donc pas de limitation de la période inflammatoire et d'activation de la voie de cardioprotection PI3K/Akt par la diète riche en ω -3 en présence des inhibiteurs.

Chapitre 4. Méthodologie

Les procédures expérimentales ont été décrites de manière précise dans chaque article, voici donc un résumé des méthodologies employées dans la présente thèse.

Des rats mâles Sprague-Dawley ont été achetés chez Charles River (St Constant, Québec, Canada) pesant de 300 à 375g au début de l'expérience. Les rats avaient droit à une période d'acclimatation d'un minimum de deux jours avant le début des expériences. Ils ont été logés seuls en cage à une température ambiante de 22 degrés Celsius et d'humidité de 40-50%. L'eau et la nourriture leur ont été données *ad libitum* tout au long des procédures. Toutes les manipulations faites chez le rat sont en accord avec les lignes directrices du Conseil Canadien de la Protection des Animaux (CCPA) et ont été approuvées par le comité local de protection des animaux. Pour le premier article, les études portant les titres Effet de la Résolvine D1 sur la taille de l'infarctus du myocarde et Rôle de la PI3K/Akt dans la cardioprotection induite par la résolvine D1 ont été acceptées par le comité local de protection des animaux et portent les numéros GROU31 et GROU37. Pour le deuxième article, l'étude portant le titre Effet de l'acide linoléique (oméga-6) dans l'infarctus du myocarde avec le numéro GROU34 a été acceptée par le comité local de protection des animaux. L'étude sur l'effet de l'acide linoléique sur les débits sanguins régionaux a aussi été réalisée et acceptée par le comité d'éthique animale (GROU46), les résultats n'ont toutefois pas été concluants et seulement discutés dans l'article. Puis, pour le troisième article, les protocoles GROU33 Rôle de la cycloogénase-2 et de la lipoxigénase-15 dans la cardioprotection observée par les acides gras oméga-3 et GROU43 Rôle de la cycloogénase-2 et de la lipoxigénase-15 dans la cardioprotection observée par les acides gras oméga-3, leur impact avec une diète standard, ont été acceptés par le comité de protection des animaux local.

Les rats ont été nourris avec une diète standard (Charles River, numéro de catalogue 5075, USA) (articles 1 et 2) ou une diète riche en ω -3 (TD.08484 Harlan Teklad, Madison WI, USA) (article 3) avant l'IM qui a été provoquée par l'occlusion de l'artère coronaire gauche descendante pendant 40 minutes. Pour les articles 1 et 2, les rats ont été nourris par la diète

standard de Charles River trois à cinq jours avant l'IM. Puis, ils ont subi l'IM et ont été sacrifiés à la suite de 30 minutes de reperfusion ou de 24 heures de reperfusion. Pour l'article 3, les rats ont été nourris soit à avec la diète standard de Charles River ou avec la diète riche en ω -3 pendant 10 jours avant l'IM. Les rats ont ensuite subi l'IM et ont été sacrifiés à 30 minutes ou à 24 heures de reperfusion. Tous les rats de chaque protocole et de chaque article ont subi un IM et ont donc été anesthésiés à la kétamine/xylazine préalablement à la chirurgie thoracique (méthode décrite précisément dans la section méthode de chaque article). Toutefois, les rats n'ont pas été anesthésiés avant le sacrifice. Le prélèvement d'organes et de plasma a été fait pour différentes analyses. Les drogues anesthésiantes pourraient interférer avec ses analyses.

La RvD1 a été donnée à des doses de 0,01, 0,1 et 0,3 μ g (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) couplée ou non au LY-294002 200 μ g/kg (Sigma-Aldrich life Science, St-Louis, MO, USA) pour le premier article et à une dose de 0,1 μ g seulement dans le deuxième et dans le troisième article. L'acide linoléique a été donnée à des doses de 1, 5 et 10 μ g (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) dans le deuxième article. La RvD1 et l'acide linoléique ont été administrés cinq minutes avant le début de l'ischémie dans tous les protocoles. Les inhibiteurs (Meloxicam 1mg/kg AK Scientific, Inc., Union City, CA, USA et PD146176 5mg/kg Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA; article 3) ont été donnés au 8^e et 9^e jour de la diète standard ou riche en ω -3 puis cinq minutes avant le début de l'ischémie dans le cadre du troisième article.

Les rats ont été sacrifiés par décapitation après une période de 24 heures de reperfusion, dans les trois articles. Le coeur a été prélevé pour évaluer la taille de l'infarctus. La taille de la zone à risque a été évaluée par une coloration au bleu d'Evans et la taille de l'infarctus a été évaluée à l'aide d'une solution de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) (articles 1,2 et 3). Une section du coeur a été gardée à 24 heures de reperfusion afin de quantifier l'accumulation des neutrophiles dans les régions ischémiques par le dosage colorimétrique de l'activité de la myéloperoxydase (articles 1,2 et 3). Le plasma a aussi été

prélevé à 24 heures de reperfusion pour le dosage de la RvD1 (article 3) par ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay" obtenue de Cayman Chemical Company, 96 Well Plate Item No. 500380).

Dans les trois articles, une autre série de rats a été sacrifiée par décapitation après 30 minutes de reperfusion. Le coeur a été prélevé pour différentes analyses. L'activité des caspases 3, 8 (articles 1,2 et 3) et 9 (article 2) par spectrofluorométrie a été mesurée dans les régions ischémiques du coeur. L'activité d'Akt (articles 1,2 et 3), d'Erk1/2 (article 1), de NF- κ B (articles 1 et 3) et l'expression du GPR32 (article 1) ont été évaluées par immunobuvardage.

Les différents techniques ont été décrites de manière précise dans chaque article.

Chapitre 5. Contribution des auteurs

À travers les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, j'ai participé à l'organisation et à la planification de tous les protocoles. J'ai réalisé les différentes expériences impliquant les chirurgies d'IM, le suivi et les soins du rat en pré et post-opératoire ainsi qu'à l'injection des différents composés. Avant les chirurgies, j'ai administré les différentes diètes aux rats en compilant la quantité mangée et le poids des rats, toujours pour s'assurer du bien-être de l'animal. J'ai par la suite réalisé la plupart des analyses biochimiques, analysé les résultats et participé à la rédaction et à la correction des différents articles.

Pour réaliser toutes ces expériences, mon directeur de recherche, Dr Guy Rousseau, m'a grandement aidée dans la supervision des travaux et la réalisation des expériences ainsi que dans la rédaction des articles. Puis, les étudiants et stagiaires du laboratoire, les différents coauteurs des articles, m'ont aidée au niveau des expériences biochimiques, m'ont assistée dans les chirurgies, et ont assuré le bien-être des rats tout au long des différents protocoles. Ils ont été mis en ordre d'auteur selon leur contribution dans les articles.

Chapitre 6. Premier article: Resolvin D1 reduces infarct size through a phosphoinositide 3-kinase /protein kinase B mechanism

6.1 Publication

La première étude «Resolvin D1 reduces infarct size through a phosphoinositide 3-kinase /protein kinase B mechanism» a été acceptée en février 2015 et publiée dans le journal "The Journal of Cardiovascular Pharmacology" en date de mars 2015 [435].

Resolvin D1 reduces infarct size through a phosphoinositide 3-kinase /protein kinase B
mechanism

Kim Gilbert M.Sc.^{1,2}, Judith Bernier B.Sc.^{1,2}, Valérie Bourque-Riel^{1,2}, Mandy Malick Ph.D.^{1,2},
Guy Rousseau Ph.D.^{1,2}

¹Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest,
Montréal, Québec, Canada H4J 1C5

²Département de pharmacologie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville,
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Running Title : Resolvin D1 and myocardial infarction

Address for correspondence and reprints:

Guy Rousseau, Ph.D.
Centre de biomédecine
Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal
5400 boul. Gouin Ouest
Montréal (Québec) Canada H4J 1C5

This work was supported by a grant from *La Fondation des Maladies du Coeur du Canada*.

Kim Gilbert holds a studentship from *Fonds de la recherche en santé du Québec*.

Abstract

This study was designed to determine if Resolvin D1 (RvD1), a pro-resolution metabolite of the omega-3 PUFA docosahexaenoic acid, could decrease myocardial infarct size while delivered at the onset of ischemia.

Male Sprague-Dawley rats underwent 40 min of myocardial ischemia followed by reperfusion. These animals received 1 intraventricular injection of RvD1 (0.01 µg, 0.1 µg or 0.3 µg RvD1) or vehicle (saline) before coronary occlusion. Infarct size and neutrophil accumulation were evaluated 24 h after the onset of reperfusion. Caspase-3, caspase-8, protein kinase B (Akt) activities were evaluated 30 min after the reperfusion.

Rats receiving 0.1µg or 0.3µg RvD1 showed a significant decrease of infarct size as well as caspase-3 and -8 activities compared to the vehicle controls. Neutrophil accumulations were reduced in rats administered RvD1 compared to vehicle, independently of dose level. Akt activation was increased only in animals receiving 0.1µg or 0.3 µg, whereas no change was observed in the 0.01µg group. When they were treated with LY-294002, a phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt inhibitor, cardio-protection by RvD1 was abrogated.

RvD1 treatment at the onset of ischemia decreases infarct size by a mechanism involving the PI3K/Akt pathway.

Introduction

After injury, inflammation is a normal process that occurs before tissue homeostasis returns. However, deleterious consequences may arise when inflammation is exaggerated and uncontrolled [1, 2]. As seen in the reperfusion phase of myocardial infarction (MI), inflammation contributes to reperfusion injury, leading to increased infarct size [1, 2]. In this context, the resolution phase of inflammation should be induced rapidly to limit the harmful outcomes [3, 4].

Omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites, such as Resolvins, have recently been discovered to evoke pro-resolution with anti-inflammatory effects [4, 5]. Resolvins of Series E (RvE) are derived from the omega-3 PUFA eicosapentaenoic acid (EPA) whereas Resolvins of Series D (RvD) originate from the omega-3 PUFA docosahexaenoic acid (DHA) [6]. EPA and DHA are converted to RvE and RvD by acetylated cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and by 5-lipoxygenase or a COX-independent pathway through cytochrome P-450 microbial or 15-lipoxygenase [5, 7]. RvE1 induces intracellular signalling through ChemR23, a G-protein-coupled receptor (GPCR) which activates the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway [8], and via BLT1 (leukotriene B4 receptor) [9]. RvD1 signals via GPR32 and ALX receptors expressed on endothelial cells and monocytes [10]. Both Resolvins have pro-resolution properties as they decrease neutrophil and dendritic cell migration in inflamed and hypoxic tissues. They promote phagocytosis and apoptotic cell clearance. They also have anti-inflammatory properties, reducing the expression of inflammatory cytokines [10, 11]. RvE1 decreases interleukin-12 (IL-12) production [5] while RvD1 blocks tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)-induced IL-1 β transcripts [12].

Although the cardio-protective role of RvE1 has been investigated [13], it remains unknown whether RvD1 administration could protect the ischemic myocardium. The present study was undertaken to determine if RvD1 could safeguard the ischemic myocardium and to identify the underlying mechanism.

Methods

Experimental design

One hundred thirteen 3-month-old Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada), weighing 325-350 g at the start of the experiments, were handled in compliance with regulations of the local animal care committee and in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care. They were housed individually, under constant conditions (temperature 21-22°C and humidity 40-50%), including a 12-h dark-light cycle beginning at 8 AM. Chow pellets, with negligible amount of omega-3 fatty acids, and tap water were available *ad libitum* throughout the study. An acclimatization period of 3 days after delivery by the supplier was imposed before the rats were randomly distributed in 1 of 2 protocols.

Protocol 1 – RvD1 treatment 5 min before ischemia

Rats were randomly assigned to 1 of 4 groups: 0.5 ml vehicle (NaCl 0.9%) or 1 of 3 RvD1 doses: 0.01 µg, 0.1 µg or 0.3 µg injected directly into the left ventricle (LV) chamber 5 min before ischemia. RvD1 (17(S)-RvD1) was procured from Cayman Chemical (Ann Harbor, MI, USA) and dissolved in 0.5 ml NaCl 0.9%. The animals were sacrificed 24 h post-MI to measure infarct size and neutrophil activity (7-8 rats by group). For the sacrifice, the rats were restrained in a cone bag and rapidly decapitated without anaesthesia since the brains were used for other studies. A subgroup of anesthetized rats (ketamine-xylazine/Isoflurane) was sacrificed by decapitation, 30 min after the onset of reperfusion for biochemical analysis (caspase-3, caspase-8, Akt, Erk1/2, nuclear factor-kappaB (NF-κB) activation and GPR32 expression) and for hemodynamic data (heart rate, mean arterial pressure and pressure-rate product (PRP)) (9-13 rats by group). A total of 3 rats (one in vehicle group and two in 0.3 µg

of RvD1 group) died during the first hours of reperfusion period and were excluded from the study.

Protocol 2 – RvD1 treatment with PI3K inhibitor LY-294002 5 min before ischemia

Four groups were constituted in this series: 0.5 ml vehicle (NaCl 0.9%), 0.1 µg RvD1, LY-294002 (200µg/kg), or 0.1 µg RvD1 and 200 µg/kg LY-294002 injected directly in the left ventricle 5 min before ischemia. The animals were sacrificed 24 h post-MI to measure infarct size (6 rats by group) by rapid decapitation, similar to protocol 1. A total of 3 rats (one in 0.1 µg RvD1 group, one in 0.1 µg of RvD1 and LY-294002 group and one in LY-294002 group) died during the first hours of reperfusion period and were excluded of the study. In a pilot study, we have confirmed that the dosage of LY-294002 used in this study was efficient to reduce Akt phosphorylation.

Surgical procedure

Anesthesia was induced by intraperitoneal ketamine/xylazine injection (60 and 10 mg/kg, respectively). Subsequently, the rats were intubated and anesthesia was maintained under isoflurane (1-2%) ventilation. Electrocardiogram and heart rate were monitored throughout the procedure with electrodes placed on the animals' paws. Left thoracotomy at the 5th intercostal space enabled occlusion of the left anterior descending coronary artery with 4-0 silk suture (Syneture; Covidien, Mansfield, MA,USA) and plastic snare. Vehicle, RvD1 or LY-294002 was injected into the left ventricle chamber 5 min before ischemia, which was confirmed by ST segment alterations and the presence of ventricular subepicardial cyanosis. The suture was removed after 40 min of ischemia, permitting myocardial tissue reperfusion. The rats were

sacrificed after 30 min of reperfusion or, with 24-h reperfusion, the thorax was closed with 2-0, 3-0 and 4-0 silk suture (Syneture; Covidien) and the animals were given a subcutaneous antibiotic injection of 15,000 IU penicillin G (Duplocillin LA, Intervet Canada Ltd., Whitby, ON, Canada) as well as subcutaneous analgesic injection (2 mg/kg buprenorphine) before being returned to their respective cages.

Hemodynamic Data

Heart rate and arterial mean pressure were measured by tail cuff technique (Kent Scientific corporation, Torrington, Connecticut, USA) before occlusion, at 20 minutes of ischemia, at the beginning of the reperfusion period and after 10 minutes of reperfusion.

Measurement of infarct size

After the reperfusion period (30 min or 24 h), the rats were restrained in a cone bag and rapidly decapitated. Their hearts were removed immediately and placed in a dish kept on crushed ice. For 24-h reperfusion, the hearts were removed and washed with saline by retrograde perfusion into aorta. The left anterior descending coronary artery was occluded at the same site as for MI induction (see above) to map the area at risk (AR) by Evans blue infusion (0.5%). The hearts were frozen (-80°C for 5 min), sliced into 4 transverse 2-mm sections and placed in 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (1%, pH 7.4) at 37°C for 10 min to better distinguish the area of necrosis (I) from the AR. The different regions were carefully drawn on a glass plate, photocopied and cut. After that, the complete infarct region, area at risk and left ventricle were weighed separately to express MI as percentage of necrosis (I) of the AR ((I/AR) x 100) and AR as percentage of the LV area ((AR/LV) x 100). The

myocardium from the AR of the heart was selected for 30-min reperfusion. Samples were kept at -80°C until needed for biochemical analysis.

Biochemical analysis

All the measurements were performed in the ischemic region.

Caspase-3 and -8 activities

Caspase-3 and -8 activities were measured according to a previously-described protocol [14]. Tissues were homogenized by sonication in lysis buffer and incubated for 30 min on ice. Tissue homogenates were centrifuged at 4°C for 10 min. Enzymatic reactions were undertaken in reaction buffer with 25 µg of protein (confirmed by the Bradford method) and fluorescent substrates (Ac-DEVD-AMC and Ac-IETD-AMC for caspase-3 and caspase-8, respectively) (40 µM). The reactions were studied after incubation in the dark for 3h at 37°C and stopped with the addition of 0.4M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified by spectrofluorometry (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at excitation wavelength 365 nm and emission wavelength 465 or 430 nm for caspase-3 and -8 activities, respectively.

Western blotting: Akt, Erk, NF-κB and GPR32

Western blot analysis was performed as described elsewhere [15]. Briefly, tissues were homogenized by sonication in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 mol/l sucrose, 10mmol/l Tris (pH 8.0), 5 mmol/l EDTA, 2 mmol/l DTT, 1 mmol/l PMSF, 10 mg/ml Leupeptin, 10 mg/ml Pepstatin A, 10 mg/ml Aprotinin). The tissue homogenates were incubated for 30 min at 4°C and centrifuged at 10,000g for 15 min. Protein concentrations of the supernatant were

quantified by the Lowry method. Aliquots of 100 µg protein were loaded in polyacrylamide gels (10%-15%) and migrated at 150 V for 75 min in a mini-gel apparatus (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes with a Trans-Blot semi-dry transfer cell (BioRad Laboratories). Using SNAP i.d. 2.0 system (Millipore, Etobicoke, Ontario, Canada), non specific sites were blocked for 20 minutes incubation in Odyssey blocking buffer (Li-CoR, Lincoln, Nebraska, USA) (1:1 with PBS). After PBS washing, membranes were incubated 10 minutes with primary antibody 1:1000 (phospho-Akt (S473) (Rabbit Ab Cell signaling, Whitby, Ontario, Canada), phospho-Akt (T308) (P-AKT (T308) (Rabbit Ab Cell signaling), total Akt (rabbit Ab Cell signaling), NF-κB (Nf-kappaB (rabbit Ab Cell signaling) phospho NF-κB (P-NF-kappaB p65 (Rabbit Ab Cell signaling), total p44/42 MAPK Erk1/2 (rabbit Ab Cell signaling), phospho-Erk1/2 (P-p44/42 MAPK T202/Y204 (Rabbit Ab, Cell signaling), GPR32 (E-12 goat polyclonal Ab Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) and actin (anti-actin rabbit Ab sigma, Saint-Louis, Missouri, USA). After washing, the membranes were incubated 10 minutes with secondary antibody 1: 15 000 (anti-rabbit and anti-goat IRDye 800CW Li-Cor). After washing, membranes were scanned with Odyssey LI-COR Clx and band intensities were analyzed with image studio. Same membranes were placed in stripping buffer (0.1 mol/l glycine, 1% SDS, pH 2.0, 1 h at room temperature) and reused with the same technique for ratio determination phosphoAkt/total Akt, phosphoNF-κB/total NF-κB, phospho-Erk/total Erk or GPR32/actin.

Myeloperoxidase assay: neutrophil accumulation

Neutrophil accumulation in the myocardium was estimated by myeloperoxidase assay as described by Krawisz et al. [16]. Cardiac tissues were first weighed, added to

hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer (0.5% HTAB + 50 mM potassium phosphate, pH 6.0) and pulverized by sonication. The lysates were subjected to 3 freeze/thaw cycles and centrifuged at 10,000g for 15 min. To quantify myeloperoxidase activity, 0.1 ml of supernatant was added to 2.9 ml of 50 mM sodium phosphate (pH 6.0) with 0.167 mg/ml of o-dianisidine hydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide. Absorbance of the orange product was then measured by spectrophotometer every 10 s at 460 nm for 2 min. Difference was generated between the maximum and minimum divided by 2 to estimate neutrophil accumulation.

Statistical analysis

The data are reported as means (\pm SEM). Statistical analyses were performed by SPSS 19. Weight, infarct size and biochemical data were compared by analysis of variance (ANOVA), followed by *post hoc* comparisons (Dunnett) when significant. If variances were heterogenous, Brown-Forsythe correction was followed by Games-Howell comparisons when applicable. Mixed ANOVA was used to analyze the hemodynamic data (intergroup analysis: group; intragroup comparison: time). When difference in the main factor was observed, further analyses using post hoc comparisons were performed. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Protocol 1

Weight and hemodynamic data

Body weights were similar between groups (table 1). Hemodynamic data analysis indicates that heart rate, mean arterial pressure and PRP are similar among groups throughout the experiment. However, intragroup comparisons indicate a significant difference in the mean arterial pressure ($F(1.8, 29.4)=15.804$; $p < 0.05$) and the PRP ($F(1.9, 30.1)=10.2$; $p < 0.05$) during the experiment. *Post hoc* analyses indicate that MAP and PRP are reduced during the ischemia and the reperfusion as compared to the baseline ($p < 0.05$, table 1).

Infarct size

Myocardial infarct size (I), expressed as percentage of the AR, disclosed significant between group differences ($F(3,26)=13.55$; $p<0.05$). *Post hoc* analysis revealed significant differences between groups receiving 0.1 or 0.3 μg RvD1 compared to the control (vehicle) group. No difference was evident between the 0.01 μg and control groups. The AR, expressed as percentage of the LV, was similar between groups and represented around 70% of the LV (Figure 1).

Caspase-3 and -8 activities

Caspase-3 activity in ischemic endocardial regions presented significant differences between groups ($F(3,25)=5.89$; $p<0.05$). Further analysis indicated significant reduction of caspase-3 activity in the 0.1 μg and 0.3 μg RvD1 groups versus the vehicle control group (Figure 2 left).

Similarly, caspase-8 activity in the ischemic endocardial region denoted significant between groups differences ($F(3,8.36)=7.76$; $p<0.05$). *Post hoc* analysis suggested that caspase-8 activity in the 0.1 μ g and 0.3 μ g groups was significantly reduced in comparison to the vehicle control group ($p<0.05$); (Figure 2 right). No significant difference was evident between the vehicle and 0.01 μ g RvD1 groups for either caspase-3 or -8.

Inflammation assessed by NF- κ B activity and neutrophil accumulation

NF- κ B activity, quantified by Western blotting, indicated significant differences between groups ($F(3,14)=7.89$; $p<0.05$). *Post hoc* analysis suggested that phosphorylation of NF- κ B was significantly reduced in the presence of RvD1, independently of dose level tested, compared to the vehicle control group ($p<0.05$; Figure 3a). Similarly, neutrophil accumulation in the endocardial region, estimated by myeloperoxidase activity was significantly different ($F(3,14)=21.44$; $p<0.05$) between groups. Further analysis showed significantly less neutrophil accumulation with RvD1, compared to vehicle, independently of dose level (figure 4 Left).

Receptor activated by RvD1

GPR32

GPR32 expression, quantified by Western blotting, was different between groups ($F(3,13)=3.42$ $p<0.05$, figure 3 Right). Further analysis disclosed that groups receiving 0.3 μ g had a reduced GPR32 expression than the vehicle. GPR32 expression was similar in 0.01 and 0.1 μ g of RvD1 compared to the vehicle group.

Cardio-protection pathway activated by RvD1

Akt activation

Akt activity, quantified by Western blotting, was different between groups: pakt(T308)/akt (F(3,16)=4.35 p<0.05, figure 3b) and pakt(S473)/akt (F(3,14)=7.35; p<0.05, figure 3c). Further analysis disclosed that groups receiving 0.1 µg or 0.3 µg RvD1 had higher Akt phosphorylation on both serine and threonine than the vehicle controls. Akt activity was similar in the vehicle and 0.01 µg RvD1 groups.

Erk1/2 activation

Erk activation, quantified by the phosphorylation of the Erk1/2, was different between groups: p42 subunit (F(3,16)=4.51 p<0.05, figure 3e) and p44 subunit (F(3,16)=6.53 p<0.05, figure 3d). Further analysis disclosed that groups receiving 0.3 µg had higher Erk1/2 phosphorylation than the vehicle control group. Erk1/2 activity was similar in 0.01 and 0.1 µg of RvD1 compared to the vehicle group.

Protocol 2

To establish if the PI3K/Akt pathway is involved in cardio-protection by RvD1, we tested LY-294002, a PI3K inhibitor, in our model. ANOVA pointed to significant differences between groups (F(3,20)=18.033; p<0.05). In the presence of LY-294002 alone, no significant difference was seen in infarct size in comparison to the vehicle control group. However, as we have reported previously, infarct size was significantly reduced by 0.1 µg RvD1, but this protection was rescinded by LY-294002, indicating that the cardio-protection afforded by RvD1 was abolished by PI3K/Akt pathway inhibition (Figure 5).

Discussion

The data obtained in the present study imply that a single RvD1 dose (0.1 μg), given before the ischemic period, is cardio-protective without any effect on hemodynamic parameters. This beneficial effect is abrogated by LY-294002, suggesting that the protective mechanism of RvD1 is related to activation of the PI3K/Akt signalling pathway. A higher RvD1 dose (0.3 μg) was still protective, whereas 0.01 μg RvD1, under the same conditions, was not.

We have previously observed that high omega-3 PUFA concentrations reduces infarct size [14]. Other studies have also reported a beneficial effect of high omega-3 PUFA content on infarct size [17, 18]. However, it is difficult to determine in these studies if the beneficial outcome is related to DHA or EPA, since both omega-3 PUFAs were present in the diet.

Recently, it was found, in an isolated heart model, that DHA perfusion results in smaller infarcts via a mechanism that could involve the antioxidant properties of DHA [19]. Other investigations also reported that DHA suppressed arrhythmia induced by ischemia, inhibited thromboxane-like vasoconstrictor responses, and curtailed hypertension in spontaneously hypertensive rats [20], but the mechanism remains speculative. Some groups report that DHA and EPA can be beneficial for the mitochondria by enhancing the resistance to mitochondrial permeability transition [21]. However, to detect a significant effect of DHA or EPA at the cardiac level, the diet should be used for weeks, that is not the case in the present study. The present study suggests a new potential mechanism by which DHA is beneficial to cardiac tissues. RvD1 is a DHA metabolite under the control of enzymes, such as COX-2, that are implicated in inflammation [5]. This is particularly interesting since COX-2 is expressed during stressful conditions, such as MI [22], and in addition to be cardioprotective [23], may

contribute to RvD1 synthesis. However, we ignored the DHA level needed in the diet to obtain RvD1 concentrations similar to what we have tested in our study.

Other omega-3 PUFA pro-resolution metabolites have a similar cardio-protective effect [13]. RvE1, an EPA metabolite, decreases infarct size when it is delivered intravenously at a dose level of 0.1 mg/kg, which is much higher than the one tested in the present study. We believe that the difference in dosage between RvE1 and in our study may not be related to efficacy of the metabolite itself but rather to the way it is administered. In the present experiments, we dispensed a left ventricle chamber injection, in contrast to intravenous injection of RvE1. Direct contact between RvD1 and cardiac tissues would require lower concentrations to achieve cardio-protection.

Our data indicate that RvD1 induces cardio-protection via the PI3K/Akt pathway. In the presence of RvD1, we observed increased Akt activation, assessed by its phosphorylation. We saw that cardio-protection was abrogated by LY-294002, an inhibitor of this pathway. Similar data have been obtained with RvE1 [13]. PI3K/Akt is a key enzyme of the RISK signalling pathway that is well-known to provide cardio-protection when activated, as reported with different pharmaceutical products [24-27]. Erk activity is also increased with RvD1 but only at the higher dose of 0.3 µg, suggesting that activation of Erk is not sufficient to induce cardioprotection in our model.

We have also investigated other mechanisms that could be modulated by RvD1 and that have been established as being beneficial to the ischemic myocardium. For instance, it has been claimed that RvD1 has anti-inflammatory properties and resolves inflammation. Animals treated with RvD1 present lowered leukocyte accumulation in ischemic regions. These results are similar to those reported with RvE1 [13]. Such observations are interesting since many

studies indicate that inhibited neutrophil accumulation leads to smaller infarct size [28, 29]. Up to now, 2 receptors (ALX and GPR32) have been found to interact with RvD1 [30]. GPR32, a GPCR that may activate pro-survival kinases, such as Akt and Erk, has been located on the surface of neutrophils, suggesting that RvD1's action on neutrophils is exerted through these receptors. Interestingly we observed that GPR32 is reduced in the RvD1 0.3 μ g group as compared to the vehicle group. Other RvD1 groups have also a reduction of GPR32 but this is not significant. These results can be explained by the reduction of neutrophils in the ischemic region or by the fact that the sustained stimulation of the receptor with RvD1 can induce a down-regulation of the receptor as observed for the other GPCR [31]. However since neutrophil accumulation is reduced in many treated groups, we believe that the second hypothesis is more reliable but would need more studies to be confirmed.

We have seen that RvD1 attenuates NF- κ B activation in ischemic regions. This finding is in agreement with a model of lung injury in which RvD1 reduces inflammation and NF- κ B via a mechanism involving peroxisome proliferator-activated receptor-gamma[32]. Several authors have reported that NF- κ B inhibition confers cardio-protection [33-35], whereas others suggest that its activation is necessary for cardio-protection [36]. Although we observed NF- κ B inhibition and reduction of leukocyte accumulation in ischemic regions, we believe that these effects are not sufficient to induce cardio-protection, since similar results were obtained in the 0.01 μ g group in which RvD1 had no significant influence on infarct size. Our findings suggest that its anti-inflammatory and cardio-protective properties are 2 different entities. The former is related to NF- κ B pathway whereas the second may involve the PI-3kinase pathway. We also observed, in our experiments, that the presence of RvD1, at a dosage high enough to induce cardio-protection, also attenuated caspase-3 and -8 activation. Although, to our

knowledge, there are no data in the literature on the effect of RvD1 on myocardial apoptosis, some have reported that RvD1 attenuates apoptosis in different models [37, 38]. One possible mechanism that could explain the impact of RvD1 on caspase activation could be through the activation of death receptors, such as TNF- α , RvD1 reduces TNF- α level and action [32, 39] and may thus contribute to diminution of caspase-8 activation and, ultimately, caspase-3. Further studies are needed to confirm these mechanisms.

Limitations

A limitation of this protocol is related to the timing used for the injection of the RvD1. It is clear that a pre-ischemic injection of RvD1 cannot be reached in a clinical setting. However, since RvD1 is derived from DHA, an omega-3 PUFA found in our alimentation, it is thus possible to have a protective concentration of RvD1 before occlusion but further studies are needed to conclusively establish it. The second limitation concerns the identification of the site of action of the RvD1. Although G-protein coupled receptors interacting with RvD1 have been identified, we ignore if the localisation of the receptors. Unfortunately the experiments were not designed to answer this question.

Conclusion

The present study reveals that RvD1, a metabolite of the omega-3 fatty acid DHA, protects the myocardium from ischemia via a mechanism involving the PI3K/Akt signalling pathway.

Conflict of interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Table

Table I. Weights and hemodynamic parameters in protocol 1

	Vehicle	RvD1 0.01	RvD1 0.1	RvD1 0.3	
Weight (g)	384±7	372±5	373±9	376±10	
Hemodynamic data					
Baseline					
HR	260±8	263±8	241±2	252±10	
Pressure	101±7	78±6	84±9	93±5	
PRP	261±24	207±21	204±24	233±13	
20 min Ischemia					
HR	260±8	248±8	240±5	250±8	
Pressure	70±5	72±4	70±4	75±3	*
PRP	182±13	178±13	169±12	187±9	*
Reperfusion					
HR	260±12	269±14	255±7	255±9	
Pressure	76±5	68±2	70±3	69±3	*
PRP	197±20	182±7	178±6	177±14	*
10 min reperfusion					
HR	259±12	279±16	254±6	262±8	
Pressure	70±2	68±3	68±2	74±6	*
PRP	181±10	189±9	171±1	195±19	*

HR: Heart rate (beats/min); Pressure: Mean arterial pressure (mm Hg)

PRP : $HR * Pressure / 100$; RvD1= Resolvin D1 * $p < 0.05$ vs

baseline.

Figures

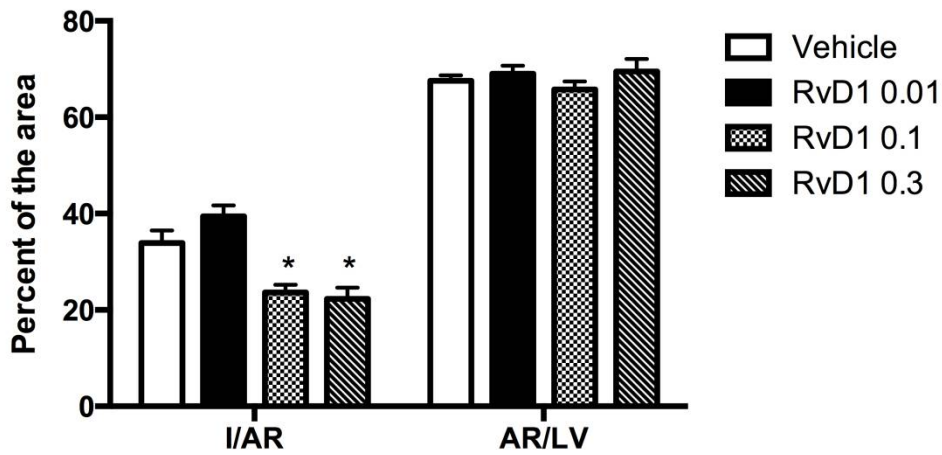


Figure 1. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion.

Values are means \pm SEM (7-8 rats per group). RvD1=Resolvin D1.

*indicates significant difference between the experimental group and the vehicle group; $p < 0.05$.

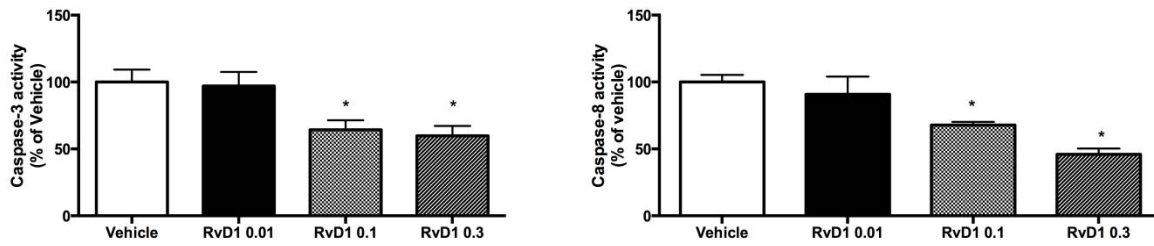


Figure 2 Left. Caspase-3 activity expressed in the heart as the percentage of the mean activity observed in the vehicle group and at 100%, was assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (7-8 rats per group). **Right** Caspase-8, expressed in the heart as percentages of mean activity observed in the vehicle group and set at 100%, was assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (8 rats per group). RvD1=Resolvin D1. *indicates significant difference between the experimental group and the vehicle group; $p < 0.05$.

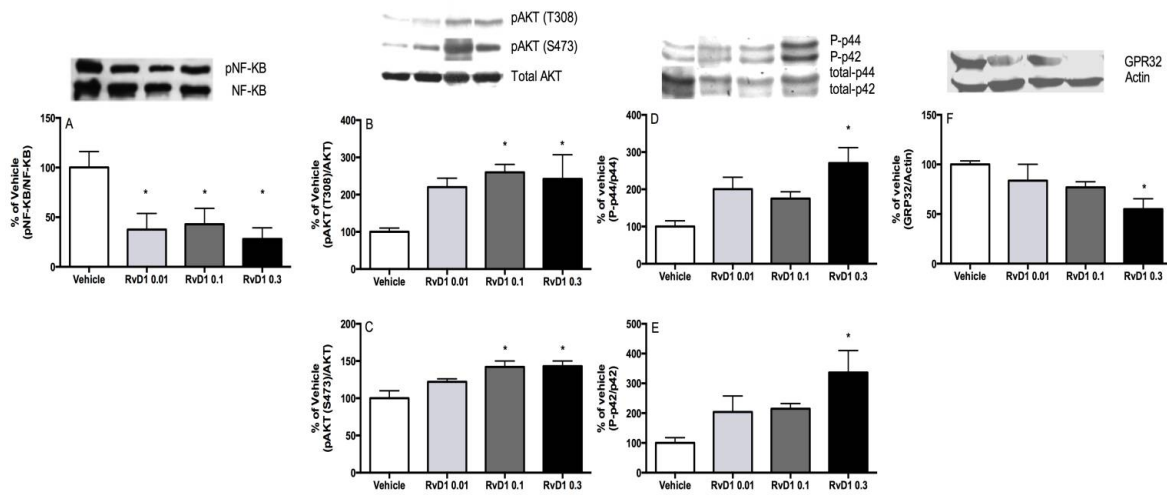


Figure 3 (A) pNF-κB/NF-κB ratio, (B) pAKT (T308)/AKT ratio, (C) pAKT (S473)/AKT ratio, (D) P-p42/p42 ratio, (E) P-p44/p44, and (F) GPR32/actin ratio expressed in the heart as percentage of the vehicle group mean set at 100% and assessed by Western blotting *in vitro* after 30-min reperfusion (4-7 rats per group). Upper panels are representative Western blots. RvD1=Resolvin D1. *indicates significant differences between the experimental and vehicle groups: $p < 0.05$.

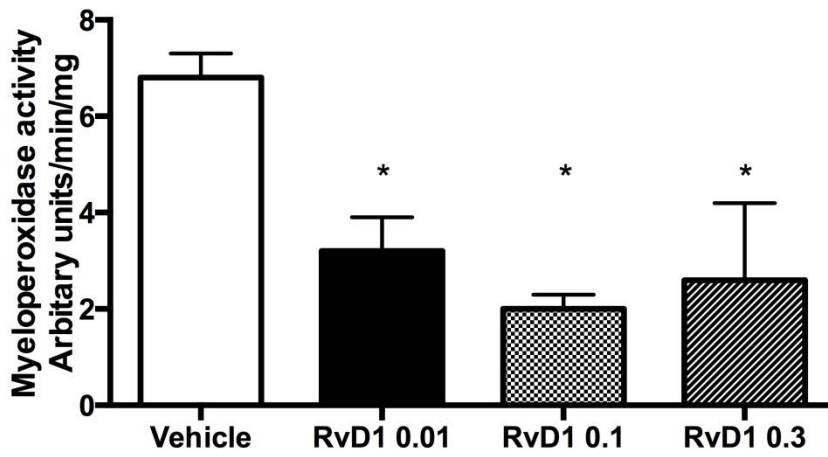


Figure 4. Neutrophil accumulation in the ischemic myocardium evaluated by myeloperoxidase activity (3-6 rats per group). RvD1=Resolvin D1. *indicates significant differences between 0.01, 0.1 and 0.3 μg RvD1 versus the vehicle group: $p < 0.05$.

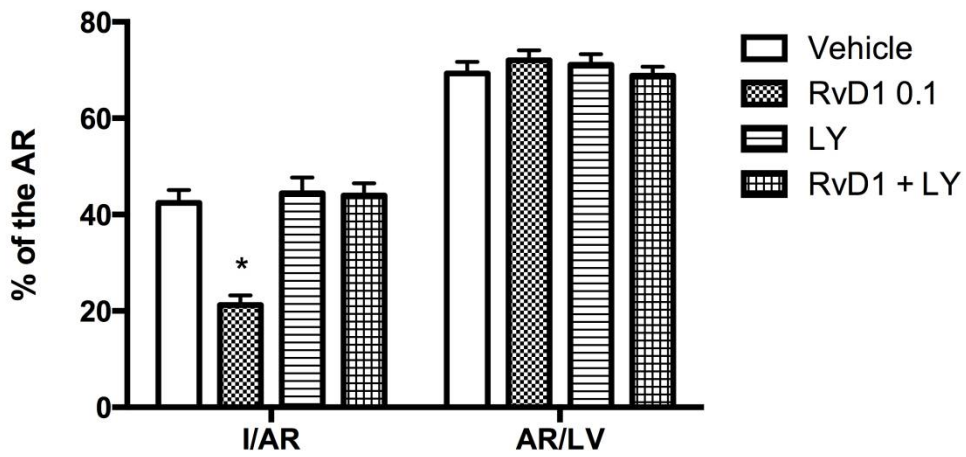


Figure 5. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion (6 rats per group). RvD1=Resolvin D1.* indicates significant difference between 0.1 μ g RvD1 versus the other groups $p < 0.05$.

References

1. Blancke F, Claeys MJ, Jorens P, Vermeiren G, Bosmans J, Wuyts FL, Vrints CJ. Systemic inflammation and reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction. *Mediators of inflammation*. 2005 Dec 14;2005(6):385-9.
2. Steffens S, Montecucco F, Mach F. The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury. *Thrombosis and haemostasis*. 2009 Aug;102(2):240-7.
3. Maskrey BH, Megson IL, Whitfield PD, Rossi AG. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011 May;31(5):1001-6.
4. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*. 2005 Dec;6(12):1191-7.
5. Serhan C, Hong S, Gronert K, Colgan S, Devchand P, Mirick G, Moussignac R. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(8):1025 - 37.
6. Serhan CN, Arita M, Hong S, Gotlinger K. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids*. 2004 Nov;39(11):1125-32.
7. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2004 Apr;73(3-4):155-72.
8. Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Van Dyke TE, Serhan CN. Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 2010 Jan 29;285(5):3451-61.
9. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007 Mar 15;178(6):3912-7.
10. Spite M, Serhan CN. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circulation research*. 2010 Nov 12;107(10):1170-84.
11. Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British journal of pharmacology*. 2008 Mar;153 Suppl 1:S200-15.
12. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Apr 25;278(17):14677-87.
13. Keyes KT, Ye Y, Lin Y, Zhang C, Perez-Polo JR, Gjorstrup P, Birnbaum Y. Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010 Jul;299(1):H153-64.
14. Rondeau I, Picard S, Bah TM, Roy L, Godbout R, Rousseau G. Effects of different dietary omega-6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2011 Mar;89(3):169-76.

15. Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, Cardinal R, Godbout R, Rousseau G. Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction. *Apoptosis*. 2006 Jul;11(7):1067-74.
16. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984 Dec;87(6):1344-50.
17. Abdukeyum GG, Owen AJ, McLennan PL. Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning. *The Journal of nutrition*. 2008 Oct;138(10):1902-9.
18. Zhu BQ, Sievers RE, Sun YP, Morse-Fisher N, Parmley WW, Wolfe CL. Is the reduction of myocardial infarct size by dietary fish oil the result of altered platelet function? *American heart journal*. 1994 Apr;127(4 Pt 1):744-55.
19. Richard D, Oszust F, Guillaume C, Millart H, Laurent-Maquin D, Brou C, Bausero P, Visioli F. Infusion of docosahexaenoic acid protects against myocardial infarction. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2014.
20. McLennan P, Howe P, Abeywardena M, Muggli R, Raederstorff D, Mano M, Rayner T, Head R. The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid. *European journal of pharmacology*. 1996 Apr 4;300(1-2):83-9.
21. Galvao TF, Khairallah RJ, Dabkowski ER, Brown BH, Hecker PA, O'Connell KA, O'Shea KM, Sabbah HN, Rastogi S, Daneault C, Des Rosiers C, Stanley WC. Marine n3 polyunsaturated fatty acids enhance resistance to mitochondrial permeability transition in heart failure but do not improve survival. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013 Jan 1;304(1):H12-21.
22. Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Aug 29;97(18):10197-202.
23. Guo Y, Tukaye DN, Wu WJ, Zhu X, Book M, Tan W, Jones SP, Rokosh G, Narumiya S, Li Q, Bolli R. The COX-2/PGI2 receptor axis plays an obligatory role in mediating the cardioprotection conferred by the late phase of ischemic preconditioning. *PloS one*. 2012;7(7):e41178.
24. Bhamra GS, Hausenloy DJ, Davidson SM, Carr RD, Paiva M, Wynne AM, Mocanu MM, Yellon DM. Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic research in cardiology*. 2008 May;103(3):274-84.
25. Boucher M, Pesant S, Falcao S, de Montigny C, Schampaert E, Cardinal R, Rousseau G. Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2004 Mar;43(3):416-22.
26. Kobayashi H, Miura T, Ishida H, Miki T, Tanno M, Yano T, Sato T, Hotta H, Shimamoto K. Limitation of infarct size by erythropoietin is associated with translocation of Akt to the mitochondria after reperfusion. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2008 Jul;35(7):812-9.
27. Zhang XJ, Xiong ZB, Tang AL, Ma H, Ma YD, Wu JG, Dong YG. Rosiglitazone-induced myocardial protection against ischaemia-reperfusion injury is mediated via a

phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2010 Feb;37(2):156-61.

28. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*. 1983 May;67(5):1016-23.

29. de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallee M, Clement R, Millette D, Rousseau G, Latour JG. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *American heart journal*. 1989 Mar;117(3):523-32.

30. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, Petasis NA, Serhan CN. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Jan 26;107(4):1660-5.

31. Klaasse EC, Ijzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW. Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signal*. 2008 Mar;4(1):21-37.

32. Liao Z, Dong J, Wu W, Yang T, Wang T, Guo L, Chen L, Xu D, Wen F. Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPARgamma/NF-kappaB pathway. *Respiratory research*. 2012;13:110.

33. Higuchi Y, Chan TO, Brown MA, Zhang J, DeGeorge BR, Jr., Funakoshi H, Gibson G, McTiernan CF, Kubota T, Jones WK, Feldman AM. Cardioprotection afforded by NF-kappaB ablation is associated with activation of Akt in mice overexpressing TNF-alpha. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006 Feb;290(2):H590-8.

34. Malik S, Sharma AK, Bharti S, Nepal S, Bhatia J, Nag TC, Narang R, Arya DS. In vivo cardioprotection by pitavastatin from ischemic-reperfusion injury through suppression of IKK/NF-kappaB and upregulation of pAkt-e-NOS. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2011 Aug;58(2):199-206.

35. Zhang XQ, Tang R, Li L, Szucsik A, Javan H, Saegusa N, Spitzer KW, Selzman CH. Cardiomyocyte-specific p65 NF-kappaB deletion protects the injured heart by preservation of calcium handling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013 Oct 1;305(7):H1089-97.

36. Tranter M, Ren X, Forde T, Wilhide ME, Chen J, Sartor MA, Medvedovic M, Jones WK. NF-kappaB driven cardioprotective gene programs; Hsp70.3 and cardioprotection after late ischemic preconditioning. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010 Oct;49(4):664-72.

37. Lee HN, Surh YJ. Resolvin D1-mediated NOX2 inactivation rescues macrophages undertaking efferocytosis from oxidative stress-induced apoptosis. *Biochemical pharmacology*. 2013 Sep 15;86(6):759-69.

38. Xie W, Wang H, Wang L, Yao C, Yuan R, Wu Q. Resolvin D1 reduces deterioration of tight junction proteins by upregulating HO-1 in LPS-induced mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2013 Sep;93(9):991-1000.

39. Odusanwo O, Chinthamani S, McCall A, Duffey ME, Baker OJ. Resolvin D1 prevents TNF-alpha-mediated disruption of salivary epithelial formation. *American journal of physiology Cell physiology*. 2012 Jan 11.

Chapitre 7. Deuxième article: Linoleic acid attenuates cardio-protection induced by resolvin D1

7.1 Publication

L'article est en révision pour le Journal of Nutritional Biochemistry. Il est accepté avec corrections mineures.

Linoleic acid attenuates cardio-protection induced by resolvin D1

Kim Gilbert, Mandy Malick, Ness Madingou, Valérie Bourque-Riel, Charles Touchette, Guy
Rousseau

Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest,
Montréal, Québec, Canada H4J 1C5 and Département de pharmacologie, Université de
Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Address for correspondence and reprints:

Guy Rousseau, Ph.D.

Centre de biomédecine

Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

5400 boul. Gouin Ouest

Montréal (Québec) Canada H4J 1C5

Total words: 4,477

Abstract

We previously observed that resolvin D1 (RvD1), a metabolite of the omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) docosahexaenoic acid, reduces infarct size by a mechanism involving the PI3-K/Akt pathway. In parallel, the beneficial effect of a high omega-3 PUFA diet on infarct size can be attenuated by increased omega-6 PUFA consumption. The present study was designed to determine if augmented linoleic acid (LA), an omega-6 PUFA administered at the same time, attenuates the cardio-protective action of RvD1.

Male Sprague-Dawley rats received 0.1 µg RvD1 alone or with 1 of 3 LA doses (1, 5 or 10 µg) directly into the left ventricle chamber 5 min before ischemia. The animals underwent 40 min of ischemia by occlusion of the left descending coronary artery followed by 30 min or 24 h of reperfusion. Infarct size and neutrophil accumulation were evaluated after 24 h of reperfusion while caspase-3, -8, -9 and Akt activities were assessed at 30 min of reperfusion.

LA attenuated cardio-protection afforded by RvD1, resulting in significantly increased infarct size. Neutrophil accumulation and Akt activity were similar between groups. Caspase activities, especially caspase-9, which could be activated by ischemia, were stimulated in the presence of LA, suggesting that this omega-6 PUFA accentuates ischemia intensity.

The present results indicate that LA significantly attenuates the beneficial effect of RvD1 on infarct size. Therefore, reduction of omega-6 intake should be considered to maintain the protection afforded by RvD1.

Keywords: Myocardial infarction; omega-3; resolvin D1; omega-6; linoleic acid

1. Introduction

Resolvins (Rv) are metabolites derived from long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). They could limit myocardial damage when given at the time of infarction [1-3] and even during the reperfusion period [2, 4]. Series E Rv (RvE) are derived from the omega-3 PUFA eicosapentaenoic acid (EPA), whereas Series D Rv (RvD) come from the omega-3 PUFA docosahexaenoic acid (DHA) [5, 6], and both interact with G protein-coupled receptors [7-10]. It has recently been suggested that these metabolites induce cardio-protection by activating signalling pathways, such as PI3-K/Akt, and by limiting inflammation [1-3, 11].

The diet in industrialized countries is poor in omega-3 PUFA, whereas consumption of omega-6 PUFA is disproportionally large. The actual ratio of omega-6/-3 in these countries is 15-20:1 [12, 13]. Omega-6 and omega-3 PUFA are both metabolized by cyclooxygenase and lipoxygenase, which results in competition of the 2 substrates for these enzymes [14]. Large amounts of omega-6 PUFA promote inflammatory responses compared to omega-3 PUFA [15], with undesirable effects during myocardial infarction (MI). For instance, augmentation of the omega-6/-3 PUFA ratio in the diet, results in larger infarct size, as observed in our experimental model [16]. Competition between omega-3 and omega-6 PUFA is thus important in determining the final outcome.

With that in mind, it is important to determine if the cardio-protection afforded by Rv can be attenuated by omega-6 PUFA. Linoleic acid (LA), an omega-6 PUFA found in most vegetable oils [17], can induce vasoconstriction in coronary arteries [18] and can be converted to arachidonic acid (AA), the precursor of many inflammatory molecules, such as prostaglandins and leukotrienes [14].

The objective of the present study is to demonstrate if LA can inhibit the cardio-protective effect of RvD1, a omega-3 PUFA metabolite.

2. Methods

A total of 74 male 3-month-old Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada), weighing 325-350 g at the start of the experiments, were handled in compliance with regulations of the local Animal Care Committee and *Guidelines of the Canadian Council on Animal Care*. They were housed individually under constant conditions (21-22°C temperature and 40-50% humidity), including a 12-h dark-light cycle beginning at 08:00 am. Chow pellets and tap water were available *ad libitum* throughout the study. The rats were randomly assigned to 1 of 4 groups after an acclimatization period of 3 days-post delivery by the supplier: 0.1 µg RvD1 with vehicle (0.9% NaCl) or 0.1 µg RvD1 combined with 1 of 3 LA doses: 1.0, 5.0 or 10 µg, delivered directly into the left ventricle (LV) cavity 5 min before ischemia. RvD1 and LA were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA) and dissolved in 0.5 ml NaCl 0.9%. The animals were sacrificed after 24 h of reperfusion (n=8-9/group) to measure infarct size and neutrophil activity. Two rats died in the first min of reperfusion and were excluded from the study (1 in the 1.0 µg LA + RvD1 group and the other in the 5.0 µg LA + RvD1 group). A subgroup of rats was sacrificed 30 min after the onset of reperfusion (n=9/group) for biochemical analysis (caspase-3, -8, -9 and Akt activities) and hemodynamic data.

2.1 Surgical procedure

Anesthesia was induced by intraperitoneal ketamine/xylazine injection (60 and 10 mg/kg, respectively). Subsequently, the rats were intubated and anesthesia was maintained under isoflurane (1-2%) ventilation. Electrocardiograms and heart rate (HR) were monitored throughout the procedure. Left thoracotomy at the 5th intercostal space enabled occlusion of

the left anterior descending coronary artery with 4-0 silk suture (Syneture; Covidien, Mansfield, MA, USA) and plastic snare, with confirmation by ST segment alterations and the presence of *ventricular sub-epicardial cyanosis*. The suture was removed after 40 min of ischemia, permitting myocardial tissue reperfusion. The rats were sacrificed after 30-min or 24-h reperfusion. In animals submitted to 24-h reperfusion, the thorax was closed with 2-0, 3-0 and 4-0 silk sutures (Syneture; Covidien) and the animals were injected subcutaneously with 15,000 IU penicillin G (Duplocillin LA; Intervet Canada Ltd., Whitby, ON, Canada) for antibiotic prophylaxis and 2 mg/kg buprenorphine for analgesia before being returned to their respective cages.

2.2 Hemodynamic data

HR and mean arterial pressure (MAP) were measured by the tail cuff technique (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) before occlusion and at 10 min of ischemia.

2.3 Measurement of infarct size

After the reperfusion period, the rats were restrained in a cone bag and rapidly decapitated. In animals with 24-h reperfusion, their hearts were immediately removed, placed in a dish kept on crushed ice and washed with saline by retrograde perfusion into the aorta. The left anterior descending coronary artery was occluded at the same site as for MI induction (see above) to map the area at risk (AR) by Evans blue infusion (0.5%). The hearts were frozen (-80°C for 5 min), sliced into 4 transverse 2-mm sections and placed in 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (1%, pH 7.4) at 37°C for 10 min to better distinguish necrosis, the infarct size (I), from the AR. The different regions were carefully drawn on a glass plate, photocopied and cut. Thereafter, the complete infarct region, AR and LV were weighed separately to express MI as percentage of I of the AR ((I/AR) x 100)), and AR as percentage of the LV area ((AR/LV) x

100). In animals with 30-min reperfusion, the ischemic region was divided into endocardial and epicardial areas. Samples were kept at -80°C until needed for biochemical analysis.

2.4 Biochemical analysis

2.4.1 Caspase-3, -8 and -9 activities

Caspase-3, -8 and -9 activities were measured according to a previously-described protocol [19]. Tissues were homogenized by sonication in lysis buffer and incubated for 30 min on ice. The tissue homogenates were centrifuged at 4°C for 10 min. Enzymatic reactions were undertaken in reaction buffer with 25 μg of protein (40 μM) (attested by the Bradford method) and fluorescent substrate (Ac-DEVD-AMC for caspase-3, Ac-IETD-AMC for caspase-8, and Ac-LEHD-AMC for caspase-9). Reactions were studied after incubation in the dark for 3 h at 37°C and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified by spectrofluorometry (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at excitation wavelengths of 365 nm for caspase-3 and -8 and 315 nm for caspase-9 and at emission wavelengths of 465, 430 and 435 nm for caspase-3, -8 and -9 activities, respectively.

2.4.2 Western blotting of Akt

Tissues were homogenized by sonication in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 mol/L sucrose, 10 mmol/L Tris (pH 8.0), 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10 mg/mL leupeptin and 10 mg/mL Pepstatin A, 10 mg/mL aprotinin). The tissue homogenates were incubated for 30 min at 4°C and centrifuged at 10,000g for 15 min. Protein concentrations of the supernatant were quantified by the Lowry method. Aliquots of 100 μg protein were loaded in polyacrylamide gels (10-15%) and migrated at 150 V for 75 min in a mini-gel apparatus (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred to

nitrocellulose membranes with a Trans-Blot semi-dry transfer cell (BioRad Laboratories). Incubation of the membranes was performed on a SNAP i.d. 2.0 system (Millipore, Etobicoke, ON, Canada). Non-specific sites were blocked for 20-min incubation in Odyssey blocking buffer (Li-CoR, Lincoln, NB, USA) (diluted 1:1 with phosphate buffered saline (PBS)). After PBS washing, membranes were incubated for 10 min with primary antibody 1:1,000 phospho-Akt (S473) (Rabbit Ab Cell Signaling, Whitby, ON, Canada), phospho-Akt (T308) (Rabbit Ab Cell Signaling) and total Akt (Rabbit Ab Cell Signaling). After washing, the membranes were incubated for 10 min with secondary antibody 1:15,000 (anti-rabbit IRDye 800CW, Li-Cor). After washing, they were scanned with Odyssey Li-Cor Clx, and band intensities were analyzed with image studio (Li-CoR, Version 3.1). The same membranes were placed in stripping buffer (0.1 mol/L glycine and 1% SDS, pH 2.0, for 1 h at room temperature) and reused with the same technique for phospho-Akt/total Akt ratio determination.

2.4.3 Myeloperoxidase activity assay: neutrophil activity

Myeloperoxidase was assayed to assess neutrophil activity in the heart, as described previously by Krawisz et al. [20]. Cardiac tissues were first weighed and added in hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer (0.5% HTAB and 50 mM potassium phosphate, pH 6.0), then pulverized by sonication. The lysates went through 3 freeze/thaw cycles and were centrifuged at 10,000g for 15 min. To measure activity, 0.1 ml of supernatant was added to 2.9 ml of 50 mM sodium phosphate, pH 6.0, with 0.167 mg/ml of o-dianisidine dihydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide. Absorbance of the orange product was then measured every 10 s at 460 nm with a spectrophotometer for 2 min. The difference between maximum and minimum divided by 2 was generated to quantify neutrophil activity.

2.5 Statistical analysis

The data are reported as means (\pm standard error of the means). Statistical analyses were performed with SPSS 19(Armonk, New York, USA). Groups were compared by analysis of variance (ANOVA), followed by *post hoc* comparisons (Bonferroni) when significant. If variances were heterogeneous, Brown-Forsythe correction was followed by Games-Howell comparisons when applicable. $p < 0.05$ values were considered to be significant.

3. Results

3.1 Body weight and hemodynamic data

Body weights were similar between groups (Table 1). Hemodynamic data analysis indicated that HR, MAP and the pressure rate product PRP were similar among groups. However, intra-group comparisons showed significant reduction of MAP ($F(1,18)=55.072$; $p<0.05$) and PRP ($F(1,18)=38.092$; $p<0.05$) during occlusion compared to baseline.

3.2 Infarct size

Myocardial infarct size (I), expressed as a percentage of the AR, was different between groups ($F(3,23.2)=19.724$; $p<0.05$). *Post hoc* analyses revealed that LA resulted in larger infarct size compared to RvD1 alone ($p<0.05$). We also observed significant difference between outcomes of 1 and 10 μg LA ($p<0.05$), with higher LA doses leading to larger infarct size. The AR, expressed as percentage of the LV, was similar among groups: around 70% (Figure 1).

3.3 Caspase-3, -8 and -9 activities

Caspase-3 activity in ischemic regions indicated significant differences in endocardial ($F(3,14.2)=7.774$; $p<0.05$) and epicardial regions ($F(3,29)=14.408$; $p<0.05$) between groups. In the endocardial area, further analysis showed elevated caspase-3 activity in the RvD1 + 5 and 10 μg LA groups vs RvD1 ($p<0.05$). In the epicardial area, significant difference was evident between the RvD1 + 5 and 10 μg LA groups vs RvD1. There was also significant difference between RvD1 + 10 μg LA vs RvD1 + 1 and 5 μg LA ($p<0.05$) (Figure 2).

Caspase-8 activity in the ischemic regions presented significant differences in the endocardial ($F(3,17.664)=16.534$; $p<0.05$) and epicardial regions ($F(3,16.839)=10.815$; $p<0.05$) between groups. *Post hoc* analysis revealed that endocardial area caspase-8 activity in the RvD1 + 5

and 10 µg LA groups was significantly increased in comparison to RvD1, and was also significantly augmented in RvD1 + 10 µg LA vs RvD1 + 1 µg LA. Caspase-8 activity in the epicardial area was significantly augmented in the RvD1 + 5 and 10 µg LA groups compared to RvD1 and RvD1 + 1 µg LA ($p < 0.05$) (Figure 3). No significant difference was observed between RvD1 + 1 µg LA and RvD1 for both caspase-3 and caspase-8 in ischemic areas.

Caspase-9 activity in ischemic regions showed significant differences in both endocardial and epicardial regions ($F(3,12.432)=10.590$; $p < 0.05$) and ($F(3,9.104)=8.023$; $p < 0.05$) between groups. *Post hoc* analysis disclosed that caspase-9 activity in both regions of the RvD1 + 1, 5 and 10 µg LA groups was significantly increased in comparison to RvD1 ($p < 0.05$) (Figure 4).

3.4 Akt activity

Akt activity, assessed by Western blotting in ischemic regions, was similar between groups (data not included).

3.5 Neutrophil accumulation

Neutrophil accumulation, estimated by myeloperoxidase activity in the endocardial and epicardial regions, was similar between groups (Figure 5).

4. Discussion

The data obtained in the present study indicate that LA, an omega-6 PUFA, attenuates the cardio-protection induced by RvD1, a metabolite of omega-3 PUFA, when injected at the same time.

LA, an essential omega-6 PUFA found in daily diet, can be converted to AA, a precursor of pro-inflammatory molecules, such as prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes [18]. The literature on the adverse role of AA and its metabolites on myocardial infarct size is abundant. For instance, it has been reported that in isolated, perfused hearts, AA produces biphasic coronary responses, with initial vasoconstriction followed by prolonged vasodilation [18]. Also, many studies have demonstrated that AA metabolites worsen infarct size [21-23]. For these reasons, we decide to investigate another omega-6 PUFA – LA – which is essential in diet but seems to exert less adverse effects on cardiac health than AA [18, 24, 25]. Since the time required for LA transformation to AA metabolites may be slower than for AA itself, we hypothesize that the vasoactive action must be less significant.

Here, we demonstrated that when LA was combined with the omega-3 DHA metabolite RvD1, infarct size increased independently of the dosage levels tested. These results concur with previous studies showing that increased omega-6/-3 ratio enlarged infarct size. Indeed, experiments in our lab have established that a dietary 5:1 vs 1:1 omega-6/-3 ratio culminated in larger infarct size [16]. Similarly, another study revealed enlarged infarct size with a diet poor in omega-3 but rich in omega-6 or saturated fat [22]. In contrast, a diet rich in omega-3 showed smaller infarct size and higher omega-3 PUFA levels in plasma, erythrocyte cell membranes and myocardial mitochondrial phospholipid with improved myocardial resistance

to ischemia and reperfusion [26]. Omega-6 PUFA seems to attenuate the beneficial effect of omega-3 PUFA in the context of myocardial ischemia-reperfusion.

We tested different avenues to ascertain how LA impairs the cardio-protective action of RvD1. We previously demonstrated that the cardio-protective outcome of RvD1 is related to activation of the Akt signalling pathway, an important player in the well-known cardio-protective reperfusion injury salvage kinase pathway [3]. Akt activation during the first min of reperfusion is sufficient to afford cardio-protection, resulting in myocardial infarct size reduction [27]. While we observed myocardial infarct size diminution in the presence of RvD1, it was abolished by LY-294002, an inhibitor of the PI3-K/Akt signalling pathway [3]. The results obtained in the present study indicate that despite increasing LA concentrations, no differences were apparent between the various experimental groups: they suggest that the deleterious effect of LA is not Akt-dependent.

Regarding inflammation, it is generally recognized that omega-6 PUFA amplify inflammatory responses while omega-3 PUFA lead to anti-inflammatory and pro-resolution responses [14]. RvD1 has been documented to reduce neutrophil accumulation [7, 8], and previous work has disclosed that it decreases neutrophil accumulation in ischemic myocardial regions [3]. Some studies have indicated that neutrophil accumulation during the reperfusion period can worsen infarct size, and its limitation could be beneficial in curbing necrosis [21, 28, 29]. In this study, LA did not impact neutrophil accumulation vs RvD1 alone – it suggests that the deleterious effect of LA is not related to action on neutrophil accumulation in the ischemic area.

Our data indicate that apoptosis markers increase in the presence of LA in ischemic endocardial and epicardial regions. Caspase-3 and -8 activities are augmented in both areas

with higher LA doses (5 and 10 μg) vs RvD1 alone. No difference is seen between the lowest dose (1 μg LA) and the RvD1 group. Nevertheless, animals treated with this LA dose presented larger infarct size. Compared to RvD1 alone, caspase-8 activity, known as the extrinsic pathway, could be triggered by pro-inflammatory cytokines [30, 31] released during MI [32, 33]. These results suggest that inflammatory molecules could be modulated by LA and RvD1, since caspase-8 activity increased with higher LA doses, but other factors could also contribute to ultimate infarct size.

On the other hand, caspase-9 activity was elevated by all LA doses (1, 5 and 10 μg) combined with RvD1 compared to RvD1 alone. Caspase-9 activation could be triggered by different signals, such as ischemia [34], indicating that LA enlarges ischemic lesions and limits RvD1's cardio-protective action. This hypothesis is attractive since it has been observed that LA induces coronary vasoconstriction when administered at low dose levels similar to those tested in the present study [18]. The vasoconstriction elicited by LA could amplify myocardial ischemia intensity during the occlusion period and contribute to rapid cell death. In this condition, cell salvage by the combination of reperfusion and RvD1 is thus compromised, resulting in enlarged infarct size. Further work is needed to confirm our hypothesis.

In conclusion, the beneficial effect of RvD1 on myocardial infarct size could be attenuated by LA, an omega-6 PUFA. This observation emphasizes the importance of concomitant omega-6 PUFA reduction if omega-3 PUFA ingestion is considered as an intervention in high-risk cardiovascular patients.

5. Acknowledgments

This work was supported by a grant from *La Fondation des Maladies du Coeur du Canada*.

Kim Gilbert holds a studentship from *Fonds de la recherche du Québec - Santé (FRQ-S)*.

6. Table

Table I. Body weight and hemodynamic data. *indicates $p < 0.05$ compared to baseline data. Values are means \pm SEM. RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid, HR=heart rate (beats/min), MAP=mean arterial pressure (mm Hg), PRP = $HR * MAP / 100$

	RvD1	RvD1 + 1.0 LA	RvD1 + 5.0 LA	RvD1 + 10.0 LA
Body weight (g)	384.8 \pm 3.7	386.4 \pm 5.2	382.4 \pm 6.1	389.9 \pm 5.7
Hemodynamic data				
Baseline				
HR	265.5 \pm 5.4	251.2 \pm 4.6	244.3 \pm 11.8	245.5 \pm 9.0
MAP	80.7 \pm 3.6	76.2 \pm 2.3	79.3 \pm 5.2	79.3 \pm 7.5
PRP	214.4 \pm 11.1	191.2 \pm 5.4	193.8 \pm 14.7	195.7 \pm 22.5
Ischemia				
HR	266.2 \pm 8.7	251.0 \pm 13.8	261.9 \pm 11.1	246.0 \pm 5.1
MAP	69.3 \pm 5.6*	59.6 \pm 3.9*	57.5 \pm 2.4*	60.5 \pm 3.2*
PRP	184.0 \pm 14.1*	148.37.4*	146.0 \pm 4.9*	148.4 \pm 7.0*

7. Figures

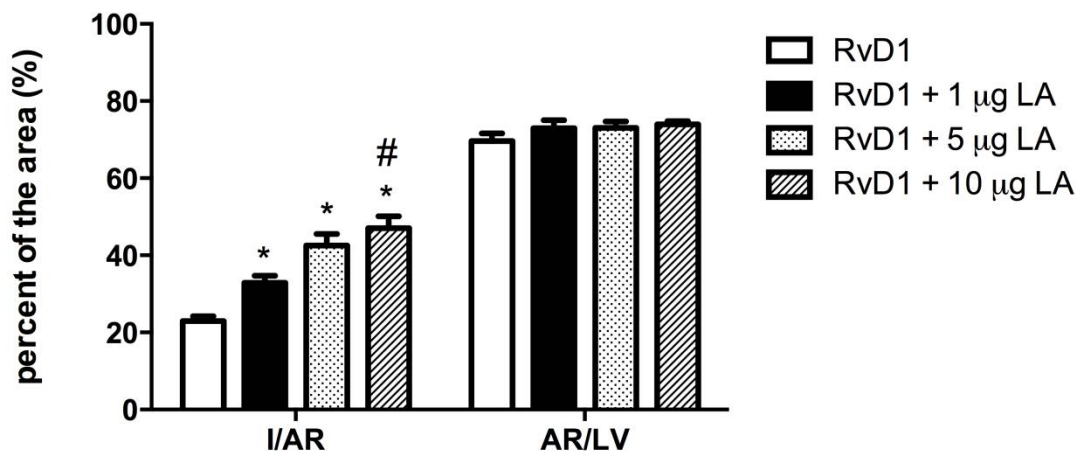


Figure 1. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion.

Values are means \pm SEM (8-9 rats per group). RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid.

*indicates significant difference between RvD1 + 1 µg LA, RvD1 + 5 µg LA and RvD1 + 10 µg LA versus the RvD1 group. # indicates significant difference between RvD1 + 10 µg LA vs RvD1 + 1 µg LA; $p < 0.05$.

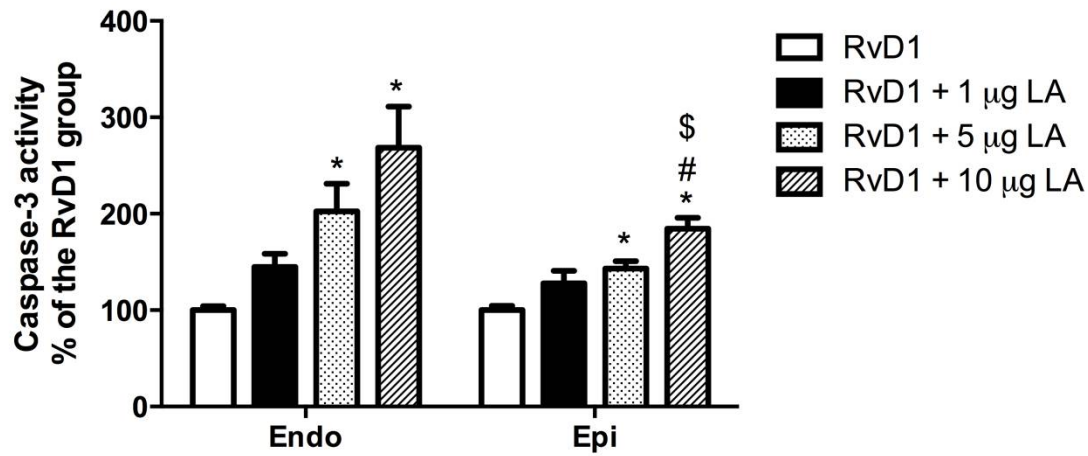


Figure 2. Caspase-3 activity expressed in endocardial and epicardial areas as percentage of the RvD1 group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (8-9 rats per group). RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid, Endo=endocardial region, Epi=epicardial region

*indicates significant difference between RvD1 + 5 µg LA and RvD1 + 10 µg LA versus RvD1. #indicates significant difference between RvD1 + 10 µg LA vs RvD1 + 1 µg LA group.

^{\$}indicates significant difference between RvD1 + 10 µg LA vs RvD1 + 5 µg LA; $p < 0.05$

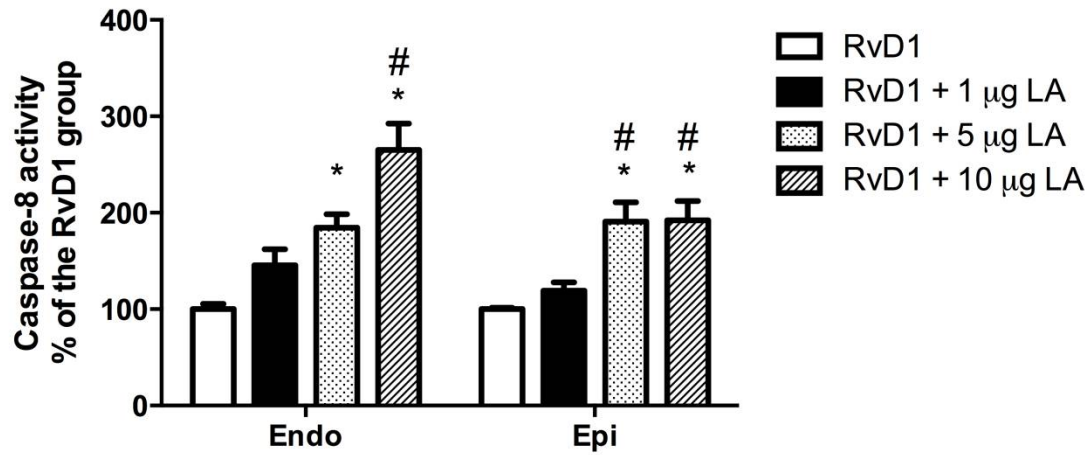


Figure 3. Caspase-8 activity expressed in the endocardial and epicardial areas as percentage of the RvD1 group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (7-9 rats per group). RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid, Endo=endocardial region, Epi=epicardial region.

*indicates significant difference between RvD1 + 5 µg LA and RvD1 + 10 µg LA vs the RvD1 group. # indicates significant difference between RvD1 + 5 µg LA and RvD1 + 10 µg LA vs RvD1 + 1 µg LA; $p < 0.05$.

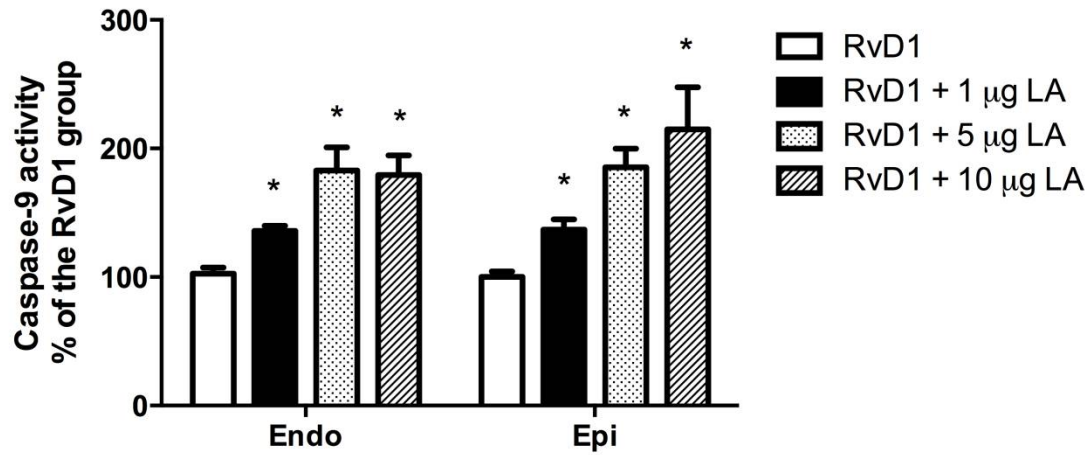


Figure 4. Caspase-9 activity expressed in the endocardial and epicardial areas as percentage of the RvD1 group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (6-8 rats per group). RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid; Endo=endocardial region; Epi=epicardial region.

*indicates significant difference between RvD1 + 1 µg LA, RvD1 + 5 µg LA and RvD1 + 10 µg LA vs RvD1; $p < 0.05$.

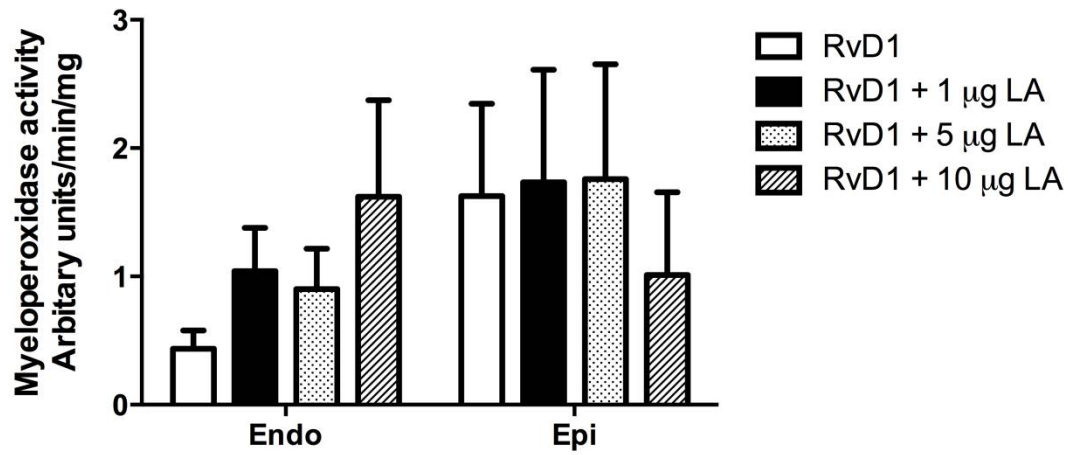


Figure 5. Neutrophil accumulation in the endocardial and epicardial ischemic myocardium evaluated by myeloperoxidase activity (5-8 rats per group) after 24-h reperfusion. RvD1=resolvin D1, LA=linoleic acid, Endo=endocardial region; Epi=epicardial region

8. References

1. Keyes, K.T., et al., *Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(1): p. H153-64.
2. Tran Quang T, G.A.-A., Bourque-Riel V, Gilbert K, Charron T and Rousseau G, *Effect of Resolvin D1 on experimental myocardial infarction*. Experimental and clinical cardiology, 2014. **20**(11): p. 6704-6712.
3. Gilbert K.; Bernier J.; Bourque-Riel, V.M.M., Rousseau, G, *Resolvin D1 reduces infarct size through a phosphoinositide 3-kinase /protein kinase B mechanism*. The Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2015. **in press**.
4. Gilbert, K., et al., *Resolvin d1, a metabolite of omega-3 polyunsaturated Fatty Acid, decreases post-myocardial infarct depression*. Mar Drugs, 2014. **12**(11): p. 5396-407.
5. Serhan, C.N., et al., *Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers*. Lipids, 2004. **39**(11): p. 1125-32.
6. Serhan, C.N., et al., *Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2004. **73**(3-4): p. 155-72.
7. Serhan, C.N., *Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005. **8**(2): p. 115-21.
8. Spite, M. and C.N. Serhan, *Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins*. Circ Res, 2010. **107**(10): p. 1170-84.
9. Lee, H.J., et al., *Resolvin D1 inhibits TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transition of A549 lung cancer cells via lipoxin A4 receptor/formyl peptide receptor 2 and GPR32*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(12): p. 2801-7.
10. Ohira, T., et al., *Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis*. J Biol Chem, 2010. **285**(5): p. 3451-61.
11. Serhan, C.N. and N. Chiang, *Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus*. Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S200-15.
12. Simopoulos, A.P., *The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease*. Asia Pac J Clin Nutr, 2008. **17 Suppl 1**: p. 131-4.
13. Schwalfenberg, G., *Omega-3 fatty acids: their beneficial role in cardiovascular health*. Can Fam Physician, 2006. **52**: p. 734-40.
14. Wijendran, V. and K.C. Hayes, *Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health*. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 597-615.
15. Raphael, W. and L.M. Sordillo, *Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: the role of phospholipid biosynthesis*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(10): p. 21167-88.
16. Rondeau, I., et al., *Effects of different dietary omega-6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction*. Can J Physiol Pharmacol, 2011. **89**(3): p. 169-76.
17. Sacks, F.M. and M. Katan, *Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease*. Am J Med, 2002. **113 Suppl 9B**: p. 13s-24s.

18. Belo, S.E. and J. Talesnik, *Coronary vasoconstrictor and vasodilator actions of arachidonic acid in the isolated perfused heart of the rat*. Br J Pharmacol, 1982. **75**(2): p. 269-86.
19. Boucher, M., et al., *Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction*. Apoptosis, 2006. **11**(7): p. 1067-74.
20. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. Gastroenterology, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
21. Mullane, K., et al., *Myocardial salvage induced by REV-5901: an inhibitor and antagonist of the leukotrienes*. J Cardiovasc Pharmacol, 1987. **10**(4): p. 398-406.
22. Sasaki, K., et al., *Reduction of myocardial infarct size in rats by a selective 5-lipoxygenase inhibitor (AA-861)*. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res, 1987. **17a**: p. 381-3.
23. Amsterdam, E.A., et al., *Limitation of myocardial infarct size in pigs with a dual lipoxygenase-cyclooxygenase blocking agent by inhibition of neutrophil activity without reduction of neutrophil migration*. J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(6): p. 1738-44.
24. Oliver, M.F., et al., *Linoleic acid and coronary heart disease*. Br J Hosp Med, 1989. **42**(4): p. 298, 301-2.
25. Block, R.C., et al., *Omega-6 and trans fatty acids in blood cell membranes: a risk factor for acute coronary syndromes?* Am Heart J, 2008. **156**(6): p. 1117-23.
26. Zeghichi-Hamri, S., et al., *Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats*. Nutr Res, 2010. **30**(12): p. 849-57.
27. Boucher, M., et al., *Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(3): p. 416-22.
28. de Lorgeril, M., et al., *Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium*. Am J Cardiovasc Pathol, 1990. **3**(2): p. 143-54.
29. Rousseau, G., et al., *Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs*. Am Heart J, 1993. **125**(6): p. 1553-63.
30. Varfolomeev, E.E. and A. Ashkenazi, *Tumor necrosis factor: an apoptosis JunKie?* Cell, 2004. **116**(4): p. 491-7.
31. Boatright, K.M. and G.S. Salvesen, *Mechanisms of caspase activation*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 725-31.
32. Deten, A., et al., *Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(2): p. 329-40.
33. Kosmala, W., M. Przewlocka-Kosmala, and W. Mazurek, *Proinflammatory cytokines and myocardial viability in patients after acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2005. **101**(3): p. 449-56.
34. Li, Q., et al., *Activation of cannabinoid type 2 receptor by JWH133 protects heart against ischemia/reperfusion-induced apoptosis*. Cell Physiol Biochem, 2013. **31**(4-5): p. 693-702.

Chapitre 8. Troisième article: Metabolites derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids are important for cardioprotection

8.1 Publication

L'article est présentement soumis et accepté avec des modifications mineures au European Journal of Pharmacology.

Metabolites derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids are important for cardioprotection

Kim Gilbert, Mandy Malick, Ness Madingou, Charles Touchette, Valérie Bourque-Riel,
Leandro Tomaro, Guy Rousseau

Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5 and Département de pharmacologie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Address for correspondence and reprint requests:

Guy Rousseau, Ph.D.
Centre de biomédecine
Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal
5400 boul. Gouin Ouest
Montréal (Québec) Canada H4J 1C5

Shortened title : omega-3 metabolites and cardioprotection

Key words: Omega-3, Myocardial infarction, Metabolites, Resolvin D1.

Abstract

Although controversial, some data suggest that omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are beneficial in cardiovascular diseases and could reduce infarct size. In parallel, we have reported that the administration of RvD1, a metabolite of docosahexaenoic acid, an omega-3 PUFA, diminishes infarct size. We designed the present study to determine if inhibition of two important enzymes involved in Resolvin D1 (RvD1) formation from omega-3 PUFAs could repress their beneficial outcome.

Sprague-Dawley rats were fed an omega-3 PUFA-rich diet for 10 days before myocardial infarction (MI). Two days before MI, they received a daily dose of either Meloxicam (a cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor), PD146176 (a 15-lipoxygenase (15-LOX) inhibitor), both COX-2 and 15-LOX inhibitors combined, or vehicle. MI was induced by occlusion of the left coronary artery for 40 min, followed by 30 min or 24 h of reperfusion. Infarct size and neutrophil accumulation were evaluated after 24 h of reperfusion, with caspase-3, -8, -9, and protein kinase B (Akt) activities assessed at 30 min of reperfusion.

Rats receiving the inhibitors, alone or in combination, presented larger infarct size than those given the omega-3 PUFA alone. Caspase-3 and -8 activities were higher in ischemic areas after treatment with the inhibitors whereas Akt was diminished. Our study disclosed that RvD1's cardioprotective properties were restored when it was combined with the inhibitors.

The results indicate that inhibition of omega-3 PUFA metabolism attenuates their cardioprotective properties. Resolvins appear to be important mediators of cardioprotection conferred by omega-3 PUFAs in our experimental MI model.

Introduction

Controversy still surrounds the beneficial effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in cardiovascular diseases. Whereas some studies indicate that the consumption of omega-3 PUFA supplements has no significant influence on cardiac health⁽¹⁾, others have discerned a favorable outcome with reduced infarct size^(2; 3). We have previously observed that an omega-3 PUFA-rich diet results in significant infarct size diminution compared to a high-omega-6 PUFA diet⁽⁴⁾.

Interestingly, it has been demonstrated that long-chain omega-3 PUFA metabolism generates molecules with pro-resolution of inflammation properties and anti-inflammatory actions⁽⁵⁾. The omega-3 PUFAs eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are metabolized to D series resolvins (RvD) and protectins^(6; 7). For instance, DHA can be converted to RvD not only by acetylated cyclooxygenase-2 (COX-2) and lipoxygenase (LOX) but also by a COX-independent pathway through 15-LOX⁽⁸⁻¹⁰⁾.

We have observed previously that RvD1 administration, either before ischemia or a few minutes before the onset of reperfusion, results in significant infarct size reduction^(11; 12). We have seen that cardioprotection is abrogated in the presence of a phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) inhibitory pathway, underlining its importance in RvD1's beneficial effect⁽¹¹⁾.

Since myocardial infarction (MI) induces inflammatory responses^(13; 14) associated with increased COX-2⁽¹⁵⁾ as well as the activation of other pathways⁽¹⁶⁾ involved in RvD1 synthesis, we hypothesized that some benefits of an omega-3 PUFA-rich diet are related to RvD1 generation. We designed our study to establish if COX-2 and 15-LOX inhibition curbs the beneficial influence of a high-omega-3 PUFA diet in our experimental MI model.

Methods

Ethics statement

These experiments conformed to animal care guidelines published by the Canadian Council on Animal Care, and the procedures performed were approved by the local Animal Care Committee of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal.

Experimental design

One hundred and nineteen 3-month-old Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada), weighing 300-350 g at the start of the experiments were used. They were housed individually under constant conditions (21-22°C temperature and 40-50% humidity), including a 12-h dark-light cycle beginning at 8:00 am. Chow pellets and tap water were available *ad libitum* throughout the study. An acclimatization period of 3 days after delivery by the supplier was imposed before the rats were randomly distributed into 1 of 3 protocols.

Protocol 1

All rats (66 rats) were placed on a commercial diet rich in omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFAs) (TD.08484 Harlan Teklad, Madison WI, USA) for 10 days before MI induction. They were randomly assigned to 1 of 4 groups: 1. Vehicle (0.5 ml NaCl 0.9%); 2. Meloxicam (1 mg/kg, AK Scientific, Inc., Union City, CA, USA), a COX-2 inhibitor; 3. PD146176 (5 mg/kg, Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA), a 15-LOX inhibitor; or 4. Meloxicam (1 mg/kg) and PD146176 (5 mg/kg) dissolved in 0.5 ml NaCl 0.9%. Vehicle, Meloxicam and/or PD146176 were injected on the 8th and 9th days of the diet and 5 min before MI induction on the 10th day.

The animals were sacrificed 24 h post-MI for measurement of infarct size and neutrophil - activity (8-10 rats by group). One rat in the group PD146176 and two rats in the group meloxicam+PD146176 died during the first minute of reperfusion and were excluded from the study. A subgroup was euthanized 30 min after the onset of reperfusion for biochemical analysis (caspase-3, caspase-8, Akt and nuclear factor-kappaB (NF-κB) activation (8 rats by

group). One rat in the group vehicle and one rat in the group meloxicam+PD146176 died during the first minute of reperfusion and were excluded from the study.

Protocol 2

All rats (29 rats) were placed on a standard commercial diet (Charles River 5075), low in omega-3 PUFAs, for 10 days before MI induction. They were randomly assigned to 1 of 4 groups to receive: 1. Vehicle (0.5 ml NaCl 0.9%), 2. Meloxicam (1 mg/kg), 3. PD146176 (5 mg/kg) or 4. Meloxicam (1 mg/kg) and PD146176 (5 mg/kg) dissolved in 0.5 ml NaCl 0.9%. Vehicle, Meloxicam and/or PD146176 were injected on the 8th and 9th days of the diet. Vehicle, Meloxicam and/or PD146176 were injected on day 10 of the diet, 5 min before 40-min ischemia. They were sacrificed 24 h post-MI for infarct size measurement. Three rats died in the meloxicam group, one rat died in the meloxicam+PD146176 group and two rats in the PD146176 group died during the first minutes of reperfusion and were excluded from the study.

Protocol 3

A commercial omega-3 PUFA-rich diet (TD.08484, Harlan Teklad), as in protocol 1, was given to the rats for 10 days before MI induction (24 rats). They were randomly assigned to 1 of 4 groups: 1. Vehicle (0.5 ml NaCl 0.9%); 2. RvD1 0.1 µg (17(S)-RvD1 from Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); 3. Meloxicam (1 mg/kg) and PD146176 (5 mg/kg); 4. Meloxicam (1 mg/kg), PD146176 (5 mg/kg) and RvD1 (0.1 µg) dissolved in 0.5 ml NaCl 0.9%. Vehicle, Meloxicam and PD146176 were injected on the 8th and 9th days of the diet. Vehicle, Meloxicam, PD146176 and RvD1 were injected on the 10th day of the diet, 5 min before ischemia. The animals were sacrificed 24 h post-MI to measure infarct size and RvD1 concentration (3-7 rats per group). Four rats died in the group RvD1 and one rat died in the group meloxicam+PD146176+RvD1 during the first minute of reperfusion and were excluded from the study.

Surgical procedure

Anesthesia was induced by intraperitoneal ketamine/xylazine injection (60 and 10 mg/kg, respectively). The rats were subsequently intubated, and anesthesia was maintained under isoflurane (1-2%) ventilation. Electrocardiograms and heart rate were monitored throughout the procedure. Left thoracotomy at the 5th intercostal space enabled occlusion of the left anterior descending coronary artery with 4-0 silk suture (Syneture, Covidien, Mansfield, MA, USA) and plastic snare, with confirmation by ST segment alterations and the presence of ventricular subepicardial cyanosis. The suture was removed after 40 min of ischemia, permitting myocardial tissue reperfusion. The rats were sacrificed after 30 min of reperfusion or after 24-h reperfusion. The thorax was closed with 2-0, 3-0 and 4-0 silk sutures (Syneture, Covidien) and the animals were given a subcutaneous antibiotic injection of 15,000 IU penicillin G (Duplocillin LA, Intervet Canada Ltd., Whitby, ON, Canada) as well as analgesic subcutaneously (0.05 mg/kg buprenorphine) before being returned to their respective cages.

Measurement of infarct size

After the reperfusion period (30 min or 24 h), the rats were restrained in a cone bag and rapidly decapitated. Their hearts were removed immediately and placed in a dish kept on crushed ice. In animals with 24-h reperfusion, the hearts were removed and washed with saline by retrograde perfusion of the aorta. The left anterior descending coronary artery was occluded at the same site as for MI induction (see above) to map the area at risk (AR) by Evans blue infusion (0.5%). The hearts were frozen (-80°C for 5 min), sliced into 4 transverse 2-mm sections and placed in 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (1%, pH 7.4) at 37°C for 10 min to better distinguish the area of necrosis (I) from the AR. The different regions were carefully drawn on a glass plate, photocopied and cut. After that, the complete infarct region, AR and left ventricle (LV) were weighed separately to express MI as percentage of necrosis (I) of the AR $((I/AR) \times 100)$ and AR as percentage of the LV area $((AR/LV) \times 100)$. In animals with 30-min reperfusion, the ischemic region was divided into endocardial and epicardial areas. Samples were kept at -80°C until needed for biochemical analysis.

Biochemical analysis

Caspase-3 and -8 activities

Caspase-3 and -8 activities were measured according to a previously-described protocol⁽⁴⁾. Tissues were homogenized by sonication in lysis buffer and incubated for 30 min on ice. The tissue homogenates were centrifuged at 4°C for 10 min. Enzymatic reactions were undertaken in reaction buffer with 25 µg of protein (attested by the Bradford method) and fluorescent substrate (Ac-DEVD-AMC for caspase-3 and Ac-IETD-AMC for caspase-8) (40 µM). Reactions were studied after incubation in the dark for 3 h at 37°C and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified by spectrofluorometry (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at an excitation wavelength of 365 nm for both caspase-3 and -8 and emission wavelengths of 465 and 430 for caspase-3 and caspase-8 activities, respectively.

Western blotting: Akt, NF-κB

Western blot analysis was performed, as described previously⁽¹²⁾. Briefly, tissues were homogenized by sonication in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 mol/L sucrose, 10 mmol/L Tris (pH 8.0), 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10 mg/mL leupeptin, 10 mg/mL pepstatin A, 10 mg/mL aprotinin). The tissue homogenates were incubated for 30 min at 4°C and centrifuged at 10,000g for 15 min. Protein concentrations of the supernatants were quantified by the Lowry method. Aliquots of 100 µg protein were loaded in polyacrylamide gels (10%-15%) and migrated at 150 V for 75 min in a mini-gel apparatus (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes with a Trans-Blot semi-dry transfer cell (BioRad Laboratories). Using the SNAP i.d. 2.0 system (Millipore, Etobicoke, ON, Canada), nonspecific sites were blocked for 20-min incubation in Odyssey blocking buffer (Li-CoR, Lincoln, NB, USA) (1:1 with phosphate buffer saline (PBS)). After PBS washing, the membranes were incubated for 10 min with primary antibody 1:1,000 phospho-Akt (S473) (Rabbit Ab Cell Signaling, Whitby, ON, Canada), phospho-Akt (T308) (Rabbit Ab Cell Signaling), total Akt (Rabbit Ab Cell Signaling), NF-κB (Rabbit Ab Cell Signaling) and phosphoNF-κB p65 (Rabbit Ab Cell Signaling). After washing, the membranes were incubated for 10 min with secondary antibody 1:15,000 (anti-rabbit IRDye 800CW, Li-CoR). They were then washed and scanned with Odyssey Li-CoR Clx. Band

intensities were analyzed with Image Studio (Li-CoR, Version 3.1). The same membranes were placed in stripping buffer (0.1 mol/l glycine, 1% SDS, pH 2.0, 1 h at room temperature) and re-used with the same technique for ratio determination of phosphoAkt/total Akt and phosphoNF- κ B/total NF- κ B.

Myeloperoxidase assay: neutrophil activity

Neutrophil activity in the heart was assessed by myeloperoxidase assay, as described by Krawisz et al.⁽¹⁷⁾. Cardiac tissues were first weighed, added to hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer (0.5% HTAB 50 mM potassium phosphate, pH 6.0) and pulverized by sonication. The lysates went through 3 freeze/thaw cycles and were centrifuged at 10,000g for 15 min. To measure neutrophil activity, 0.1 ml of supernatant was added to 2.9 ml of 50 mM sodium phosphate, pH 6.0, with 0.167 mg/mL of o-dianisidine dihydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide. Absorbance of the orange product was measured every 10 s at 460 nm for 2 min by spectrophotometer. Neutrophil activity was quantified by generating the difference between maximum and minimum divided by 2. divided by the weight of the heart slice.

RvD1 dosage

Plasma RvD1 concentrations were assessed according to the protocol provided by the manufacturer (96 Well Plate Item No. 500380, Cayman Chemical Company). In brief, plasma was added in each plate well. RvD1 AChE Tracer and RvD1 EIA Antiserum were included in each plate sample. The plates were incubated for 18 h at 4°C and washed before Ellman's Reagent was added to each well. The plates was placed in the dark at room temperature for 120 min and read at 415 nm.

Statistical analysis

The data are reported as means (\pm SEM: standard error of the means). Statistical analyses were performed with SPSS 20 (SPSS, Chicago, IL, USA). Groups were compared by analysis of variance followed by *post hoc* comparisons (Dunnett for protocol 1 and 2 and Bonferonni for

protocol 3) when significant. If variances were heterogeneous, Brown-Forsythe correction was followed by Games-Howell comparisons when applicable. $p < 0.05$ values were considered to be significant.

Results

Food consumption between groups was similar independently of diet and represented 29.4 ± 0.3 g/day. Body weights were consistent between groups in the 3 protocols (Table 1). No significant between-group differences were observed.

Protocol 1

Infarct size

Myocardial infarct size (I), expressed as AR percentage, was different between groups: $F(3,27)=17.328$, $p<0.05$. *Post hoc* analysis indicated that groups receiving PD146176, Meloxicam or their combination presented significantly larger infarct size compared to the vehicle controls ($p<0.05$). AR, expressed as LV percentage, was similar among groups and represented around 70% (Figure 1).

Caspase-3 and -8 activities

Caspase-3 activity in the ischemic endocardial ($F(3;14.282)=6.633$, $p<0.05$) and epicardial ($F(3,23)=8.742$, $p<0.05$) regions was significantly different between groups. Caspase-3 activity was increased significantly in both areas in groups receiving PD146176, Meloxicam or their combination versus the vehicle controls ($p<0.05$, Figure 2A).

Caspase-8 activity in the ischemic endocardial and epicardial regions indicated significant between-groups differences ($F(3;17.992)=4.546$, $p<0.05$) and ($F(3.23)=5.549$, $p<0.05$). *Post hoc* analysis suggested significantly increased caspase-8 activity in the groups receiving PD146176, Meloxicam or PD146176 and Meloxicam versus the vehicle controls ($p<0.05$, Figure 2B).

Inflammation

Neutrophil accumulation

Neutrophil accumulation in the ischemic endocardial and epicardial regions, estimated by myeloperoxidase activity, was similar between groups (data not shown).

NF- κ B activation

NF- κ B activity was similar between groups, in ischemic endocardial and epicardial areas assessed by Western blotting (data not included).

Cardioprotection pathway: Akt activity

Akt activity was different between groups in ischemic endocardial and epicardial areas quantified for pAkt(T308)/Akt only by Western blotting: (F(3,21)=6,767, $p<0.05$) and (F(3;13.665)=13,699, $p<0,05$). Akt phosphorylation at threonine in the vehicle controls was higher than in the groups receiving PD146176, Meloxicam or their combination (Figure 3A). Akt phosphorylation at S473 in both endocardial and epicardial areas was similar between groups (Figure 3B).

Protocol 2

Infarct size

Myocardial infarct size (I), expressed as AR percentage, did not differ between groups. The AR, expressed as LV percentage, was similar among groups and represented around 70% (Figure 4). No significant effect was observed in the absence of dietary omega-3 PUFAs, in contrast to the results obtained in protocol 1.

Protocol 3

Infarct size

Myocardial infarct size (I), expressed as AR percentage, suggested significant between-group difference: F(3;13.352)=13.038, $p<0.05$. *Post hoc* analysis revealed significant differences between group receiving the combination of inhibitors or vehicle ($p<0.05$). No differences were seen between groups receiving RvD1 or the inhibitor combination + RvD1 and the vehicle controls. AR, expressed as LV percentage, was similar among groups and represented around 70% (Figure 5).

RvD1 dosage

Plasma RvD1 concentration indicated significant differences between groups: $F(3,21)=5.231$, $p<0.05$. *Post hoc* analyses suggested significant difference between groups receiving PD146176 + Meloxicam or vehicle ($p<0.05$). No difference was observed between groups receiving RvD1 or PD146176 + Meloxicam + RvD1 or vehicle (Figure 6).

Discussion

The present results underscore the importance of omega-3 PUFA metabolism for cardioprotection. Even with inhibitors of COX-2 and 15-LOX, enzymes involved in omega-3 PUFA metabolism, RvD1 administration is sufficient to confer cardioprotection.

Protocol 1 was designed to demonstrate the utility of omega-3 PUFA metabolites in cardioprotection by omega-3. On the omega-3-rich diet, COX-2, 15-LOX or both inhibitors increased infarct size compared to the omega-3 PUFA-enriched diet without inhibitors.

The effects of the inhibitors were not observed in protocol 2, with its low-omega-3 PUFA diet. These data suggest that 15-LOX and/or COX-2 are essential in the cardioprotection afforded by omega-3 PUFAs. Both enzymes have been implicated in RvD formation^(18; 19) from DHA.

Plasma RvD1 assessment (protocol 3) confirmed that its level was reduced in the presence of inhibitors compared to the diet alone, indicating that the regimen of inhibitors was adequate in lowering DHA metabolism. Moreover, RvD1 obtained with the diet was similar to the plasma RvD1 level observed after its injection, suggesting that the protective RvD1 threshold can be reached with a high-omega-3 PUFA diet. However, it is possible that the inflammatory process triggered by ischemia is necessary for DHA metabolism and that these plasma RvD1 levels can be attained with a high-omega-3 PUFA diet. Indeed, it has been demonstrated that MI results in heightened COX-2⁽¹⁵⁾ and LOX-15 activities⁽¹⁶⁾, with both enzymes being involved in DHA metabolism.

In a previous study, we noted that RvD1 administration before the ischemic period or a few min before the onset of reperfusion significantly reduced myocardial infarct size^(11; 12). The mechanism by which RvD1 induces this cardioprotection seems related to activation of the PI3K/Akt signaling pathway. Indeed, in the presence of an inhibitor of this pathway, the cardioprotection induced by RvD1 is abolished⁽¹¹⁾. However, our experimental design cannot overlook that other omega-3 PUFA metabolites, such as RvE1⁽²⁰⁾, participate in protection afforded by diet. Indeed, omega-3-rich diets also include EPA, which can turn into RvE1, a metabolite that can provide cardioprotection⁽²⁰⁾.

RvD1 could phosphorylate Akt at both serine and threonine sites^(12; 20). In the present study, we observed that the presence of COX-2 and 15-LOX inhibitors is linked with reduced phosphorylation at the threonine site (T308) without any significant effect at the serine

phosphorylation site (S473). According to the literature, each site has its own distinct and non-overlapping functions⁽²¹⁾. The T308 site seems to be needed for signaling⁽²¹⁾ and, according to our results, it is essential for cardioprotection induced by omega-3 PUFAs and their metabolites.

The effects of Meloxicam and PD146176 on Akt activity are controversial. While some have reported that Meloxicam reduces Akt activity⁽²²⁾, others have proposed that it does the opposite⁽²³⁾. Conflicting results on the effects of PD146176 on Akt have also been reported^(24; 25). In the present study, we observed that, in the presence of these inhibitors, Akt phosphorylation is reduced, which indicates that the activation of this pathway has been affected. However, in the third series (the protocol 3), we ascertained that despite the inhibitors, RvD1 was able to provide cardioprotection, suggesting that it can surpass the effects of these enzymes.

We also observed increased caspase-3 and -8 activities with the presence of the inhibitors in ischemic areas versus the vehicle group. It is known that apoptosis occurs during the reperfusion period and contributes to increased infarct size^(26; 27). We have seen that RvD1, in the same model, can result in reduced caspase-3 and -8 activities. The mechanism is still undefined, so more work is necessary to determine if the mechanism is activation through G-protein coupled receptors (GPCR) or some other agencies.

Many authors have reported that Meloxicam has no significant effect on caspase-3 activity^(28; 29) whereas it appears that PD146176 reduces apoptosis⁽³⁰⁾. These data indicate that increased caspase activation, observed in the groups given these inhibitors, is not related to the molecules themselves but probably to their action on omega-3 PUFA metabolism.

Another interesting impact of omega-3 PUFAs and their metabolites in the course of MI is their anti-inflammatory properties. Long-chain omega-3 PUFAs (EPA/DHA) inhibit NF-κB activation, cytokine production⁽³¹⁾ and neutrophil accumulation⁽³²⁾. In a model of inflammation induced by lipopolysaccharide, EPA and DHA curtail NF-κB activation and monocyte chemoattractant protein-1 via the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-γ) activation⁽³¹⁾. The mechanisms behind the inhibition of neutrophil accumulation could represent omega-3 metabolites, resolvins and protectins acting on their receptors. For instance, RvD1 stops transendothelial human neutrophil migration and pro-inflammatory cytokine

production by binding to its GPCR GPR32 and ALX4⁽³³⁾. Our data seem to contradict these findings. Indeed, we did not encounter any reduction of neutrophil accumulation or NF- κ B activation in our model, and suggest a minimal effect to DHA metabolites on these parameters. However, it seems possible that the effect is more related to EPA and its metabolites instead of DHA and its metabolites. Dietary EPA, in addition to the possible presence of RvE1 in the model, justifies these results⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Our previously-published data indicate that pretreatment with Celecoxib, a COX-2 inhibitor, reduces infarct size⁽³⁷⁾. However, in the present study, we were unable to detect any cardioprotection with Meloxicam. Different hypotheses can be put forward to explain the discrepancy: 1. Celecoxib was maintained for 28 days before ischemia, which was much longer than treatment in the present study. Extended treatment could result in the inhibition of other cell types, with COX-2 turnover being more rapid; 2. The cardioprotective effect could be molecule-specific. As proposed by another study⁽³⁸⁾, the cardiovascular side-effects of Celecoxib are less significant than those occurring with Meloxicam. A parallel study of both these COX-2 inhibitors should be performed to confirm these hypotheses.

Conclusion

The present investigation indicates that omega-3 PUFA metabolism is essential for cardioprotection. However, despite inhibition of the enzymes involved in omega-3 PUFA metabolism, RvD1 can overpass this effect and provide cardioprotection.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from *La Fondation des Maladies du Coeur du Canada* (grant number G-13-0001823). Kim Gilbert holds a studentship from *Fonds de la recherche du Québec-Santé (FRQS)*.

Conflict of interest

None

Authorship

KG, MM, NM, CT, VBR and LT contributed to the experiments, data analysis and writing, and GR contributed to conception of the experiments, data analysis and writing.

Table legends

Table I. Body weight gain in the different groups in protocols 1, 2 and 3

	Weight gain during the experiment (g±SEM)
Protocol 1	
Vehicle	70.5±4.5
PD146176	72.1±4.5
Meloxicam	63.1±4.4
Meloxicam + PD146176	71.1±4.5
Protocol 2	
Vehicle	73.0±5.2
PD146176	63.7±3.7
Meloxicam	60.8±3.5
Meloxicam + PD146176	67.5±4.7
Protocol 3	
Vehicle	72.7±5.5
Vehicle + RvD1	74.8±7.1
Meloxicam + PD146176	65.3±4.5
Meloxicam + PD146176 + RvD1	72.7±4.0

Values are means±SEM.

RvD1=Resolvin D1

Figure legends

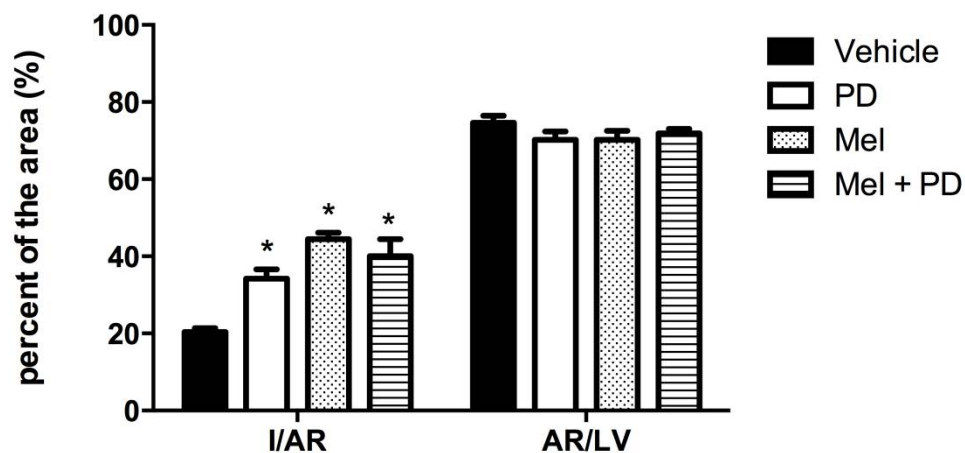


Figure 1. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion. PD=PD146176; Mel=Meloxicam. Values are means \pm SEM (7-8 rats per group). *indicates significant difference between the experimental and vehicle groups; $p < 0.05$.

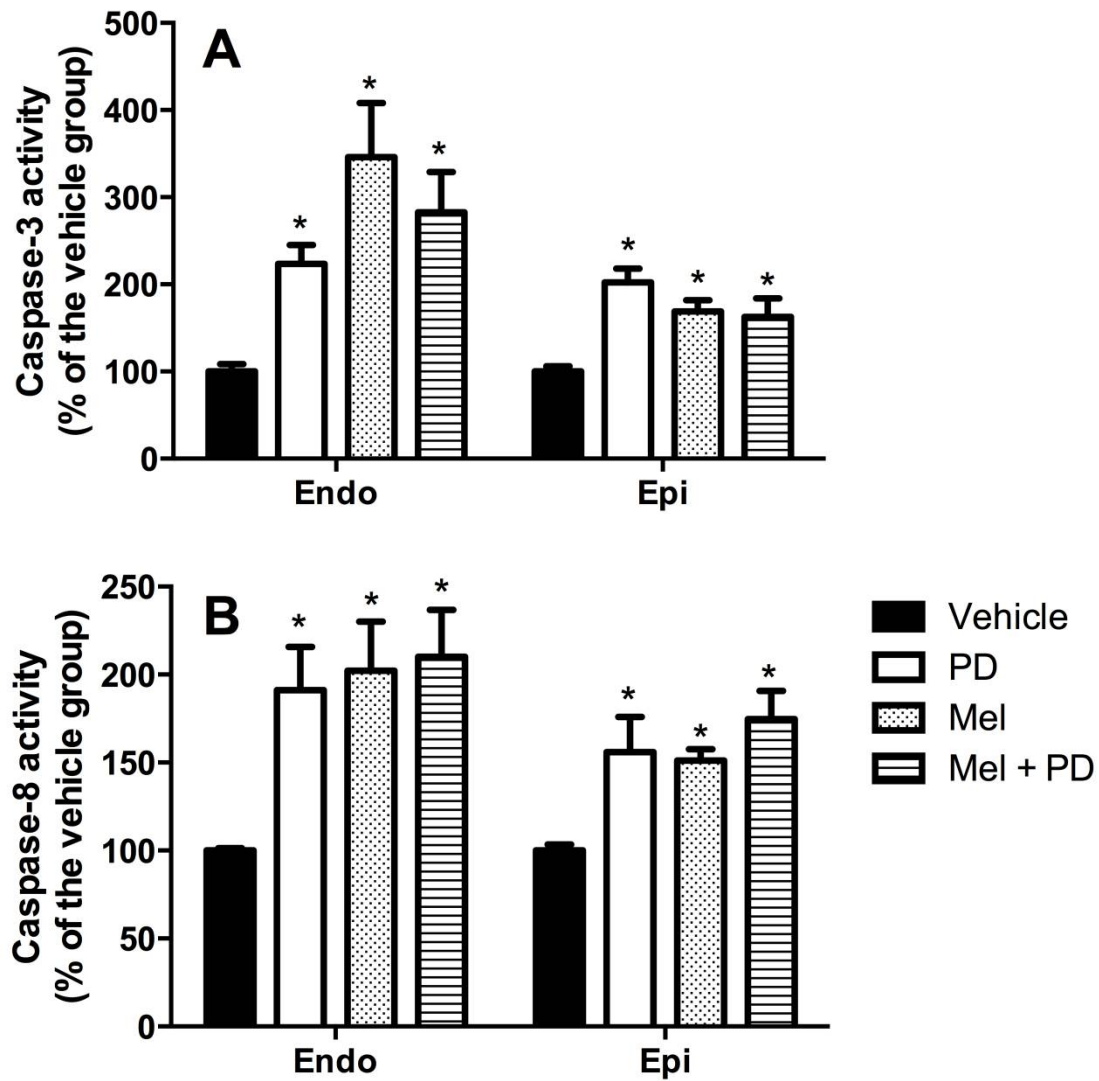


Figure 2. A: Caspase-3 activity expressed in the endocardial (Endo) and epicardial (Epi) areas as percentage of the vehicle group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (6-8 rats per group). **B:** Caspase-8 activity expressed in the endocardial (Endo) and epicardial (Epi) areas as percentage of the vehicle group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30-min reperfusion (6-8 rats per group). PD=PD146176, Mel=Meloxicam. *indicates significant difference between the experimental and vehicle groups; $p < 0.05$

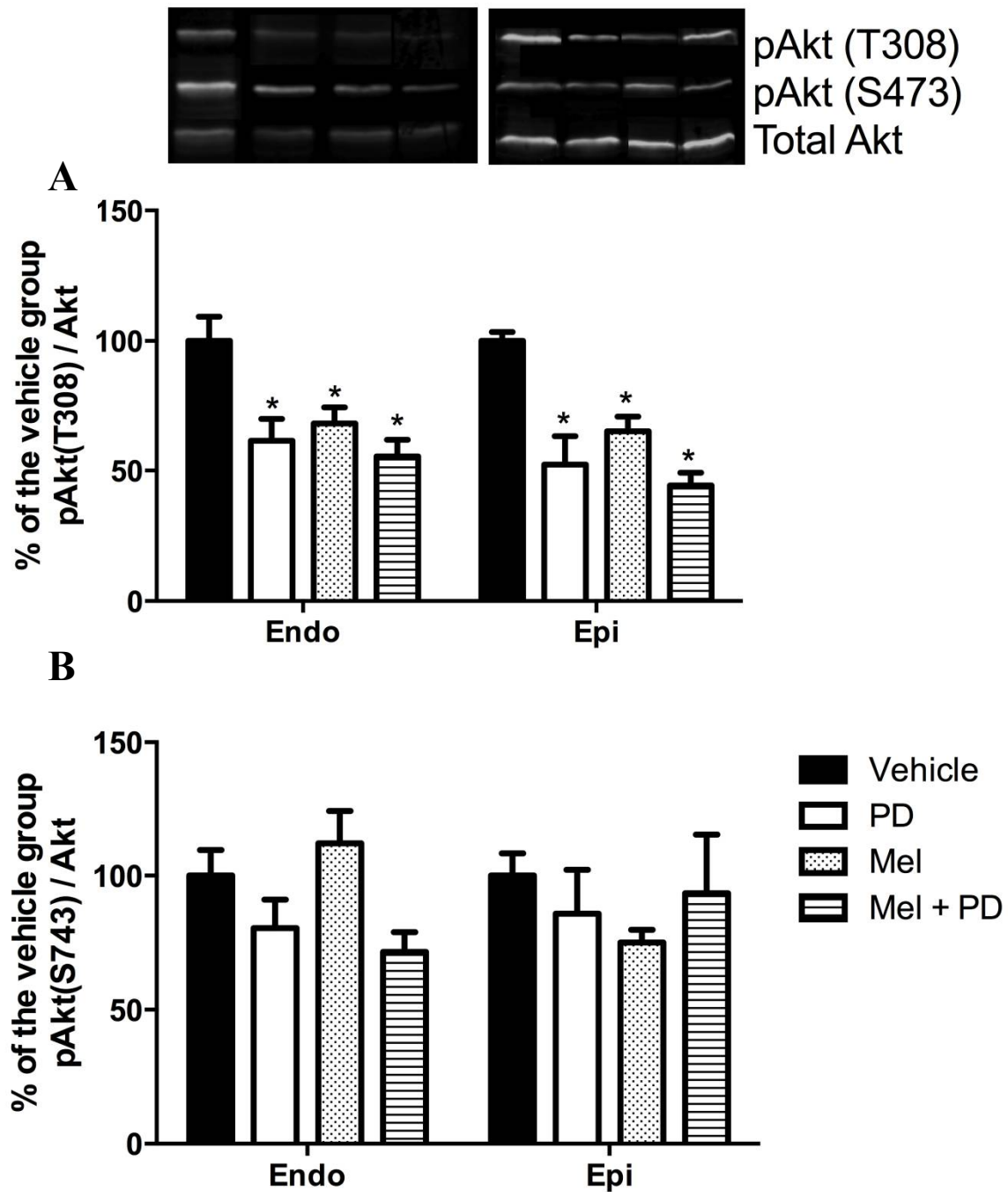


Figure 3. A: pAkt(T308)/Akt ratio, and **B:** pAkt(S473)/Akt ratio expressed in the endocardial (Endo) and epicardial (Epi) areas as percentage of the vehicle group and assessed by Western blotting after 30-min reperfusion (6-8 rats per group). PD=PD146176, Mel=Meloxicam.

*indicates significant difference between the experimental and vehicle groups; $p < 0.05$. Top panel: Representative Western blot of pAkt(T308), pAkt(S473) and total Akt.

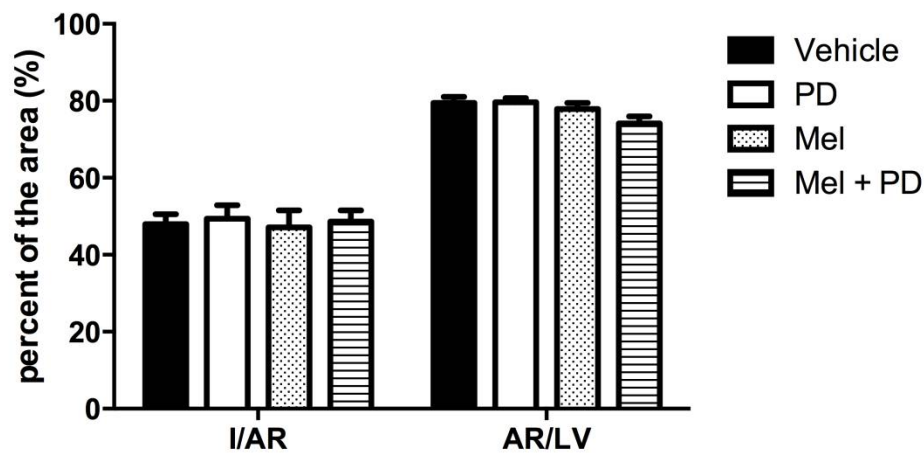


Figure 4. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion. PD=PD146176, Mel=Meloxicam. Values are means \pm SEM (5-6 rats per group).

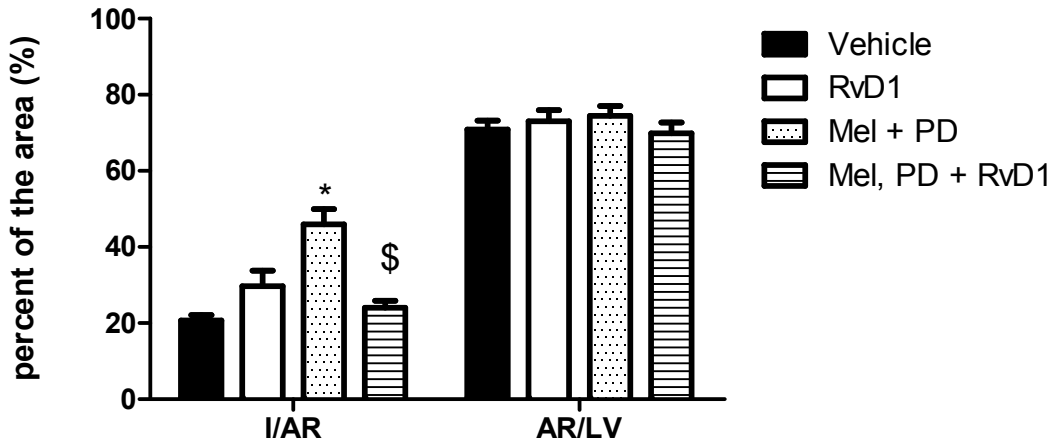


Figure 5. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion. RvD1=Resolvin D1, PD=PD146176, Mel=Meloxicam. Values are means \pm SEM (6-7 rats per group). *indicates significant difference between the Mel+PD and vehicle groups; $p < 0.05$. \$indicates significant difference between the M,PD + RvD1 and Mel+PD groups; $p < 0.05$.

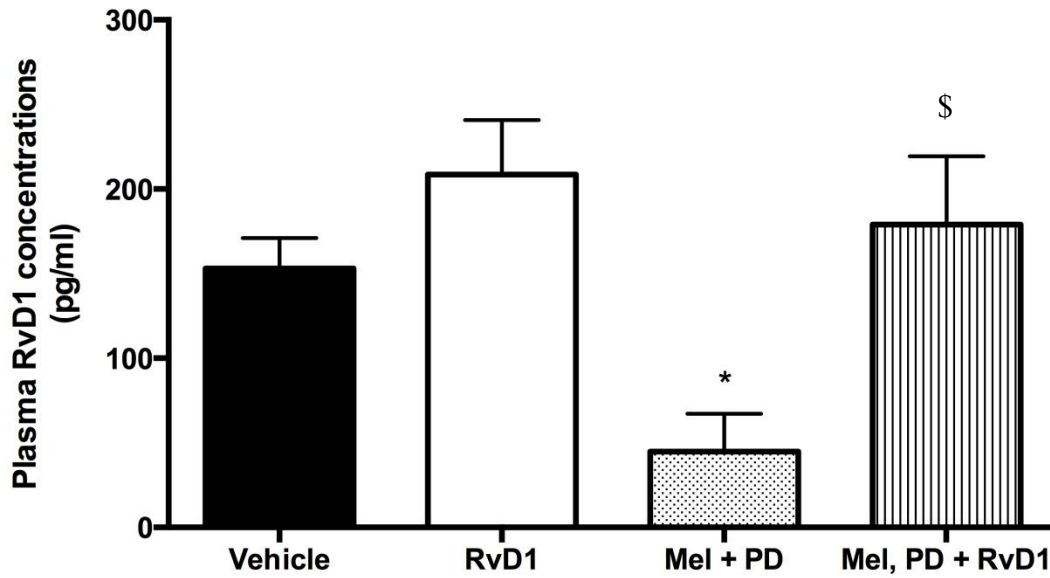


Figure 6. Plasma RvD1 concentration assessed by ELISA after 30-min reperfusion (5-8 rats per group) and expressed in pg/mL. RvD1=Resolvin D1, PD=PD146176, Mel=Meloxicam. *indicates significant difference between the Mel+PD and vehicle groups; $p < 0.05$. \$indicates significant difference between the Mel, PD + RvD1 and Mel+PD groups; $p < 0.05$.

References

1. Rizos EC, Ntzani EE, Bika E *et al.* (2012) Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **308**, 1024-1033.
2. Abdukeyum GG, Owen AJ, McLennan PL (2008) Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning. *J Nutr* **138**, 1902-1909.
3. Nageswari K, Banerjee R, Menon VP (1999) Effect of saturated, omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on myocardial infarction. *J Nutr Biochem* **10**, 338-344.
4. Rondeau I, Picard S, Bah TM *et al.* (2011) Effects of different dietary omega-6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol* **89**, 169-176.
5. Serhan CN (2010) Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol* **177**, 1576-1591.
6. Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A *et al.* (2011) Novel anti-inflammatory--pro-resolving mediators and their receptors. *Curr Top Med Chem* **11**, 629-647.
7. Serhan CN, Chiang N (2008) Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**, S200-S215.
8. Serhan C, Hong S, Gronert K *et al.* (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* **196**, 1025-1037.
9. Serhan CN, Arita M, Hong S *et al.* (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids* **39**, 1125-1132.
10. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S *et al.* (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **73**, 155-172.

11. Gilbert K, Bernier J, Bourque-Riel V *et al.* (2015) Resolvin D1 reduces infarct size through a phosphoinositide 3-kinase /protein kinase B mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015 Mar 3. [Epub ahead of print].
12. Tran Quang T, Gosselin AA, Bourque-Riel V *et al.* (2014) Effect of Resolvin D1 on experimental myocardial infarction. *Exp Clin Cardiol* **20**, 6704-6712.
13. de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A *et al.* (1990) Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* **3**, 143-154.
14. Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK *et al.* (1988) Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. *Circ Res* **63**, 1070-1079.
15. Abbate A, Santini D, Biondi-Zoccai GG *et al.* (2004) Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression at the site of recent myocardial infarction: friend or foe? *Heart* **90**, 440-443.
16. Song L, Yang H, Wang HX *et al.* (2014) Inhibition of 12/15 lipoxygenase by baicalein reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via modulation of multiple signaling pathways. *Apoptosis* **19**, 567-580.
17. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* **87**, 1344-1350.
18. Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B *et al.* (2012) Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **97**, 73-82.
19. Winkler JW, Uddin J, Serhan CN *et al.* (2013) Stereocontrolled total synthesis of the potent anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediator resolvin D3 and its aspirin-triggered 17R-epimer. *Org Lett* **15**, 1424-1427.
20. Keyes KT, Ye Y, Lin Y *et al.* (2010) Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**, H153-164.
21. Hart JR, Vogt PK (2011) Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget* **2**, 467-476.

22. Dong X, Li R, Xiu P *et al.* (2014) Meloxicam executes its antitumor effects against hepatocellular carcinoma in COX-2- dependent and -independent pathways. *PloS One* **9**, e92864.
23. Tasaki Y, Omura T, Yamada T *et al.* (2010) Meloxicam protects cell damage from 1-methyl-4-phenyl pyridinium toxicity via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res* **1344**, 25-33.
24. Middleton MK, Zukas AM, Rubinstein T *et al.* (2006) Identification of 12/15-lipoxygenase as a suppressor of myeloproliferative disease. *J Exp Med* **203**, 2529-2540.
25. Chen Y, Peng C, Abraham SA *et al.* (2014) Arachidonate 15-lipoxygenase is required for chronic myeloid leukemia stem cell survival. *J Clin Invest* **124**, 3847-3862.
26. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J (2006) Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res* **70**, 200-211.
27. Kajstura J, Cheng W, Reiss K *et al.* (1996) Apoptotic and necrotic cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* **74**, 86-107.
28. Saito T, Tamura D, Asano R (2014) Usefulness of selective COX-2 inhibitors as therapeutic agents against canine mammary tumors. *Oncol Rep* **31**, 1637-1644.
29. Hassan MH, El-Beshbishy HA, Aly H *et al.* (2014) Modulatory effects of meloxicam on cardiotoxicity and antitumor activity of doxorubicin in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **74**, 559-569.
30. Sordillo LM, Weaver JA, Cao YZ *et al.* (2005) Enhanced 15-HPETE production during oxidant stress induces apoptosis of endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **76**, 19-34.
31. Li H, Ruan XZ, Powis SH *et al.* (2005) EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. *Kidney Int* **67**, 867-874.
32. Singer P, Shapiro H, Theilla M *et al.* (2008) Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med* **34**, 1580-1592.

33. Hong S, Gronert K, Devchand PR *et al.* (2003) Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* **278**, 14677-14687.
34. Sperling RI (1998) The effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on neutrophils. *Proc Nutr Soc* **57**, 527-534.
35. Arita M, Oh SF, Chonan T *et al.* (2006) Metabolic inactivation of resolvin E1 and stabilization of its anti-inflammatory actions. *J Biol Chem* **281**, 22847-22854.
36. Dona M, Fredman G, Schwab JM *et al.* (2008) Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood* **112**, 848-855.
37. Lada-Moldovan L, Kaloustian S, Bah TM *et al.* (2009) Chronic pretreatment with Celecoxib reduces infarct size. *J Cardiovasc Pharmacol* **54**, 31-37.
38. Huang WF, Hsiao FY, Tsai YW *et al.* (2006) Cardiovascular events associated with long-term use of celecoxib, rofecoxib and meloxicam in Taiwan: an observational study. *Drug Saf* **29**, 261-272.

Chapitre 9. Discussion Générale

Étant donné que chaque étude de cette thèse présentée sous forme d'articles, a sa propre discussion détaillée, cette section sera davantage une discussion globale réunissant les trois différentes études et élargissant le sujet tout en soulignant quelques perspectives futures.

9.1 Traitement cardioprotecteur prometteur

Il est bien décrit dans la littérature qu'un apport élevé en ω -3 est associé à un risque cardiovasculaire moindre, dont l'IM. C'est d'ailleurs ce qui est observé chez les Inuits et les Japonais qui sont de grands consommateurs de poissons: leur ratio ω -3: ω -6 ne dépasse pas le 1:4-5 [436].

De plus, après un épisode d'infarctus, plusieurs s'entendent sur les bénéfices des ω -3 sur les différentes conséquences de l'IM. Un groupe de cardiologues de l'Inde a d'ailleurs démontré qu'un apport journalier de 460mg d'EPA et de 380mg de DHA diminuait le risque de mortalité toutes causes confondues de 15%, une diminution de 20% d'événements cardiovasculaires et un risque diminué de 45% de morts cardiaques subites en plus de montrer une diminution de l'hypertriglycémie [437]. Les études GISSI et DART, dont j'ai fait mention dans l'introduction, démontrent aussi un impact positif des ω -3 sur la récurrence cardiovasculaire et la mortalité en général [419, 420]. Par contre, il est à prendre en considération que ces études sont européennes et qu'une alimentation de type méditerranéenne est présente dans ces pays. L'apport en ω -6 est donc plus faible que dans les pays nord-américains. La diète méditerranéenne est faible en gras (de 30 à 40% d'apport en calories par jour) avec peu de gras saturés (moins de 7%), est caractérisée par un apport modéré en gras monoinsaturés (20-25%), mais un apport considérable en acides gras ω -3 (supérieur à 0,75%). Une étude réalisée chez des patients post-IM démontre des bénéfices en terme de survie et de diminution de la survenue d'événements cardiovasculaires lorsqu'une diète faible en gras ou méditerranéenne est adoptée [438]. L'huile d'olive, les fruits et légumes frais ainsi que les céréales sont au coeur de la diète méditerranéenne [439]. Les ω -3 sont aussi à considérer

comme traitement adjuvant chez les patients nord-américains consommant une diète de type "western" riche en ω -6, toutefois d'autres changements dans leur alimentation doivent être pris en charge pour voir apparaître le bénéfice des ω -3, comme une diminution en consommation de gras et une diminution en AG ω -6 pour rétablir un ratio ω -3: ω -6 optimal. Il ne s'agit pas de supprimer la consommation en ω -6 puisque cet AG est essentiel, mais plutôt d'équilibrer leur consommation comme le laisse suggérer une revue de Simopoulos où une diminution en AG ω -6 dans la diète de type "western" permettrait de diminuer l'incidence de maladies chroniques inflammatoires et cardiovasculaires [440].

Autrement, de manière plus spécifique, l'EPA et le DHA montrent une cardioprotection lorsqu'administrés avant l'IM. Chez le lapin, l'administration d'EPA à raison de 600mg/kg/jour pendant deux semaines montre une diminution significative de la taille de l'infarctus. Le L-NAME, un inhibiteur de la synthèse du NO, ainsi que la charybdotoxine, un bloqueur des canaux potassiques activés par le calcium, bloquent partiellement l'effet de l'EPA. Donc, un mécanisme impliquant le NO ainsi que les canaux potassiques dépendants du calcium peuvent être en partie impliqués dans l'effet cardioprotecteur de l'EPA [432]. Une étude chez le chien démontre qu'une consommation de 100mg/kg/jour d'EPA pendant huit semaines avant l'IM diminue l'incidence et la sévérité des arythmies via une augmentation de l'activité de la pompe calcique-magnésium ATPase. Ceci conduit à une diminution de l'accumulation rapide de calcium en ischémie et en reperfusion ainsi qu'à une diminution des arythmies [441]. Dans ce même modèle, l'EPA a montré une diminution de la réponse chémotaxique des neutrophiles à LTB_4 , une diminution de la taille de l'infarctus, une préservation de la contractilité cardiaque ainsi qu'une diminution de la myéloperoxidase montrant une diminution de l'accumulation des neutrophiles dans le myocarde [442]. Donc, l'EPA s'avère cardioprotecteur seul lorsque donné avant l'IM via l'activation de plusieurs mécanismes. Le NO, une diminution de l'accumulation et de l'action négative du calcium ainsi qu'une diminution de l'accumulation des neutrophiles peuvent être en cause. L'EPA a aussi montré une activation d'Akt dans un modèle cellulaire. Donc, l'activation de la voie RISK pourrait aussi être la cause de la diminution de la taille de l'infarctus observée dans plusieurs modèles, bien que cette voie ne soit pas encore clairement

décrite dans la littérature avec l'EPA seul [443]. D'un côté plus clinique, chez des patients japonais hypercholestérolémiant, la prise de 1,8g d'EPA en plus des statines versus la prise de statine seule de façon journalière montre une diminution d'événements cardiovasculaires primaires, une diminution d'angines instables ainsi qu'une diminution d'événements secondaires chez les patients ayant déjà eu un épisode cardiovasculaire [444]. L'EPA pourrait donc être un bon traitement adjuvant chez les patients souffrants d'hypercholestérolémie afin de diminuer les risques et les récives coronariennes.

Au niveau du DHA, une étude récente a montré qu'une infusion de DHA dans des coeurs isolés avant et après l'ischémie induisait une cardioprotection, une diminution des dommages cardiaques et une protection antioxydante via une modulation de l'expression des gènes ciblés par "*Neurogenic locus notch homolog protein*" (Notch) 2 et 3 [445] impliqués dans la survie cellulaire. L'activation de Notch active à son tour la voie PI3K/Akt, ce qui peut contribuer à l'effet de survie cellulaire via l'activation de la voie RISK [446]. Le DHA pourrait possiblement s'avérer cardioprotecteur lorsque donné à la reperfusion, donc pourrait représenter une option thérapeutique importante.

Au niveau des modèles expérimentaux *in vivo*, l'EPA et le DHA n'ont pas encore été décrits comme pouvant avoir un rôle cardioprotecteur lorsque donnés au moment de l'IM et plus précisément au moment de la reperfusion afin de représenter un moyen thérapeutique intéressant. Une hypothèse plausible est que ceux-ci doivent être métabolisés en leurs différents métabolites effecteurs, qui eux confèrent une cardioprotection au moment de l'IM. Donc, l'utilisation directe de ces métabolites pourrait représenter une piste thérapeutique intéressante.

Une étude a déjà été publiée avec la RvE1, issue de l'EPA, démontrant un potentiel thérapeutique *in vitro* et *in vivo*. La RvE1, donnée de manière intraveineuse à des doses de 0,03, 0,1 et 0,3 mg/kg avant la reperfusion, montre une augmentation de la viabilité

cellulaire, une diminution de l'apoptose montrée par une diminution de l'activité de la caspase-3, une activation de la voie PI3K/Akt et Erk1/2 ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la eNOS synthase. De plus, l'effet de la RvE1 est bloqué par un inhibiteur du récepteur tyrosine kinase EGF. De ce fait, la RvE1 protège contre les lésions d'ischémie et de reperfusion lorsque donnée au moment de l'ischémie [307]. Il est encore à démontrer si la RvE1 conserve son effet lorsque donnée à la reperfusion.

De notre côté, dans notre laboratoire, nous avons montré le potentiel important de la RvD1 issue du DHA. De la même manière que la RvE1, nous avons démontré qu'un traitement à l'ischémie avec la RvD1 entraîne une cardioprotection via l'activation de la voie PI3K/Akt (article 1 de la thèse) à des doses inférieures que la RvE1. Par contre, la RvD1 a été donnée intracardiaque versus la RvE1 qui, elle, a été donnée de façon intraveineuse. Cela peut expliquer la différence au niveau du dosage. D'autres études regardant le rôle de résolution de l'inflammation de la RvE1 et de la RvD1 montrent un effet à des doses similaires, donc il ne semble pas y avoir une différence dans la puissance de ces deux métabolites, [447] bien qu'ils ne soient pas testés dans une même étude d'ischémie-reperfusion cardiaque. Il serait d'ailleurs intéressant de les utiliser ensemble ou séparément dans le modèle d'IM afin de comparer leur action et de voir même s'ils ont une action complémentaire et s'il y a une synergie entre les deux. La RvE1 et la RvD1 partagent des effets, mais ont chacun des effets distincts qui s'expliquent par leurs récepteurs qui leur sont respectifs [447].

Des études de notre laboratoire ont de plus démontré que la RvD1, administrée au moment de la reperfusion, conserve un effet cardioprotecteur à la même dose qui se montre efficace à l'ischémie [448]. Une étude de notre laboratoire a aussi démontré que la RvD1, donnée chez le porc quelques minutes avant la reperfusion via le cathéter avant le site de l'occlusion, diminue la taille de l'infarctus [449]. De ce fait, la RvD1 peut représenter un traitement prometteur chez le patient chez qui l'administration locale cardiaque de la RvD1 peut se faire via le cathéter ou le ballonnet qui dissout le caillot. La voie intraveineuse au

moment de la reperfusion pourrait aussi représenter une avenue thérapeutique intéressante, toutefois elle reste à valider au niveau expérimental.

Enfin, dans le troisième article, la diète riche en ω -3 tend à démontrer une diminution de la mortalité dans les 24 premières heures de reperfusion versus la diète standard. Le protocole 1 de l'article 3 démontre une mortalité de 9% (trois rats de décédés sur 34 rats avec IM), tandis que dans la protocole 2 avec la diète standard, contenant peu d' ω -3, la mortalité y est de 21% (6 rats de décédés sur 29). Bien qu'aucune étude n'ait comparée la mortalité avec notre diète riche en ω -3, ceux-ci tendent à montrer une diminution de la mortalité. La mortalité dans les premières heures de reperfusion est principalement causée par des arythmies ou à des problèmes respiratoires consécutifs de la chirurgie. Les ω -3 ont une action antiarythmique, telle que décrite dans l'introduction, donc ils pourraient diminuer la mortalité par une diminution des arythmies qui causent la mort des rats à la suite de l'IM. Il s'agit là d'une hypothèse et d'autres études seront nécessaires pour la valider. Toutefois, une étude réalisée chez le rat nourri pendant une période de six mois avec une diète riche en ω -6 (10g/100g d'huile de maïs) ou riche en ω -3 (9g/100g d'huile de poisson) après l'IM, démontre une amélioration dans la survie des rats qui se nourrissent d' ω -3 pendant cette période. La diète riche en ω -3 démontre une diminution du ratio ω :6/ ω :3 plasmatique et au niveau du tissu cardiaque après quatre semaines de diète. Ils ont aussi démontré une activité supérieure de la protéine kinase A, de la «*calcium calmodulin-dependent kinase II*» et une diminution de la phosphorylation du récepteur ryanodine. Donc, une diminution de l'accumulation calcique dans la cellule peut expliquer la protection et la survie, le calcium pouvant en partie être à l'origine des arythmies [450]. Toutefois, nous ne pouvons comparer cette étude à la nôtre puisque ce groupe étudie l'effet à long terme des ω -3 à la suite de l'IM, tandis que notre modèle tend à démontrer une amélioration de la survie dans les premières heures de reperfusion avec une diète préventive. Toutefois, un effet antiarythmique impliquant le calcium pourrait aussi être impliqué, les mécanismes doivent être validés dans notre modèle.

9.1.1 Mécanismes impliqués dans la cardioprotection conférée par les oméga-3 et la RvD1

Les résultats des études réalisées avec les ω -3 et ses dérivés laissent à penser que plusieurs voies et mécanismes peuvent être impliqués dans leur action cardioprotectrice. D'abord, une diète riche en ω -3 ou la prise de suppléments d' ω -3 en prévention primaire ou secondaire de maladies cardiovasculaires et d'IM entraînent une diminution du cholestérol, une diminution des triglycérides, une diminution de la pression artérielle, un effet anti-arythmique et un effet anti-inflammatoire. Le tout contribue à une bonne santé cardiovasculaire, donc à une diminution des risques d'IM et, dans le cas d'antécédents cardiovasculaires, une diminution de récurrence et de mort. Du côté expérimental, l'utilisation des ω -3 avant un IM montre une diminution des arythmies, une préservation de la fonction cardiaque, un effet anti-inflammatoire, une préservation du tissu cardiaque et un renforcement des défenses antioxydantes [396, 397, 401, 430, 451]. Toutefois, les études faites avec les ω -3 et leurs dérivés tendent à montrer qu'il pourrait y avoir des effets distincts si la consommation est présente avant l'infarctus ou pendant la reperfusion. Une diète présente avant l'épisode entraîne en effet une diminution des effets délétères de l'ischémie et de la reperfusion, tels que l'accumulation de calcium associés aux arythmies, une augmentation de la biodisponibilité du NO ou une augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes diminuant l'accumulation des radicaux libres, tandis qu'une infusion de DHA pendant la reperfusion ou l'administration des résolvines au moment de l'IM montrent davantage un effet antioxydant, un effet anti-inflammatoire, une diminution de l'apoptose et une action sur la survie cellulaire.

De plus, des études faites dans notre laboratoire tendent à démontrer qu'il y a une dichotomie au niveau de l'effet anti-inflammatoire et au niveau de l'activation de la voie de cardioprotection dans la diminution de la taille de l'infarctus. Dans le cadre de l'IM, les ω -3 activent la voie de cardioprotection RISK, diminuent l'inflammation où les cytokines pro-inflammatoires sont moindres et diminuent l'activation de NF- κ B, l'accumulation des neutrophiles ainsi qu'un marqueur apoptotique de l'inflammation, la caspase-8. Par contre, dans l'étude réalisée avec la RvD1, nous observons qu'à toutes les doses de RvD1,

l'accumulation des neutrophiles est diminuée, de même manière que le facteur NF- κ B. Par contre, la dose inférieure de 0,01 μ g de RvD1 ne diminue pas la taille de l'infarctus. Toutefois, seulement les doses qui diminuent la taille de l'infarctus causent une activation d'Akt, une kinase de la voie de cardioprotection RISK. Dans la troisième étude, l'utilisation des inhibiteurs du métabolisme des ω -3, soit le meloxicam et le PD146176, montre aussi une inhibition de l'activation d'Akt sans toutefois influencer NF- κ B ou l'accumulation des neutrophiles. De ce fait, malgré les multiples effets bénéfiques des ω -3, l'activation de la voie de cardioprotection semble être essentielle pour obtenir la cardioprotection et ainsi diminuer la taille de l'infarctus. Toutefois, plusieurs autres expériences doivent être réalisées afin de comprendre comment la RvD1 ou les ω -3 activent Akt, via leur RCPG. L'hypothèse selon laquelle la RvD1 activerait la voie PI3K/Akt via ses RCPG GPR32 et ALX au niveau des cardiomyocytes doit être validée. Pour ce faire, des expériences *in vitro* pourraient être entreprises sur des cellules cardiaques afin de valider si les cardiomyocytes expriment les récepteurs de la RvD1 et si ceux-ci activent la voie PI3K/Akt via ses récepteurs. Une fois l'expression des récepteurs confirmée et l'activation d'Akt démontrée, l'utilisation de siARN contre les récepteurs, pour empêcher leur expression, permettrait de démontrer si l'effet de la RvD1 passe par ses récepteurs. Le tout amènerait une preuve supplémentaire quant au mécanisme d'action de la RvD1 au moment de la reperfusion.

Enfin, l'effet cardioprotecteur des ω -3 semble provenir de l'action de ses métabolites générés par la 15-LOX et/ou la COX-2. Ceci peut expliquer le fait que la diète riche en ω -3 ou l'EPA et le DHA doivent être donnés plusieurs jours avant l'IM afin de montrer un effet cardioprotecteur. Le troisième article de cette thèse démontre en effet que le fait d'inhiber la 15-LOX et/ou la COX-2 prévient l'effet cardioprotecteur de la diète riche en ω -3 (ratio 1 ω :3 pour 1 ω :6). Nous pouvons donc arriver à la conclusion que les métabolites sont essentiels pour obtenir la cardioprotection. Bien que les concentrations plasmatiques de RvD1 soient diminuées avec les inhibiteurs et que celle-ci restaure la cardioprotection en présence des inhibiteurs, l'implication des autres métabolites n'a pas été étudiée dans cette étude. D'autres expériences étudiant différents métabolites des ω -3 pourraient être envisagés. Comme la

RvE1 est aussi cardioprotectrice, son effet pourrait être comparé dans le même modèle expérimental que celui présenté dans cette thèse. Puis, les autres résolvines de série E et D ainsi que les protectines et lipoxines pourraient aussi être étudiées dans notre modèle d'IM afin de valider si les autres métabolites des ω -3 ont le même effet cardioprotecteur que la RvD1.

9.2 Divergence des études sur l'effet des oméga-3

Plusieurs études réalisées chez le patient n'ont pas montré d'effets bénéfiques cardiovasculaires avec les ω -3. La méta-analyse parue dans JAMA en 2012, rapportant les résultats de 20 études avec 68 680 patients, n'a pas démontré d'effets des suppléments d' ω -3 sur un risque diminué de mortalité toutes causes, de morts cardiaques, de morts subites ou d'IM [415]. Toutefois, pour évaluer l'effet des ω -3, plusieurs éléments doivent être pris en considération.

D'abord, un point important à considérer est l'oubli de mentionner et de tenir compte de l'apport en ω -6 des patients étudiés. À titre d'exemple, une étude réalisée dans les Pays-Bas, en 2010, chez des patients ayant subi un IM et qui ont reçu de l'EPA (226mg/jour) et du DHA (150mg/jour) avec ou sans de l'ALA (1.9g/jour), à travers une margarine supplémentée en ω -3, n'a pas montré d'effets bénéfiques sur la prévalence de récurrences cardiovasculaires [416]. Toutefois, ces patients consommaient 18.8g de margarine tous les jours pour obtenir leur ω -3, mais il est à considérer que la margarine contient 40% de LA, un ω -6. De plus, il n'est pas considéré, dans cette étude comme dans plusieurs autres, l'alimentation des patients dans laquelle l'apport en ω -6 ainsi que les AG, ce qui pourrait expliquer le peu d'effets cardiovasculaires observés. Dans le laboratoire, nous avons clairement établi que le ratio est essentiel à considérer pour observer un effet cardioprotecteur lors de l'IM. Une diète contenant un ratio ω -3: ω -6 de 1:1 a un effet cardioprotecteur tandis qu'une diète de 1:5 n'en a pas. Inversement, un ratio de 5:1 ne montre pas d'effets davantage bénéfiques que la diète 1:1. Donc, une diète présentant cinq fois plus d' ω -6 que d' ω -3 voit déjà son effet cardiovasculaire dans l'IM grandement diminué chez le rat [230].

De plus, avec la RvD1, la question se posait à savoir si la présence des ω -6 pouvait empêcher son effet. C'est ce qui a été observé dans le deuxième article présenté dans cette thèse. Nous avons utilisé LA plutôt que l'AA, principal ω -6 métabolisé en ses métabolites inflammatoires et vasoconstricteurs, afin de diminuer la réactivité de l'arrivée massive de ses métabolites issus de l'AA au moment de l'ischémie et de la reperfusion. Les prostaglandines et leucotriènes issus de l'AA sont des médiateurs impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires. Ils sont relâchés par la PLA₂ en cas de stimuli inflammatoires et exacerbent la réponse inflammatoire. Les médiateurs sont relâchés par les granulocytes, les macrophages, les plaquettes, les mastocytes et les cellules endothéliales. Ils causent l'inflammation (PGH₂), une vasoconstriction (LT), une agrégation plaquettaire (TXA₂), un effet chémoattractant (LTB₄) et influence la perméabilité vasculaire (LT). Ils sont donc à l'origine de plusieurs maladies inflammatoires comme les allergies et l'asthme, et accélèrent le processus de la maladie dans le cadre des maladies auto-immunes [452]. De ce fait, LA a été utilisée afin de diminuer la réponse rapide de ces médiateurs qui peuvent rapidement exacerber les dommages reliés à l'ischémie et à la reperfusion. Toutefois, LA a tout de même empêché l'effet de cardioprotection de la RvD1, non pas en empêchant la RvD1 d'agir au moment de la reperfusion en activant la voie de cardioprotection ou en permettant la résolution de l'inflammation, mais en augmentant la réponse de l'ischémie. L'hypothèse est donc que LA génère aussi les médiateurs prostaglandines et leucotriènes issus des ω -6, ce qui cause une vasoconstriction des coronaires, une agrégation plaquettaire et donc augmente l'effet de l'ischémie sur les cellules avoisinantes et augmente ainsi la taille de l'infarctus. Il est donc impératif de tenir compte de l'apport en ω -6 chez les patients avant de penser à ajouter la RvD1 ou les ω -3 et surtout d'en tenir compte dans les études afin de valider l'effet des ω -3.

D'autres études sont nécessaires afin de valider l'effet nocif des ω -6 sur l'ischémie et la reperfusion. Nous avons essayé, sans succès, de mesurer le débit coronarien, toutefois la méthode utilisée a généré de grande variabilité entre les groupes. Doser les leucotriènes et prostaglandines provenant des ω -6 au niveau du coeur et du plasma pourrait aussi donner une idée de leur implication négative pendant l'ischémie. De plus, valider le profil des AG présents

afin de voir si l'effet semble provenir de LA ou de ses métabolites pourrait s'avérer intéressant. D'un point de vue plus clinique, valider si la RvD1 conserve son effet en présence d'une diète riche en ω -6 plutôt que via l'injection d'un ω -6 pourrait aussi être intéressant. Une telle étude utilisant différents ratios ω -3: ω -6, par exemple soit 1:1, 1:5 observé chez les Japonais ou dans la diète méditerranéenne versus 1:15 à 20 représentant une diète nord-américaine, avec la RvD1 donnée au moment de l'IM, pourrait valider si celle-ci perd son effet en présence d'un apport élevé en ω -6. De plus, il serait intéressant de voir si en augmentant son dosage, l'effet cardioprotecteur de la RvD1 serait à nouveau obtenu.

Une étude parue en 2009 dans *Circulation* par le groupe de Harris tend à montrer des effets bénéfiques des ω -6 sur les maladies cardiovasculaires [453]. L'AA conduit à la production de métabolites pro-inflammatoires, vasoconstricteurs et pro-agrégants, toutefois l'AA conduit aussi à la formation de la prostacycline (vasodilatatrice), de la LXA4 (impliquée dans la résolution de l'inflammation) et de l'acide époxyeicosatriénoïque via le cytochrome P450 époxygénase. Ce dernier est un composé vasodilatateur. De ce fait, les ω -6 ne sont pas que délétères. À titre d'exemple, ce groupe cite un article démontrant que les ω -6, plus précisément l'AA, inhibe l'expression de molécules d'adhésions, comme VCAM-1, dans des cellules endothéliales vasculaires. En effet, cet article compare des gras polyinsaturés (ω -3 et ω -6) à des gras saturés et mononinsaturés. Les gras sans ou avec une insaturation ne montrent pas d'effet sur les molécules d'adhésions, tandis que les gras polyinsaturés diminuent leur expression. Par contre, l'efficacité des ω -3 (EPA et DHA) est supérieure à l'AA pour inhiber VCAM-1. De plus, l'étude est réalisée sur des cellules seulement, où il n'y a pas la présence en surabondance d' ω -6. On ne peut donc pas arriver à la conclusion, à travers cette étude, qu'un apport élevé en ω -6 est bon pour la santé cardiovasculaire, d'autant plus que les ω -3 ont montré une efficacité supérieure à l'AA [454]. Le groupe cite aussi deux articles montrant que des suppléments d'AA n'altèrent pas l'inflammation ni la fonction plaquettaire. Toutefois, dans la première étude, il est indiqué que l'AA, avec des niveaux élevés de DHA, est associée à une diminution de la réponse pro-inflammatoire et à une augmentation des cytokines anti-inflammatoires [383]. Le second article réalisé chez des patients en santé consommant une

huile enrichie en AA, mais qui consomme du poisson et de l'huile de poisson de façon journalière, ne montre pas d'effet sur la réponse plaquettaire [455]. La conclusion est donc qu'un ratio équilibré ω -6/ ω -3 est l'idéal pour préserver une bonne santé cardiovasculaire. Une étude montre qu'une diète riche en AG polyinsaturés, dont LA, versus une diète riche en gras saturés diminue la sensibilité à l'insuline et possiblement l'incidence de diabète [456]. Une autre étude tend à montrer qu'une alimentation élevée en LA ne montre pas d'incidence supérieure d'IM [457]. *L'American Heart Association* recommande un apport journalier de 17g de LA par jour pour les hommes et de 12g/jour pour les femmes, ce qui correspond à environ 7% de l'énergie consommée par jour. Toutefois, l'apport en LA doit représenter 80 à 90% des ω -6 consommés avec moins de 0,15g d'AA consommé par jour. C'est sans doute là où est le problème des américains, qui consomment davantage de graisse animale (riche en AA) que d'huiles végétales et de noix (LA) [453]. De plus, la conversion de LA en AA est minime, de 0,2%, ce qui génère peu de métabolites issus de l'AA, lorsque LA est consommé à travers l'alimentation [458]. Donc, il ne s'agit pas d'éliminer les ω -6 de l'alimentation, LA et même AA ont leurs actions biologiques distinctes. Une consommation en AA est recommandée dans une alimentation équilibrée, mais en des quantités raisonnables. Une consommation en LA est essentielle puisqu'il s'agit d'un AG essentiel, mais il faut le consommer à travers de bonnes sources végétales, comme à travers les huiles non transformées telles que l'huile d'olive et l'huile d'avocat et non pas à travers les huiles transformées comme l'huile de maïs, l'huile de canola ou les gras hydrogénés qui sont néfastes pour la santé. Il faut donc bien choisir ses gras polyinsaturés, consommer davantage d' ω -3 qui semble manquer dans la diète nord-américaine et bien équilibrer le tout.

Outre les ω -6, les études cliniques réalisées avec les ω -3 ne prennent pas ou peu en considération la prise de médicaments chez les patients. Les inhibiteurs de COX font partie d'une classe de médicaments assez commune, et ils interfèrent avec le métabolisme des ω -3, prévenant leur action tel que décrit dans le troisième article. D'autres médicaments pourraient aussi interférer avec l'effet des ω -3. Dans l'étude citée précédemment avec l'EPA, le DHA et l'ALA donnée avec une margarine enrichie en ω -3, la prise de statine était présente chez 86%

des patients. Puis, lorsque les patients consommant des statines sont retirés, l'effet des ω -3 est restaurée, d'où une diminution des événements cardiovasculaires et de récives d'IM [416, 459]. Toutefois, la prise de statine combinée à l'EPA montre des effets bénéfiques chez des patients hypercholestérolémiques [444] et sur une amélioration de la dysfonction endothéliale chez les patients avec maladies coronariennes [460]. Comme les statines agissent à de nombreux niveaux, ses effets peuvent parfois s'additionner à l'EPA ou au contraire parfois prévenir l'effet des ω -3. Donc, la prise de médicaments pouvant interférer avec le métabolisme des ω -3 est aussi à prendre en considération dans les études cliniques effectuées avec ces AG, certains effets pourraient être masqués.

Puis, la quantité d' ω -3 ingérée et le temps de traitement doivent être au dessus d'un certain seuil pour voir les effets de ces AG essentiels, ce qui peut parfois expliquer les études où on ne voit pas d'effets positifs des ω -3. Pour une baisse de cholestérol et de triglycérides plasmatiques, les études réalisées chez les patients montrent qu'il faut de trois à quatre grammes d'EPA et de DHA quotidiennement pendant un minimum de sept à huit semaines pour voir l'effet [396, 397]. Au niveau de la pression artérielle, une étude démontre une baisse de celle-ci chez des patients avec un surplus de poids ayant consommé 3,6g d' ω -3 par jour pendant 16 semaines [404]. Une autre étude démontre un effet avec 3,4g d'EPA et de DHA combiné par jour pendant deux mois [406]. Une méta-analyse conclut qu'il faut un minimum de deux semaines de suppléments d' ω -3 à des doses autour de trois à quatre grammes par jour pour voir un effet sur la pression artérielle, les études avec 0,5g d' ω -3 et moins ne montrent pas d'effet [405]. Avec l'IM, l'étude GISSI étudie l'effet de suppléments de 1g/jour pendant de 3 à 5 ans sur les récives cardiovasculaires et la mortalité toutes causes. Dans l'étude DART, c'est un apport alimentaire de deux portions de poisson supplémentaires par semaine qui est étudié. Il faut toutefois se rappeler que dans cette étude, les patients ont à la base une alimentation de type méditerranéenne donc pauvre en gras. Dans une étude réalisée avec des patients présentant une maladie coronarienne, un apport de 6g/jour d' ω -3 pendant trois mois, suivi de 3g/jour pendant 21 mois, a montré une diminution modérée de la progression des plaques athéromateuses [410]. Chez les patients avec IM, il est difficile d'évaluer la

consommation précédant un tel événement, bien qu'une consommation élevée de poisson soit associée à des tailles de l'infarctus plus petites [424, 425]. Une étude publiée récemment a démontré chez le rat qu'une supplémentation chronique pendant huit semaines de 0.6g/kg/jour et de 1.2g/kg/jour diminue la taille de l'infarctus via le renforcement des défenses antioxydantes [451]. Enfin les recommandations des nutritionnistes et de Santé Canada encouragent, selon les études, un apport de 500mg à un gramme par jour chez l'adulte sain ou encore de deux à trois repas de poissons gras par semaine pour préserver une bonne santé cardiovasculaire, mais un apport d'un minimum de deux à quatre grammes par jour chez les patients avec antécédents de maladies cardiovasculaires [461]. Ces recommandations sont toutefois une indication seulement. Il ne s'agit donc pas d'une science exacte, mais plutôt des lignes directrices pour se guider dans l'apport quotidien des ω -3 suggérés. De ce fait, il faut aussi en tenir compte dans les études qui utilisent les suppléments d' ω -3 chez les patients avec antécédents de maladies cardiovasculaires. L'apport en ω -3 utilisé dans nos études avec la diète riche en ω -3 qui a démontré un effet de cardioprotection chez le rat, sans antécédent, est de 1.2g/jour avec un apport équivalent en ω -6. La durée du traitement devait être d'au moins 10 jours pour voir l'effet de cardioprotection (article 3 de cette thèse, [230]). Puis, un apport suffisant d' ω -3 permet d'obtenir des quantités plasmatiques de RvD1 associées à des effets biologiques de résolution de l'inflammation. Des suppléments de 4g/jour d' ω -3 pendant trois semaines ont montré des niveaux de RvD1 (17S-RvD1) de 31 pg/ml et de AT-RvD1 (17R-RvD1) de 161 pg/ml. Le tout confirmant qu'il faut un apport suffisant en ω -3 pour avoir les effets bénéfiques cardiovasculaires [331]. Nous avons, dans notre modèle, des niveaux plasmatiques de RvD1 (17S-RvD1) d'environ 150 pg/ml avec notre diète riche en ω -3, tel que mentionné dans le troisième article.

Finalement, les quantités et le ratio d'EPA et de DHA à prendre selon les besoins ne sont pas encore établis. Rien n'indique que l'un ou l'autre de ces AG soit davantage bénéfique pour les maladies cardiovasculaires, d'autres investigations doivent être faites à ce niveau [462].

9.3 Effets des ω -3 et de la RvD1 sur les complications reliées à l'IM

À la suite d'un IM, la prise d' ω -3 prévient d'autres problèmes que ceux reliés au système cardiovasculaire. L'IM génère une période inflammatoire qui s'étend de façon systémique à travers le corps ce qui peut entraîner d'autres dommages comme au niveau du rein et du cerveau. Une étude, utilisant la margarine enrichie en EPA et DHA à raison de 400mg/jour et de 2g d'ALA/jour pendant 40 mois, montre une diminution du déclin de la fonction rénale démontrée par une diminution de l'élimination de la créatinine-cystatine-C [463]. De plus, une complication importante survenant après l'IM est l'apparition de symptômes de dépression et de dépression majeure [464, 465], d'autant plus que celle-ci augmente le risque de mortalité chez les patients à la suite de l'IM [466]. Notre laboratoire a démontré de l'apoptose qui survient dans des régions du système limbique à la suite de l'IM [114, 467]. Aussi, des symptômes s'apparentant à la dépression s'observent dans notre modèle à la suite de l'IM [468]. L'hypothèse est que l'inflammation générée par l'IM conduit à de la mort par apoptose dans des régions du cerveau causant ainsi des symptômes de dépression. Ainsi, bloquer la réponse inflammatoire qui devient chronique à l'aide des ω -3 s'avère bénéfique pour contrer les symptômes de dépression. Nous avons effectivement démontré que la diète riche en ω -3 diminuait les symptômes de dépression dans trois tests de comportements utilisés dans la dépression chez le rat, lorsque consommée deux semaines avant l'IM [469]. Récemment, nous avons démontré que la RvD1, donnée une seule fois au moment de l'ischémie ou de la reperfusion, prévenait aussi l'apparition des symptômes de dépression [448]. La RvD1 pourrait empêcher l'inflammation de devenir exagérée ou chronique et ainsi empêcher de causer l'apparition des symptômes dépressifs. En plus d'être cardioprotectrice, la RvD1 pourrait prévenir l'apparition de la dépression chez les patients avec IM.

Il serait donc recommandé, selon les résultats présentés dans cette thèse et selon la littérature, de consommer un apport suffisant en ω -3 afin de préserver une bonne santé cardiovasculaire tout en diminuant, sans l'éliminer complètement, l'apport en ω -6. Il s'agit d'équilibrer la consommation en AG polyinsaturés. Il serait par ailleurs bénéfique de consommer les ω -3 et plus précisément les métabolites, tels que la RvD1, dans le cadre de

pathologies inflammatoires afin d'encourager la résolution de l'inflammation. Enfin, lors de l'IM, l'utilisation de la RvD1 pourrait s'avérer hautement bénéfique en diminuant les lésions cardiaques, en protégeant le cœur et en empêchant de développer une réponse inflammatoire chronique qui peut causer des dommages systémiques comme au cerveau et au rein, sans toutefois empêcher la réponse inflammatoire initiale de s'installer pour permettre la récupération de l'ischémie et de la reperfusion. Les métabolites des ω -3 auraient avantage à être étudiés du côté clinique. Ils pourraient avoir un effet thérapeutique au moment de la pathologie et non pas seulement en prévention primaire ou secondaire. Il faudrait s'assurer si la RvD1 conserve son effet lorsque donné de manière intra-veineuse afin de l'administrer plus facilement en clinique. Par contre, il serait possible de la donner localement lors de l'insertion du cathéter et du ballonnet pour éliminer le caillot comme démontré chez le porc lors de la reperfusion dans l'IM.

Conclusion générale

Les ω -3 permettent de diminuer la taille de l'infarctus et sont cardioprotecteurs lorsque consommés avant l'IM. La RvD1, un métabolite impliqué dans la résolution de l'inflammation et issu de l' ω -3 DHA, permet de diminuer la taille de l'infarctus lorsque donné au moment de l'épisode. La RvD1 représente donc une option thérapeutique intéressante. La RvD1 se montre cardioprotectrice par la résolution de l'inflammation, en empêchant la période inflammatoire de devenir chronique, et en activant la voie de cardioprotection RISK via la voie PI3K/Akt.

La considération des ω -6 est essentiel dans un traitement utilisant les ω -3 et ses dérivés. L'action cardioprotectrice de la RvD1 est atténuée par LA, un ω -6, donné ensemble pendant l'IM. LA n'empêche pas la RvD1 d'activer Akt ni de diminuer l'inflammation, toutefois les lésions ischémiques semblent plus nombreuses en présence de LA, empêchant ainsi aux cellules d'être sauvées par la RvD1 au moment de la reperfusion. Le ratio ω -3: ω -6 est donc à prendre en considération dans les études, mais aussi lorsqu'il est question de

traitement avec les ω -3 ou la RvD1 chez le patient. Le ratio idéal à consommer est une diète d'un ω -3 pour un ω -6.

Finalement, les métabolites issus des ω -3 semblent être essentiels pour que les ω -3 confèrent leur cardioprotection. L'inhibition de la 15-LOX et/ou de la COX-2 prévient l'effet d'une diète riche en ω -3, dans laquelle les concentrations de RvD1 et l'activation d'Akt se voient aussi diminuées. Donc, les métabolites des ω -3 activent la voie de cardioprotection RISK par la voie PI3K/Akt et diminuent ainsi la taille de l'infarctus.

Une consommation élevée en ω -3 et une diminution des ω -6 est donc à privilégier pour préserver une bonne santé cardiovasculaire. Dans le cas où il y a des antécédents de maladies cardiovasculaires, un apport élevé en ω -3, au détriment des ω -6, avec l'ajout de suppléments peut s'avérer hautement bénéfique.

Bibliographie

1. Anversa, P. and E.H. Sonnenblick, *Ischemic cardiomyopathy: pathophysiologic mechanisms*. Prog Cardiovasc Dis, 1990. **33**(1): p. 49-70.
2. Kumar, A. and C.P. Cannon, *Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I*. Mayo Clin Proc, 2009. **84**(10): p. 917-38.
3. White, H.D. and D.P. Chew, *Acute myocardial infarction*. Lancet, 2008. **372**(9638): p. 570-84.
4. l'AVC, F.d.m.d.c.e.d. *Statistiques 2011*. 2011; Available from: <http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.3562179/k.9FCD/Statistiques.htm>.
5. Thygesen, K., J.S. Alpert, and H.D. White, *Universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2007. **28**(20): p. 2525-38.
6. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, *Lethal myocardial ischemic injury*. Am J Pathol, 1981. **102**(2): p. 241-55.
7. Kost, G.J., J.D. Kirk, and K. Omand, *A strategy for the use of cardiac injury markers (troponin I and T, creatine kinase-MB mass and isoforms, and myoglobin) in the diagnosis of acute myocardial infarction*. Arch Pathol Lab Med, 1998. **122**(3): p. 245-51.
8. Saenger, A.K. and A.S. Jaffe, *The use of biomarkers for the evaluation and treatment of patients with acute coronary syndromes*. Med Clin North Am, 2007. **91**(4): p. 657-81; xi.
9. Nallamothu, B.K. and E.R. Bates, *Percutaneous coronary intervention versus fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction: is timing (almost) everything?* Am J Cardiol, 2003. **92**(7): p. 824-6.
10. Alpen, ed. *Prévenir et guérir l'infarctus*. ed. D.M. Serrand. 2013.
11. Serruys, P.W., et al., *Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease*. N Engl J Med, 2009. **360**(10): p. 961-72.
12. Dusting, G.J., et al., *Prostacyclin (PGI₂) induces coronary vasodilatation in anaesthetised dogs*. Cardiovasc Res, 1978. **12**(12): p. 720-30.
13. Nishikawa, Y., *Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart*. Circulation, 1997. **96**(8): p. 2735-6.
14. Ardehali, A. and T.A. Ports, *Myocardial oxygen supply and demand*. Chest, 1990. **98**(3): p. 699-705.
15. Schomig, A. and G. Richardt, *Cardiac sympathetic activity in myocardial ischemia: release and effects of noradrenaline*. Basic Res Cardiol, 1990. **85 Suppl 1**: p. 9-30.
16. Boersma, E., et al., *Acute myocardial infarction*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 847-58.
17. Donald Voet, J.G.V., *Biochimie*, ed. D.B. Supérieur. 2005, Louvain-la-Neuve. 1600.
18. Ruiz-Meana, M. and D. Garcia-Dorado, *Translational cardiovascular medicine (II). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction*. Rev Esp Cardiol, 2009. **62**(2): p. 199-209.
19. Yellon, D.J.H.a.D.M., *Therapeutics approaches to myocardial infarct size limitation*, ed. R. Press. 1984, New York. 272.

20. Jennings, R.B., et al., *Development of cell injury in sustained acute ischemia*. *Circulation*, 1990. **82**(3 Suppl): p. II2-12.
21. Jennings, R.B., *Acute myocardial ischemic injury. Ultrastructural and biochemical studies of the early phase of lethal injury*. *Arch Inst Cardiol Mex*, 1980. **50**(3): p. 365-71.
22. Reimer, K.A., R.B. Jennings, and A.H. Tatum, *Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies*. *Am J Cardiol*, 1983. **52**(2): p. 72A-81A.
23. Konstantinidis, K., R.S. Whelan, and R.N. Kitsis, *Mechanisms of cell death in heart disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(7): p. 1552-62.
24. Lowe, J.E., K.A. Reimer, and R.B. Jennings, *Experimental infarct size as a function of the amount of myocardium at risk*. *Am J Pathol*, 1978. **90**(2): p. 363-79.
25. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. I. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. *Circulation*, 1977. **56**(5): p. 786-94.
26. Reimer, K.A. and R.B. Jennings, *The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow*. *Lab Invest*, 1979. **40**(6): p. 633-44.
27. Metzger, J.P., et al., [*Coronary collateral circulation. Anatomic pathways and functional significance*]. *Nouv Presse Med*, 1975. **4**(38): p. 2719-22.
28. Miwa, K., et al., *Absence of myocardial ischemia during sudden controlled occlusion of coronary arteries in patients with well-developed collateral vessels*. *Coron Artery Dis*, 1999. **10**(7): p. 459-63.
29. Zuurbier, C.J., et al., *Cardioprotective efficacy depends critically on pharmacological dose, duration of ischaemia, health status of animals and choice of anaesthetic regimen: a case study with folic acid*. *J Transl Med*, 2014. **12**(1): p. 325.
30. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
31. de Lorgeril, M., et al., *Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium*. *Am J Cardiovasc Pathol*, 1990. **3**(2): p. 143-54.
32. Jennings, R.B., et al., *Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure*. *Circ Res*, 1985. **56**(2): p. 262-78.
33. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. *Arch Pathol*, 1960. **70**: p. 68-78.
34. Eefting, F., et al., *Role of apoptosis in reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 414-26.
35. Ma, S., et al., *The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Biochim Biophys Acta*, 2014.
36. Galasso, G., et al., *No-reflow phenomenon: pathophysiology, diagnosis, prevention, and treatment. A review of the current literature and future perspectives*. *Angiology*, 2014. **65**(3): p. 180-9.
37. Rezkalla, S.H. and R.A. Kloner, *No-reflow phenomenon*. *Circulation*, 2002. **105**(5): p. 656-62.

38. Golino, P., P.R. Maroko, and T.E. Carew, *Efficacy of platelet depletion in counteracting the detrimental effect of acute hypercholesterolemia on infarct size and the no-reflow phenomenon in rabbits undergoing coronary artery occlusion-reperfusion*. *Circulation*, 1987. **76**(1): p. 173-80.
39. Douglas, B., et al., *Beneficial effects of ibuprofen on experimental microvascular free flaps: pharmacologic alteration of the no-reflow phenomenon*. *Plast Reconstr Surg*, 1987. **79**(3): p. 366-74.
40. Hataya, Y., et al., *Retrograde intra-arterial infusion of prostaglandin E1 and heparin for the no-reflow phenomenon after oromandibular reconstruction with a free fibular flap*. *Ann Plast Surg*, 1999. **42**(1): p. 92-5.
41. Calhoun, K.H., L. Tan, and H. Seikaly, *An integrated theory of the no-reflow phenomenon and the beneficial effect of vascular washout on no-reflow*. *Laryngoscope*, 1999. **109**(4): p. 528-35.
42. Montalescot, G., et al., *Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with coronary stenting for acute myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(25): p. 1895-903.
43. Galiuto, L., et al., *Ischemia-reperfusion injury at the microvascular level: treatment by endothelin A-selective antagonist and evaluation by myocardial contrast echocardiography*. *Circulation*, 2000. **102**(25): p. 3111-6.
44. Golino, P., et al., *Recombinant human, active site-blocked factor VIIa reduces infarct size and no-reflow phenomenon in rabbits*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(5): p. H1507-16.
45. Taniyama, Y., et al., *Beneficial effect of intracoronary verapamil on microvascular and myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 1997. **30**(5): p. 1193-9.
46. Grygier, M., et al., *Role of adenosine as an adjunct therapy in the prevention and treatment of no-reflow phenomenon in acute myocardial infarction with ST segment elevation: review of the current data*. *Kardiol Pol*, 2013. **71**(2): p. 115-20.
47. Marzilli, M., et al., *Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction*. *Circulation*, 2000. **101**(18): p. 2154-9.
48. Heyndrickx, G.R., et al., *Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs*. *J Clin Invest*, 1975. **56**(4): p. 978-85.
49. Kim, S.J., C. Depre, and S.F. Vatner, *Novel mechanisms mediating stunned myocardium*. *Heart Fail Rev*, 2003. **8**(2): p. 143-53.
50. du Toit, E.F. and L.H. Opie, *Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion*. *Circ Res*, 1992. **70**(5): p. 960-7.
51. Kleinbongard, P., T. Baars, and G. Heusch, *Calcium antagonists in myocardial ischemia/reperfusion--update 2012*. *Wien Med Wochenschr*, 2012. **162**(13-14): p. 302-10.
52. Heyndrickx, G.R., *Myocardial stunning: an experimental act with a large clinical audience*. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2003. **96**(6): p. 665-70.
53. Bolli, R., *Mechanism of myocardial "stunning"*. *Circulation*, 1990. **82**(3): p. 723-38.

54. Przyklenk, K. and R.A. Kloner, *Effect of verapamil on postischemic "stunned" myocardium: importance of the timing of treatment*. J Am Coll Cardiol, 1988. **11**(3): p. 614-23.
55. Taylor, A.L., et al., *Differential enhancement of postischemic segmental systolic thickening by diltiazem*. J Am Coll Cardiol, 1990. **15**(3): p. 737-47.
56. Myers, M.L., et al., *Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia*. Circulation, 1985. **72**(4): p. 915-21.
57. Bolli, R., et al., *Attenuation of dysfunction in the postischemic 'stunned' myocardium by dimethylthiourea*. Circulation, 1987. **76**(2): p. 458-68.
58. Osmancik, P.P., P. Stros, and D. Herman, *In-hospital arrhythmias in patients with acute myocardial infarction - the relation to the reperfusion strategy and their prognostic impact*. Acute Card Care, 2008. **10**(1): p. 15-25.
59. Curtis, M.J. and D.J. Hearse, *Ischaemia-induced and reperfusion-induced arrhythmias differ in their sensitivity to potassium: implications for mechanisms of initiation and maintenance of ventricular fibrillation*. J Mol Cell Cardiol, 1989. **21**(1): p. 21-40.
60. Manning, A.S. and D.J. Hearse, *Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention*. J Mol Cell Cardiol, 1984. **16**(6): p. 497-518.
61. Verrier, R.L. and E.L. Hagestad, *Mechanisms involved in reperfusion arrhythmias*. Eur Heart J, 1986. **7 Suppl A**: p. 13-22.
62. Garcia-Dorado, D., et al., *Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 168-80.
63. Trump, B.F., et al., *The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis*. Toxicol Pathol, 1997. **25**(1): p. 82-8.
64. Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck, *Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis*. Anat Histol Embryol, 2002. **31**(4): p. 214-23.
65. Przyklenk, K., et al., *Autophagy as a therapeutic target for ischaemia /reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 197-205.
66. Kanamori, H., et al., *Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(6): p. H2261-71.
67. Raedschelders, K., D.M. Ansley, and D.D. Chen, *The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion*. Pharmacol Ther, 2012. **133**(2): p. 230-55.
68. Becker, L.B., *New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 461-70.
69. Venardos, K.M., et al., *Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review*. Curr Med Chem, 2007. **14**(14): p. 1539-49.
70. Jolly, S.R., et al., *Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase*. Circ Res, 1984. **54**(3): p. 277-85.
71. Miura, T., et al., *Effect of superoxide dismutase plus catalase on myocardial infarct size in rabbits*. Can J Cardiol, 1988. **4**(8): p. 407-11.
72. Downey JM, Y.D., *Do free radicals contribute to myocardial cell death during ischemia-reperfusion?* New York:Raven Press, 1992: p. 35-37.

73. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
74. Opie, L.H., *Role of calcium and other ions in reperfusion injury*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1991. **5 Suppl 2**: p. 237-47.
75. Hernando, V., et al., *Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. **49**(2): p. 271-9.
76. Kloner, R.A. and E. Braunwald, *Effects of calcium antagonists on infarcting myocardium*. *Am J Cardiol*, 1987. **59**(3): p. 84B-94B.
77. Piot, C., et al., *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(5): p. 473-81.
78. Carden, D.L. and D.N. Granger, *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury*. *J Pathol*, 2000. **190**(3): p. 255-66.
79. Mombouli, J.V. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: from physiology to therapy*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **31**(1): p. 61-74.
80. Harrison, D.G., *Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(9): p. 2153-7.
81. Kubes, P. and D.N. Granger, *Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells*. *Cardiovasc Res*, 1996. **32**(4): p. 699-708.
82. Granger, H.J., *Cardiovascular physiology in the twentieth century: great strides and missed opportunities*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(6 Pt 2): p. H1925-36.
83. Smith, E.F., 3rd, et al., *Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury*. *Am J Physiol*, 1988. **255**(5 Pt 2): p. H1060-8.
84. Baxter, G.F., *The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on*. *Basic Res Cardiol*, 2002. **97**(4): p. 268-75.
85. Hawkins, H.K., et al., *Acute inflammatory reaction after myocardial ischemic injury and reperfusion. Development and use of a neutrophil-specific antibody*. *Am J Pathol*, 1996. **148**(6): p. 1957-69.
86. Di Filippo, C., F. Rossi, and M. D'Amico, *Targeting polymorphonuclear leukocytes in acute myocardial infarction*. *ScientificWorldJournal*, 2007. **7**: p. 121-34.
87. Granger, D.N., *Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury*. *Am J Physiol*, 1988. **255**(6 Pt 2): p. H1269-75.
88. Kurose, I., et al., *Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage*. *Circ Res*, 1994. **74**(2): p. 336-43.
89. Grisham, M.B., D.N. Granger, and D.J. Lefler, *Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **25**(4-5): p. 404-33.
90. Carbone, F., et al., *Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction*. *Thromb Haemost*, 2013. **110**(3): p. 501-14.
91. Williams, F.M., *Neutrophils and myocardial reperfusion injury*. *Pharmacol Ther*, 1996. **72**(1): p. 1-12.
92. Romson, J.L., et al., *Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog*. *Circulation*, 1983. **67**(5): p. 1016-23.
93. de Lorgeril, M., et al., *Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs*. *Am Heart J*, 1989. **117**(3): p. 523-32.

94. Cassatella, M.A., S. Gasperini, and M.P. Russo, *Cytokine expression and release by neutrophils*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **832**: p. 233-42.
95. Rossen, R.D., et al., *Mechanism of complement activation after coronary artery occlusion: evidence that myocardial ischemia in dogs causes release of constituents of myocardial subcellular origin that complex with human C1q in vivo*. Circ Res, 1988. **62**(3): p. 572-84.
96. Yasojima, K., et al., *Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction*. Circ Res, 1998. **83**(8): p. 860-9.
97. Yasuda, M., et al., *The complement system in the acute phase of myocardial infarction*. Jpn Circ J, 1989. **53**(9): p. 1017-22.
98. Diepenhorst, G.M., T.M. van Gulik, and C.E. Hack, *Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies*. Ann Surg, 2009. **249**(6): p. 889-99.
99. Weisman, H.F., et al., *Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis*. Science, 1990. **249**(4965): p. 146-51.
100. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
101. Stancovski, I. and D. Baltimore, *NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed?* Cell, 1997. **91**(3): p. 299-302.
102. Moss, N.C., et al., *IKKbeta inhibition attenuates myocardial injury and dysfunction following acute ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(4): p. H2248-53.
103. Misra, A., et al., *Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction*. Circulation, 2003. **108**(25): p. 3075-8.
104. Herskowitz, A., et al., *Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium*. Am J Pathol, 1995. **146**(2): p. 419-28.
105. Frangogiannis, N.G., et al., *Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(12): p. 2567-76.
106. Sun, M., et al., *Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction*. Circulation, 2004. **110**(20): p. 3221-8.
107. Berthonneche, C., et al., *New insights into the pathological role of TNF-alpha in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure after infarction in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(1): p. H340-50.
108. T. Tran Quang, G.R., A. Gosselin, E. Schampeart, T. Charron, *TNF-alpha induces ischemic preconditioning in porcine myocardial infarction model*. Canadian Journal of Cardiology, 2011. **27**(5): p. 493.
109. Monden, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H743-53.
110. Heba G1, K.T., Porc M, Grzyb J, Dembińska-Kieć A, *Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats*. J Physiol Pharmacol. , 2001. **52**(1): p. 39-52.

111. Kanda, T. and T. Takahashi, *Interleukin-6 and cardiovascular diseases*. Jpn Heart J, 2004. **45**(2): p. 183-93.
112. Arstall, M.A., et al., *Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation*. Circ Res, 1999. **85**(9): p. 829-40.
113. Kaloustian, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction*. Apoptosis, 2009. **14**(11): p. 1308-16.
114. Wann, B.P., et al., *Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat*. Biol Psychiatry, 2006. **59**(5): p. 430-3.
115. Rock, K.L. and H. Kono, *The inflammatory response to cell death*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 99-126.
116. Arseneault-Breard, J., et al., *Combination of Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model*. Br J Nutr, 2012. **107**(12): p. 1793-9.
117. Massberg, S., et al., *A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 41-9.
118. Massberg, S., C. Schulz, and M. Gawaz, *Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome*. Semin Vasc Med, 2003. **3**(2): p. 147-62.
119. Hawrylowicz, C.M., G.L. Howells, and M. Feldmann, *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 785-90.
120. von Hundelshausen, P., et al., *RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium*. Circulation, 2001. **103**(13): p. 1772-7.
121. Gardiner, E.E., et al., *Regulation of P-selectin binding to the neutrophil P-selectin counter-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 by neutrophil elastase and cathepsin G*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1440-7.
122. Kupatt, C., et al., *c7E3Fab reduces postischemic leukocyte-thrombocyte interaction mediated by fibrinogen. Implications for myocardial reperfusion injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(10): p. 2226-32.
123. Choudhri, T.F., et al., *Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation*. J Clin Invest, 1998. **102**(7): p. 1301-10.
124. Mullane, K.M. and J.C. McGiff, *Platelet depletion and infarct size in an occlusion-reperfusion model of myocardial ischemia in anesthetized dogs*. J Cardiovasc Pharmacol, 1985. **7**(4): p. 733-8.
125. Yang, B.C., D.S. Zander, and J.L. Mehta, *Hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in cultured adult rat myocytes and the protective effect of platelets and transforming growth factor-beta(1)*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(2): p. 733-8.
126. Rousseau, G., et al., *Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs*. Am Heart J, 1993. **125**(6): p. 1553-63.

127. Neumann, F.J., et al., *Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on recovery of coronary flow and left ventricular function after the placement of coronary-artery stents in acute myocardial infarction*. *Circulation*, 1998. **98**(24): p. 2695-701.
128. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
129. Anversa, P., et al., *Apoptosis and myocardial infarction*. *Basic Res Cardiol*, 1998. **93 Suppl 3**: p. 8-12.
130. Gottlieb, R.A., et al., *Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(4): p. 1621-8.
131. Zhao, Z.Q., et al., *Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death*. *Cardiovasc Res*, 2000. **45**(3): p. 651-60.
132. Wang, C. and R.J. Youle, *The role of mitochondria in apoptosis**. *Annu Rev Genet*, 2009. **43**: p. 95-118.
133. Wajant, H., *The Fas signaling pathway: more than a paradigm*. *Science*, 2002. **296**(5573): p. 1635-6.
134. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008. **151**(1): p. 10-27.
135. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 47-59.
136. Antonsson, B., et al., *Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2*. *Science*, 1997. **277**(5324): p. 370-2.
137. Hacker, G. and A. Weber, *BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?* *Arch Biochem Biophys*, 2007. **462**(2): p. 150-5.
138. Shi, Y., *Apoptosome assembly*. *Methods Enzymol*, 2008. **442**: p. 141-56.
139. Shiozaki, E.N. and Y. Shi, *Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology*. *Trends Biochem Sci*, 2004. **29**(9): p. 486-94.
140. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
141. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. *Cell*, 1998. **94**(4): p. 481-90.
142. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. **35**(4): p. 339-41.
143. Brocheriou, V., et al., *Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury*. *J Gene Med*, 2000. **2**(5): p. 326-33.
144. Chen, Z., et al., *Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(5): p. H2313-20.
145. Gourine, A., et al., *Short-acting calcium antagonist clevidipine protects against reperfusion injury via local nitric oxide-related mechanisms in the jeopardised myocardium*. *Cardiovasc Res*, 2001. **51**(1): p. 100-7.
146. Jang, Y.H. and J.M. Kim, *Nicardipine augments local myocardial perfusion after coronary artery reperfusion in dogs*. *J Korean Med Sci*, 2003. **18**(1): p. 23-6.

147. Matsumoto, T., et al., *Blockade of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger is more efficient than blockade of the Na⁺-H⁺ exchanger for protection of the myocardium from lethal reperfusion injury*. Cardiovasc Drugs Ther, 2002. **16**(4): p. 295-301.
148. Iwai, T., et al., *Protective effect of propranolol on mitochondrial function in the ischaemic heart*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(3): p. 472-80.
149. Wei, L., et al., *Potassium channel blockers attenuate hypoxia- and ischemia-induced neuronal death in vitro and in vivo*. Stroke, 2003. **34**(5): p. 1281-6.
150. Uchiyama, T., et al., *Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(8): p. 1049-61.
151. Taimor, G., A. Rakow, and H.M. Piper, *Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes*. FASEB J, 2001. **15**(13): p. 2518-20.
152. Czarnowska, E., et al., *The role of endogenous nitric oxide in inhibition of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis*. Folia Histochem Cytobiol, 2001. **39**(2): p. 179-80.
153. Rakhit, R.D., et al., *Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes*. Circulation, 2001. **103**(21): p. 2617-23.
154. Palojoki, E., et al., *Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2726-31.
155. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
156. Reimer, K.A., et al., *Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis*. Am J Physiol, 1986. **251**(6 Pt 2): p. H1306-15.
157. Yellon, D.M., A.M. Alkhulaifi, and W.B. Pugsley, *Preconditioning the human myocardium*. Lancet, 1993. **342**(8866): p. 276-7.
158. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
159. Kharbanda, R.K., et al., *Remote ischaemic preconditioning protects against cardiopulmonary bypass-induced tissue injury: a preclinical study*. Heart, 2006. **92**(10): p. 1506-11.
160. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The evolving story of "conditioning" to protect against acute myocardial ischaemia-reperfusion injury*. Heart, 2007. **93**(6): p. 649-51.
161. Zaugg, M., et al., *Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms*. Br J Anaesth, 2003. **91**(4): p. 551-65.
162. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
163. Staat, P., et al., *Postconditioning the human heart*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2143-8.
164. Ma, X., et al., *Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction*. J Interv Cardiol, 2006. **19**(5): p. 367-75.

165. Laskey, W.K., *Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study.* Catheter Cardiovasc Interv, 2005. **65**(3): p. 361-7.
166. Wang, H.C., et al., *Hypoxic postconditioning enhances the survival and inhibits apoptosis of cardiomyocytes following reoxygenation: role of peroxynitrite formation.* Apoptosis, 2006. **11**(8): p. 1453-60.
167. Kloner, R.A., J. Dow, and A. Bhandari, *Postconditioning markedly attenuates ventricular arrhythmias after ischemia-reperfusion.* J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2006. **11**(1): p. 55-63.
168. Hausenloy, D.J., A. Tsang, and D.M. Yellon, *The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning.* Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(2): p. 69-75.
169. Lecour, S., *Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(1): p. 32-40.
170. Fujio, Y., et al., *Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart.* Circulation, 2000. **101**(6): p. 660-7.
171. Yue, T.L., et al., *Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart.* Circ Res, 2000. **86**(6): p. 692-9.
172. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection.* Heart Fail Rev, 2007. **12**(3-4): p. 217-34.
173. Davidson, S.M., et al., *Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection.* Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(3): p. 414-9.
174. Datta, K., et al., *Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells.* J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30835-9.
175. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway.* Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 448-60.
176. Yamaguchi, H. and H.G. Wang, *The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change.* Oncogene, 2001. **20**(53): p. 7779-86.
177. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.* Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
178. Harada, H., et al., *p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9666-70.
179. Ley, R., et al., *Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim.* J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 18811-6.
180. Mayo, L.D. and D.B. Donner, *A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11598-603.

181. Kennedy, S.G., et al., *Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5800-10.
182. Terada, K., Y. Kaziro, and T. Satoh, *Analysis of Ras-dependent signals that prevent caspase-3 activation and apoptosis induced by cytokine deprivation in hematopoietic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(1): p. 449-55.
183. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
184. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
185. Balakirev, M., V.V. Khramtsov, and G. Zimmer, *Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide*. Eur J Biochem, 1997. **246**(3): p. 710-8.
186. Majewski, M., et al., *Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt*. Cancer Res, 1999. **59**(12): p. 2815-9.
187. Romashkova, J.A. and S.S. Makarov, *NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 86-90.
188. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
189. Bonni, A., et al., *Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1358-62.
190. Jonassen, A.K., et al., *Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1191-8.
191. Gao, F., et al., *Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation*. Circulation, 2002. **105**(12): p. 1497-502.
192. Buerke, M., et al., *Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 8031-5.
193. Wang, L., et al., *Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I*. Circ Res, 1998. **83**(5): p. 516-22.
194. Baxter, G.F., et al., *Cardioprotective effects of transforming growth factor-beta1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38**(6): p. 930-9.
195. Cuevas, P., et al., *Cardioprotection from ischemia by fibroblast growth factor: role of inducible nitric oxide synthase*. Eur J Med Res, 1999. **4**(12): p. 517-24.
196. Cuevas, P., et al., *Fibroblast growth factor cardioprotection against ischemia-reperfusion injury may involve K⁺ ATP channels*. Eur J Med Res, 2000. **5**(4): p. 145-9.
197. Brar, B.K., et al., *CT-1 mediated cardioprotection against ischaemic re-oxygenation injury is mediated by PI3 kinase, Akt and MEK1/2 pathways*. Cytokine, 2001. **16**(3): p. 93-6.
198. Schulte, G. and B.B. Fredholm, *Human adenosine A(1), A(2A), A(2B), and A(3) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(3): p. 477-82.

199. Kis, A., G.F. Baxter, and D.M. Yellon, *Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A1/A2A receptor agonist: role of A2A receptor and Erk1/2*. Cardiovasc Drugs Ther, 2003. **17**(5-6): p. 415-25.
200. Boucher, M., et al., *Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(3): p. 416-22.
201. Bell, R.M. and D.M. Yellon, *Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(2): p. 185-93.
202. Bernier, S.G., S. Haldar, and T. Michel, *Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30707-15.
203. Dragasis, S., et al., *The role of opioid receptor agonists in ischemic preconditioning*. Eur J Pharmacol, 2013. **720**(1-3): p. 401-8.
204. Kureishi, Y., et al., *The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals*. Nat Med, 2000. **6**(9): p. 1004-10.
205. Bell, R.M. and D.M. Yellon, *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, 2003. **41**(3): p. 508-15.
206. Puel, J., [*Statins and unstable angina: MIRACL*]. Ann Endocrinol (Paris), 2001. **62**(1 Pt 2): p. 145-8.
207. Schwartz, G.G., et al., *Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial*. JAMA, 2001. **285**(13): p. 1711-8.
208. Li, R., et al., *Intrathecal morphine preconditioning induces cardioprotection via activation of delta, kappa, and mu opioid receptors in rats*. Anesth Analg, 2009. **108**(1): p. 23-9.
209. Diaz, R., *Myocardial protection during acute myocardial infarction: the need for a simple large randomized trial with GIK*. Cardiovasc Drugs Ther, 2000. **14**(6): p. 561-3.
210. Ross, A.M., et al., *A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II)*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(11): p. 1775-80.
211. Forman, M.B. and E.K. Jackson, *Role of adenosine in acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(6): p. 1235-6; author reply 1236-7.
212. Gwon, H.C., et al., *The feasibility and safety of fluoroscopy-guided percutaneous intramyocardial gene injection in porcine heart*. Int J Cardiol, 2001. **79**(1): p. 77-88.
213. Loughran, J.H., et al., *Stem cell therapy: promising treatment in heart failure?* Curr Heart Fail Rep, 2013. **10**(1): p. 73-80.
214. Maekawa, N., et al., *Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(7): p. 1229-35.
215. Nakano, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte*. Circulation, 1998. **97**(14): p. 1392-400.

216. Flaherty, M.P., et al., *The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(6): p. 735-41.
217. Lecour, S., et al., *Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(5): p. 509-18.
218. Gao, Q., et al., *The mitochondrial permeability transition pore and the Ca²⁺-activated K⁺ channel contribute to the cardioprotection conferred by tumor necrosis factor-alpha*. Cytokine, 2005. **32**(5): p. 199-205.
219. Vessey, D.A., et al., *Role of sphingosine kinase activity in protection of heart against ischemia reperfusion injury*. Med Sci Monit, 2006. **12**(10): p. BR318-24.
220. Lecour, S., et al., *Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase)*. Circulation, 2005. **112**(25): p. 3911-8.
221. Boengler, K., et al., *The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure*. Pharmacol Ther, 2008. **120**(2): p. 172-85.
222. Deuchar, G.A., L.H. Opie, and S. Lecour, *TNFalpha is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning*. Life Sci, 2007. **80**(18): p. 1686-91.
223. Lacerda, L., et al., *Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 201-8.
224. Fuglestad, B.N., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 is involved in the cardioprotective signalling pathway activated by insulin therapy at reperfusion*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 444-53.
225. Rafiee, P., et al., *Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways*. Basic Res Cardiol, 2005. **100**(3): p. 187-97.
226. Gross, E.R., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H827-34.
227. Pfeffer, L.M., et al., *STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1418-20.
228. Suleman, N., et al., *Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(1): p. 127-33.
229. Frias, M.A., et al., *Prostaglandin E2 activates Stat3 in neonatal rat ventricular cardiomyocytes: A role in cardiac hypertrophy*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(1): p. 57-65.
230. Rondeau, I., et al., *Effects of different dietary omega-6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction*. Can J Physiol Pharmacol, 2011. **89**(3): p. 169-76.
231. Cuvelier C., C.J.-F., Dufrasne I., Hornick J.-L., Istasse L., *Acides gras : nomenclature et sources alimentaires*. Ann. Méd. Vét., 2004. **148**: p. 133-140.
232. Das, U.N., *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*. Biotechnol J, 2006. **1**(4): p. 420-39.

233. Publication, H.H. *The truth about fats: the good, the bad, and the in-between*. 2015.
234. Holub, B.J., *Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care*. CMAJ, 2002. **166**(5): p. 608-15.
235. Heller, A.R., Stehr S.N, Koch T, *Omega-3 Fatty Acids in Clinical nutrition*. 2006, New York: Nova Publishers. 108.
236. Lands, W.E.M., *Fish, omega-3 and human health*, ed. e. edition. 2005, Urbana: AOCS Publishing. 235.
237. White, B., *Dietary fatty acids*. Am Fam Physician, 2009. **80**(4): p. 345-50.
238. Kuhnt, K., C. Degen, and G. Jahreis, *Evaluation of the Impact of Ruminant trans Fatty Acids on Human Health: Important Aspects to Consider*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2015: p. 0.
239. Ziboh, V.A., et al., *Biological significance of essential fatty acids/prostanoids/lipoxygenase-derived monohydroxy fatty acids in the skin*. Arch Pharm Res, 2002. **25**(6): p. 747-58.
240. Uauy, R., et al., *Essential fatty acids in visual and brain development*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 885-95.
241. Stoffel, W., et al., *Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids*. EMBO J, 2008. **27**(17): p. 2281-92.
242. Nakamura, M.T. and T.Y. Nara, *Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **68**(2): p. 145-50.
243. Burke, J.E. and E.A. Dennis, *Phospholipase A2 biochemistry*. Cardiovasc Drugs Ther, 2009. **23**(1): p. 49-59.
244. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
245. Smith, W.L., *Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(2): p. 174-82.
246. Miller, S.B., *Prostaglandins in health and disease: an overview*. Semin Arthritis Rheum, 2006. **36**(1): p. 37-49.
247. Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito, *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 145-82.
248. Schmitz, G. and J. Ecker, *The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids*. Prog Lipid Res, 2008. **47**(2): p. 147-55.
249. Simopoulos, A.P., *The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications*. oilseeds and fat, 2010. **17**(5): p. 267-275.
250. Fischer, S. and P.C. Weber, *Thromboxane A3 (TXA3) is formed in human platelets after dietary eicosapentaenoic acid (C20:5 omega 3)*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **116**(3): p. 1091-9.
251. Crofford, L.J., *Prostaglandin biology*. Gastroenterol Clin North Am, 2001. **30**(4): p. 863-76.
252. Coleman, R.A., W.L. Smith, and S. Narumiya, *International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 205-29.
253. Tull, S.P., et al., *Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment*. PLoS Biol, 2009. **7**(8): p. e1000177.

254. Bagga, D., et al., *Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1751-6.
255. Ricciotti, E. and G.A. FitzGerald, *Prostaglandins and inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(5): p. 986-1000.
256. Biagi, P.L., et al., *Gamma-linolenic acid dietary supplementation can reverse the aging influence on rat liver microsome delta 6-desaturase activity*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1083**(2): p. 187-92.
257. Hanchanale, V. and I. Eardley, *Alprostadil for the treatment of impotence*. Expert Opin Pharmacother, 2014. **15**(3): p. 421-8.
258. Hennekens, C.H., *Update on aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease*. Am J Manag Care, 2002. **8**(22 Suppl): p. S691-700.
259. Dudley Hart F, H.E., *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*. Drugs 2012. **27**(3): p. 232-255.
260. Karateev, A.E., *[Meloxicam: the golden mean of nonsteroidal anti-inflammatory drugs]*. Ter Arkh, 2014. **86**(5): p. 99-105.
261. Buttgereit, F., et al., *Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(11): p. 3408-17.
262. Dogne, J.M., et al., *From the design to the clinical application of thromboxane modulators*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(8): p. 903-23.
263. Higo, K., et al., *The novel thromboxane A2 receptor antagonist KW-3635 reduces infarct size in a canine model of coronary occlusion and reperfusion*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1993. **323**: p. 32-49.
264. Verheugt, F.W., et al., *Effects of early intervention with low-dose aspirin (100 mg) on infarct size, reinfarction and mortality in anterior wall acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1990. **66**(3): p. 267-70.
265. Rossoni, G., et al., *The nitroderivative of aspirin, NCX 4016, reduces infarct size caused by myocardial ischemia-reperfusion in the anesthetized rat*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(1): p. 380-7.
266. Timmers, L., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibition increases mortality, enhances left ventricular remodeling, and impairs systolic function after myocardial infarction in the pig*. Circulation, 2007. **115**(3): p. 326-32.
267. LaPointe, M.C., et al., *Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function after myocardial infarction in the mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(4): p. H1416-24.
268. Lada-Moldovan, L., et al., *Chronic pretreatment with celecoxib reduces infarct size*. J Cardiovasc Pharmacol, 2009. **54**(1): p. 31-7.
269. Kaloustian, S., et al., *Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala*. Apoptosis, 2007. **12**(11): p. 1945-51.
270. Kayama, Y., et al., *Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1565-74.
271. Suzuki, H., et al., *Arachidonate 12/15-Lipoxygenase-Induced Inflammation and Oxidative Stress Are Involved in the Development of Diabetic Cardiomyopathy*. Diabetes, 2014.

272. Denzlinger, C., *Biology and pathophysiology of leukotrienes*. Crit Rev Oncol Hematol, 1996. **23**(3): p. 167-223.
273. Fetterman, J.W., Jr. and M.M. Zdanowicz, *Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease*. Am J Health Syst Pharm, 2009. **66**(13): p. 1169-79.
274. Seya, A., et al., *Comparative effect of leukotriene B4 and leukotriene B5 on calcium mobilization in human neutrophils*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1988. **34**(1): p. 47-50.
275. Cosentino, S., et al., *Expression of dual nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor GPR17 in early trafficking of cardiac stromal cells after myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(9): p. 1785-96.
276. Jawien, J., et al., *Inhibition of five lipoxygenase activating protein (FLAP) by MK-886 decreases atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice*. Eur J Clin Invest, 2006. **36**(3): p. 141-6.
277. Scott, J.P. and M. Peters-Golden, *Antileukotriene agents for the treatment of lung disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(5): p. 538-44.
278. Scow, D.T., G.K. Luttermoser, and K.S. Dickerson, *Leukotriene inhibitors in the treatment of allergy and asthma*. Am Fam Physician, 2007. **75**(1): p. 65-70.
279. Bocan, T.M., et al., *A specific 15-lipoxygenase inhibitor limits the progression and monocyte-macrophage enrichment of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the rabbit*. Atherosclerosis, 1998. **136**(2): p. 203-16.
280. Sordillo, L.M., et al., *Enhanced 15-HPETE production during oxidant stress induces apoptosis of endothelial cells*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2005. **76**(1-4): p. 19-34.
281. Succol, F. and D. Pratico, *A role for 12/15 lipoxygenase in the amyloid beta precursor protein metabolism*. J Neurochem, 2007. **103**(1): p. 380-7.
282. Carry, M., et al., *Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation*. Circulation, 1992. **85**(1): p. 230-6.
283. Song, L., et al., *Inhibition of 12/15 lipoxygenase by baicalein reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via modulation of multiple signaling pathways*. Apoptosis, 2014. **19**(4): p. 567-80.
284. Jiang, W., et al., *Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor expression mediates myocardial ischemia-reperfusion injury*. Am J Pathol, 2008. **172**(3): p. 592-602.
285. Ni, N.C., et al., *A selective cysteinyl leukotriene receptor 2 antagonist blocks myocardial ischemia/reperfusion injury and vascular permeability in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **339**(3): p. 768-78.
286. Serhan, C.N. and N.A. Petasis, *Resolvins and protectins in inflammation resolution*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 5922-43.
287. Levy, B.D., et al., *Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 612-9.
288. Spite, M. and C.N. Serhan, *Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins*. Circ Res, 2010. **107**(10): p. 1170-84.

289. Serhan, C.N., M. Hamberg, and B. Samuelsson, *Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(17): p. 5335-9.
290. Fierro, I.M. and C.N. Serhan, *Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins*. Braz J Med Biol Res, 2001. **34**(5): p. 555-66.
291. Serhan, C.N. and N. Chiang, *Lipid-derived mediators in endogenous anti-inflammation and resolution: lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins*. ScientificWorldJournal, 2002. **2**: p. 169-204.
292. Serhan, C.N., *Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?* Am J Pathol, 2010. **177**(4): p. 1576-91.
293. Christie, P.E., B.W. Spur, and T.H. Lee, *The effects of lipoxin A4 on airway responses in asthmatic subjects*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(6): p. 1281-4.
294. Karra, L., et al., *Lipoxin B4 promotes the resolution of allergic inflammation in the upper and lower airways of mice*. Mucosal Immunol, 2015. **8**(4): p. 852-62.
295. Machado, F.S., et al., *Native and aspirin-triggered lipoxins control innate immunity by inducing proteasomal degradation of TRAF6*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1077-86.
296. Kronke, G., et al., *12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3383-9.
297. Arterburn, L.M., E.B. Hall, and H. Oken, *Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1467S-1476S.
298. Serhan, C.N., *Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2008. **79**(3-5): p. 157-63.
299. Arita, M., et al., *Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 713-22.
300. Arita, M., C.B. Clish, and C.N. Serhan, *The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 149-57.
301. Arita, M., et al., *Metabolic inactivation of resolvin E1 and stabilization of its anti-inflammatory actions*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22847-54.
302. Arita, M., et al., *Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3912-7.
303. Serhan, C.N., et al., *Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals*. J Exp Med, 2002. **196**(8): p. 1025-37.
304. Oh, S.F., et al., *Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 569-81.
305. Oh, S.F., et al., *Resolvin E2 formation and impact in inflammation resolution*. J Immunol, 2012. **188**(9): p. 4527-34.
306. www.resolvix.com, R.P. cited 20-01-2015. [cited 15 01].

307. Keyes, K.T., et al., *Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(1): p. H153-64.
308. Hong, S., et al., *Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14677-87.
309. Hong, S., et al., *Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins-Mediator lipidomic analysis*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2005. **78**(1-4): p. 107-16.
310. Sun, Y.P., et al., *Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9323-34.
311. Chiang, N., et al., *The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 463-87.
312. Norling, L.V., et al., *Resolvin D1 limits polymorphonuclear leukocyte recruitment to inflammatory loci: receptor-dependent actions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(8): p. 1970-8.
313. Liao, Z., et al., *Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPARgamma/NF-kappaB pathway*. Respir Res, 2012. **13**: p. 110.
314. Wu, D., et al., *Novel biphasic role of resolvin D1 on expression of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated lung fibroblasts is partly through PI3K/AKT and ERK2 pathways*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 964012.
315. Krishnamoorthy, S., et al., *Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs*. Am J Pathol, 2012. **180**(5): p. 2018-27.
316. Recchiuti, A., et al., *MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvin D1-miRNA circuits*. FASEB J, 2011. **25**(2): p. 544-60.
317. Sun, W., et al., *Endogenous expression pattern of resolvin D1 in a rat model of self-resolution of lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome and inflammation*. Int Immunopharmacol, 2014. **23**(1): p. 247-253.
318. Tang, H., et al., *Protective actions of aspirin-triggered (17R) resolvin D1 and its analogue, 17R-hydroxy-19-para-fluorophenoxy-resolvin D1 methyl ester, in C5a-dependent IgG immune complex-induced inflammation and lung injury*. J Immunol, 2014. **193**(7): p. 3769-78.
319. Wang, L., et al., *Effects of resolvin D1 on inflammatory responses and oxidative stress of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice*. Chin Med J (Engl), 2014. **127**(5): p. 803-9.
320. Dmitrieva, N., G. Suess, and R. Shirley, *Resolvins RvD1 and 17(R)-RvD1 alleviate signs of inflammation in a rat model of endometriosis*. Fertil Steril, 2014. **102**(4): p. 1191-6.
321. Chen, F., et al., *Resolvin D1 improves survival in experimental sepsis through reducing bacterial load and preventing excessive activation of inflammatory response*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014. **33**(3): p. 457-64.
322. Bang, S., et al., *17(R)-resolvin D1 specifically inhibits transient receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(3): p. 683-92.

323. Duffield, J.S., et al., *Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5902-11.
324. Luo, C., et al., *Enriched endogenous omega-3 fatty acids in mice protect against global ischemia injury*. J Lipid Res, 2014. **55**(7): p. 1288-1297.
325. Mukherjee, P.K., et al., *Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8491-6.
326. Marcheselli, V.L., et al., *Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43807-17.
327. Zhao, Y., et al., *Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPARgamma-mediated mechanisms in Alzheimer's disease models*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15816.
328. Lukiw, W.J., et al., *A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2774-83.
329. Levy, B.D., et al., *Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 496-502.
330. Serhan, C.N., et al., *Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1848-59.
331. Mas, E., et al., *Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation*. Clin Chem, 2012. **58**(10): p. 1476-84.
332. Serhan, C.N., et al., *Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 15-23.
333. Budowski, P. and M.A. Crawford, *a-Linolenic acid as a regulator of the metabolism of arachidonic acid: dietary implications of the ratio, n-6:n-3 fatty acids*. Proc Nutr Soc, 1985. **44**(2): p. 221-9.
334. Garg, M.L., A.B. Thomson, and M.T. Clandinin, *Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism*. J Lipid Res, 1990. **31**(2): p. 271-7.
335. Liou, Y.A., et al., *Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men*. J Nutr, 2007. **137**(4): p. 945-52.
336. Emken EA, A.R., Rakoff H, Rohwedder WK, *Metabolism of deuterium-labeled linolenic, linoleic, oleic, stearic and palmitic acid in human subject*. Elsevier Science Publishers, 1989: p. 713-716.
337. Pereira, S.L., A.E. Leonard, and P. Mukerji, *Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **68**(2): p. 97-106.
338. Nakamura, M.T., H.P. Cho, and S.D. Clarke, *Regulation of hepatic delta-6 desaturase expression and its role in the polyunsaturated fatty acid inhibition of fatty acid synthase gene expression in mice*. J Nutr, 2000. **130**(6): p. 1561-5.
339. Hansen-Petrik, M.B., et al., *Selective inhibition of Delta-6 desaturase impedes intestinal tumorigenesis*. Cancer Lett, 2002. **175**(2): p. 157-63.

340. Rimoldi, O.J., G.S. Finarelli, and R.R. Brenner, *Effects of diabetes and insulin on hepatic delta6 desaturase gene expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **283**(2): p. 323-6.
341. Horrobin, D.F., *Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase*. *Am J Clin Nutr*, 1993. **57**(5 Suppl): p. 732S-736S; discussion 736S-737S.
342. Burdge, G.C. and P.C. Calder, *Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults*. *Reprod Nutr Dev*, 2005. **45**(5): p. 581-97.
343. Glaser, C., J. Heinrich, and B. Koletzko, *Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism*. *Metabolism*, 2010. **59**(7): p. 993-9.
344. Goyens, P.L., et al., *Conversion of alpha-linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of alpha-linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **84**(1): p. 44-53.
345. Plourde, M. and S.C. Cunnane, *Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2007. **32**(4): p. 619-34.
346. Mantzioris, E., et al., *Differences exist in the relationships between dietary linoleic and alpha-linolenic acids and their respective long-chain metabolites*. *Am J Clin Nutr*, 1995. **61**(2): p. 320-4.
347. Ezaki, O., et al., *Long-term effects of dietary alpha-linolenic acid from perilla oil on serum fatty acids composition and on the risk factors of coronary heart disease in Japanese elderly subjects*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1999. **45**(6): p. 759-72.
348. Burdge, G.C. and S.A. Wootton, *Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women*. *Br J Nutr*, 2002. **88**(4): p. 411-20.
349. Gerster, H., *Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)?* *Int J Vitam Nutr Res*, 1998. **68**(3): p. 159-73.
350. Brenna, J.T., et al., *alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2009. **80**(2-3): p. 85-91.
351. Ayerza, R. and W. Coates, *Dietary levels of chia: influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens*. *Poult Sci*, 2000. **79**(5): p. 724-39.
352. Ayerza, R., W. Coates, *Ground Chia Seed and Chia Oil Effects on Plasma Lipids and Fatty Acids in the Rat*. *Nutrition Research*, 2005(25): p. 995-1003.
353. Ayerza, R., Jr. and W. Coates, *Effect of dietary alpha-linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma*. *Ann Nutr Metab*, 2007. **51**(1): p. 27-34.
354. Talahalli, R.R., et al., *Lower efficacy in the utilization of dietary ALA as compared to preformed EPA + DHA on long chain n-3 PUFA levels in rats*. *Lipids*, 2010. **45**(9): p. 799-808.
355. Iritani, N. and S. Fujikawa, *Competitive incorporation of dietary omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids into the tissue phospholipids in rats*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1982. **28**(6): p. 621-9.

356. Fischer, M.A. and H.S. Black, *Modification of membrane composition, eicosanoid metabolism, and immunoresponsiveness by dietary omega-3 and omega-6 fatty acid sources, modulators of ultraviolet-carcinogenesis*. Photochem Photobiol, 1991. **54**(3): p. 381-7.
357. Cleland, L.G., et al., *Linoleate inhibits EPA incorporation from dietary fish-oil supplements in human subjects*. Am J Clin Nutr, 1992. **55**(2): p. 395-9.
358. Bryan, D.L., et al., *Incorporation of alpha-linolenic acid and linoleic acid into human respiratory epithelial cell lines*. Lipids, 2001. **36**(7): p. 713-7.
359. Iwasaki, W., et al., *Changes in the fatty acid composition of the liver with the administration of N-3 polyunsaturated fatty acids and the effects on warm ischemia/reperfusion injury in the rat liver*. Shock, 2010. **33**(3): p. 306-14.
360. Trebble, T.M., et al., *Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation*. Am J Clin Nutr, 2003. **78**(3): p. 376-82.
361. Sperling, R.I., et al., *Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils*. J Clin Invest, 1993. **91**(2): p. 651-60.
362. von Schacky, C., et al., *n-3 fatty acids and cysteinyl-leukotriene formation in humans in vitro, ex vivo, and in vivo*. J Lab Clin Med, 1993. **121**(2): p. 302-9.
363. Simopoulos, A.P., *The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease*. Asia Pac J Clin Nutr, 2008. **17 Suppl 1**: p. 131-4.
364. Simopoulos, A.P., *Essential fatty acids in health and chronic disease*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(3 Suppl): p. 560S-569S.
365. Simopoulos, A.P., *The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(6): p. 674-88.
366. Kang, J.X., *Achieving balance in the omega-6/omega-3 ratio through nutrigenomics*. World Rev Nutr Diet, 2004. **93**: p. 92-8.
367. JX, K., *Balance of omega6/omega3 fatty acids is important for health. The evidence from gene transfer studies*. World Rev Nutr Diet, 2004. **95**: p. 93-102.
368. Kang, J.X. and A. Leaf, *Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids. Recent studies*. Circulation, 1996. **94**(7): p. 1774-80.
369. Kang, J.X., et al., *Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids*. Nature, 2004. **427**(6974): p. 504.
370. Bjerregaard, P., T.K. Young, and R.A. Hegele, *Low incidence of cardiovascular disease among the Inuit--what is the evidence?* Atherosclerosis, 2003. **166**(2): p. 351-7.
371. Horrobin, D.F., *Low prevalences of coronary heart disease (CHD), psoriasis, asthma and rheumatoid arthritis in Eskimos: are they caused by high dietary intake of eicosapentaenoic acid (EPA), a genetic variation of essential fatty acid (EFA) metabolism or a combination of both?* Med Hypotheses, 1987. **22**(4): p. 421-8.
372. Simopoulos, A.P., *Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases*. J Am Coll Nutr, 2002. **21**(6): p. 495-505.
373. Wahle, K.W., *Fatty acid modification and membrane lipids*. Proc Nutr Soc, 1983. **42**(2): p. 273-87.

374. Carrillo-Tripp, M. and S.E. Feller, *Evidence for a mechanism by which omega-3 polyunsaturated lipids may affect membrane protein function*. *Biochemistry*, 2005. **44**(30): p. 10164-9.
375. Laude, A.J. and I.A. Prior, *Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking*. *Mol Membr Biol*, 2004. **21**(3): p. 193-205.
376. Stillwell, W. and S.R. Wassall, *Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid*. *Chem Phys Lipids*, 2003. **126**(1): p. 1-27.
377. Birch, E.E., et al., *Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992. **33**(11): p. 3242-53.
378. Moriguchi, T. and N. Salem, Jr., *Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance*. *J Neurochem*, 2003. **87**(2): p. 297-309.
379. Rohrbach, S., *Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(36): p. 4103-16.
380. Calder, P.C., *Dietary modification of inflammation with lipids*. *Proc Nutr Soc*, 2002. **61**(3): p. 345-58.
381. Kohli, P. and B.D. Levy, *Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation*. *Br J Pharmacol*, 2009. **158**(4): p. 960-71.
382. Moreno, J.J., *Differential effects of arachidonic and eicosapentaenoic Acid-derived eicosanoids on polymorphonuclear transmigration across endothelial cell cultures*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **331**(3): p. 1111-7.
383. Ferrucci, L., et al., *Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(2): p. 439-46.
384. Vedin, I., et al., *Effects of docosahexaenoic acid-rich n-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: the OmegAD study*. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(6): p. 1616-22.
385. Poudel-Tandukar, K., et al., *Dietary intakes of alpha-linolenic and linoleic acids are inversely associated with serum C-reactive protein levels among Japanese men*. *Nutr Res*, 2009. **29**(6): p. 363-70.
386. Collie-Duguid, E.S. and K.W. Wahle, *Inhibitory effect of fish oil N-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **220**(3): p. 969-74.
387. Oh, D.Y., et al., *GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects*. *Cell*, 2010. **142**(5): p. 687-98.
388. Deckelbaum, R.J., T.S. Worgall, and T. Seo, *n-3 fatty acids and gene expression*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1520S-1525S.
389. Berger, J. and D.E. Moller, *The mechanisms of action of PPARs*. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 409-35.
390. Jump, D.B., *N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription*. *Curr Opin Lipidol*, 2008. **19**(3): p. 242-7.
391. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale*. *Biochimie*, 2009. **91**(6): p. 791-5.
392. Novak, T.E., et al., *NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **284**(1): p. L84-9.

393. Bjerregaard, P., G. Mulvad, and H.S. Pedersen, *Cardiovascular risk factors in Inuit of Greenland*. *Int J Epidemiol*, 1997. **26**(6): p. 1182-90.
394. Dyerberg, J., *Coronary heart disease in Greenland Inuit: a paradox. Implications for western diet patterns*. *Arctic Med Res*, 1989. **48**(2): p. 47-54.
395. Lavie, C.J., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(7): p. 585-94.
396. Skulas-Ray, A.C., et al., *Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(2): p. 243-52.
397. Grimsgaard, S., et al., *Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids*. *Am J Clin Nutr*, 1997. **66**(3): p. 649-59.
398. Bays, H.E., et al., *Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications*. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008. **6**(3): p. 391-409.
399. Adkins, Y. and D.S. Kelley, *Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids*. *J Nutr Biochem*, 2010. **21**(9): p. 781-92.
400. Vermeirssen, V., J. Van Camp, and W. Verstraete, *Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides*. *Br J Nutr*, 2004. **92**(3): p. 357-66.
401. Ait-Yahia, D., et al., *Dietary fish protein lowers blood pressure and alters tissue polyunsaturated fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats*. *Nutrition*, 2003. **19**(4): p. 342-6.
402. Frenoux, J.M., et al., *A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats*. *J Nutr*, 2001. **131**(1): p. 39-45.
403. Gutierrez, O.G., Jr., et al., *Fish protein-rich diet attenuates hypertension induced by dietary NG-nitro-L-arginine in normotensive Wistar-Kyoto rats*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1994. **21**(11): p. 875-9.
404. Bao, D.Q., et al., *Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives*. *Hypertension*, 1998. **32**(4): p. 710-7.
405. Geleijnse, J.M., et al., *Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials*. *J Hypertens*, 2002. **20**(8): p. 1493-9.
406. Prisco, D., et al., *Effect of medium-term supplementation with a moderate dose of n-3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure in mild hypertensive patients*. *Thromb Res*, 1998. **91**(3): p. 105-12.
407. Cicero, A.F., S. Ertek, and C. Borghi, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids: their potential role in blood pressure prevention and management*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2009. **7**(3): p. 330-7.
408. Das, U.N., *Long-chain polyunsaturated fatty acids interact with nitric oxide, superoxide anion, and transforming growth factor-beta to prevent human essential hypertension*. *Eur J Clin Nutr*, 2004. **58**(2): p. 195-203.
409. Willerson, J.T. and P.M. Ridker, *Inflammation as a cardiovascular risk factor*. *Circulation*, 2004. **109**(21 Suppl 1): p. I12-10.

410. von Schacky, C., et al., *The effect of dietary omega-3 fatty acids on coronary atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* Ann Intern Med, 1999. **130**(7): p. 554-62.
411. Thies, F., et al., *Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial.* Lancet, 2003. **361**(9356): p. 477-85.
412. Din, J.N., et al., *Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man.* Atherosclerosis, 2008. **197**(1): p. 290-6.
413. Den Ruijter, H.M., et al., *Pro- and antiarrhythmic properties of a diet rich in fish oil.* Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 316-25.
414. Anand, R.G., et al., *The role of fish oil in arrhythmia prevention.* J Cardiopulm Rehabil Prev, 2008. **28**(2): p. 92-8.
415. Rizos, E.C., et al., *Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis.* JAMA, 2012. **308**(10): p. 1024-33.
416. Kromhout, D., et al., *n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction.* N Engl J Med, 2010. **363**(21): p. 2015-26.
417. Sheard, N.F., *Fish consumption and risk of sudden cardiac death.* Nutr Rev, 1998. **56**(6): p. 177-9.
418. Singh, R.B., et al., *Randomised controlled trial of cardioprotective diet in patients with recent acute myocardial infarction: results of one year follow up.* BMJ, 1992. **304**(6833): p. 1015-9.
419. Marchioli, R., et al., *Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione.* Circulation, 2002. **105**(16): p. 1897-903.
420. Burr, M.L., et al., *Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART).* Lancet, 1989. **2**(8666): p. 757-61.
421. Lee, S.H., et al., *Blood eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid as predictors of all-cause mortality in patients with acute myocardial infarction--data from Infarction Prognosis Study (IPS) Registry.* Circ J, 2009. **73**(12): p. 2250-7.
422. Bjerregaard, L.J., et al., *Fish intake and acute coronary syndrome.* Eur Heart J, 2010. **31**(1): p. 29-34.
423. Oda, E., et al., *A case-control pilot study on n-3 polyunsaturated fatty acid as a negative risk factor for myocardial infarction.* Int Heart J, 2005. **46**(4): p. 583-91.
424. Landmark, K., et al., *Use of fish oils appears to reduce infarct size as estimated from peak creatine kinase and lactate dehydrogenase activities.* Cardiology, 1998. **89**(2): p. 94-102.
425. Landmark, K., et al., *Eating fish may reduce infarct size and the occurrence of Q wave infarcts.* Eur J Clin Nutr, 1998. **52**(1): p. 40-4.
426. Laake, K., et al., *Effects of omega3 supplementation in elderly patients with acute myocardial infarction: design of a prospective randomized placebo controlled study.* BMC Geriatr, 2014. **14**: p. 74.

427. Wilbring, M., et al., *Omega-3 polyunsaturated Fatty acids reduce the incidence of postoperative atrial fibrillation in patients with history of prior myocardial infarction undergoing isolated coronary artery bypass grafting*. Thorac Cardiovasc Surg, 2014. **62**(7): p. 569-74.
428. Hoogeveen, E.K., et al., *No effect of n-3 fatty acids on high-sensitivity C-reactive protein after myocardial infarction: the Alpha Omega Trial*. Eur J Prev Cardiol, 2014. **21**(11): p. 1429-36.
429. Investigators, O.T., et al., *n-3 fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia*. N Engl J Med, 2012. **367**(4): p. 309-18.
430. Zeghichi-Hamri, S., et al., *Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats*. Nutr Res, 2010. **30**(12): p. 849-57.
431. McGuinness, J., et al., *Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: quantification and mechanism of action*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **132**(1): p. 72-9.
432. Ogita, H., et al., *Eicosapentaenoic acid reduces myocardial injury induced by ischemia and reperfusion in rabbit hearts*. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **41**(6): p. 964-9.
433. Xiao, Y.F., et al., *Pericardial delivery of omega-3 fatty acid: a novel approach to reducing myocardial infarct sizes and arrhythmias*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(5): p. H2212-8.
434. Patel, J.V., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids: a necessity for a comprehensive secondary prevention strategy*. Vasc Health Risk Manag, 2009. **5**: p. 801-10.
435. Gilbert, K., et al., *Resolvin D1 Reduces Infarct Size Through a Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B Mechanism*. J Cardiovasc Pharmacol, 2015. **66**(1): p. 72-9.
436. Simopoulos, A.P., A. Leaf, and N. Salem, Jr., *Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids*. Ann Nutr Metab, 1999. **43**(2): p. 127-30.
437. Dalal, J.J., et al., *Role of omega-3 ethyl ester concentrate in reducing sudden cardiac death following myocardial infarction and in management of hypertriglyceridemia: an Indian consensus statement*. Indian Heart J, 2012. **64**(5): p. 503-7.
438. Tuttle, K.R., et al., *Comparison of low-fat versus Mediterranean-style dietary intervention after first myocardial infarction (from The Heart Institute of Spokane Diet Intervention and Evaluation Trial)*. Am J Cardiol, 2008. **101**(11): p. 1523-30.
439. de Lorgeril M, S.P., *Le pouvoir des oméga-3: une nouvelle médecine nutritionnelle* ed. Alpen. 2010.
440. Simopoulos, A.P., *The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids*. Biomed Pharmacother, 2002. **56**(8): p. 365-79.
441. Kinoshita, I., et al., *Antiarrhythmic effects of eicosapentaenoic acid during myocardial infarction--enhanced cardiac microsomal (Ca(2+)-Mg2+)-ATPase activity*. Jpn Circ J, 1994. **58**(12): p. 903-12.
442. Otsuji, S., et al., *Highly purified eicosapentaenoic acid attenuates tissue damage in experimental myocardial infarction*. Jpn Circ J, 1993. **57**(4): p. 335-43.
443. Li, Q., et al., *Eicosapentaenoic acid modifies lipid composition in caveolae and induces translocation of endothelial nitric oxide synthase*. Biochimie, 2007. **89**(1): p. 169-77.

444. Yokoyama, M., et al., *Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis*. Lancet, 2007. **369**(9567): p. 1090-8.
445. Richard, D., et al., *Infusion of docosahexaenoic acid protects against myocardial infarction*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2014. **90**(4): p. 139-43.
446. Gutierrez, A. and A.T. Look, *NOTCH and PI3K-AKT pathways intertwined*. Cancer Cell, 2007. **12**(5): p. 411-3.
447. Levy, B.D., *Resolvin D1 and Resolvin E1 Promote the Resolution of Allergic Airway Inflammation via Shared and Distinct Molecular Counter-Regulatory Pathways*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 390.
448. Gilbert, K., et al., *Resolvin D1, a metabolite of omega-3 polyunsaturated fatty acid, decreases post-myocardial infarct depression*. Mar Drugs, 2014. **12**(11): p. 5396-407.
449. Tran Quang T, G.A., Bourque-Riel V, Gilbert K, Charron T, Rousseau G, *Effect of Resolvin D1 on experimental myocardial infarction*. Experimental and clinical cardiology, 2014. **20**(11): p. 6704-6712
450. Zaloga, G.P., et al., *(N-3) long-chain polyunsaturated fatty acids prolong survival following myocardial infarction in rats*. J Nutr, 2006. **136**(7): p. 1874-8.
451. Castillo, R.L., C. Arias, and J.G. Farias, *Omega 3 chronic supplementation attenuates myocardial ischaemia-reperfusion injury through reinforcement of antioxidant defense system in rats*. Cell Biochem Funct, 2014. **32**(3): p. 274-81.
452. Harizi, H., J.B. Corcuff, and N. Gualde, *Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology*. Trends Mol Med, 2008. **14**(10): p. 461-9.
453. Harris, W.S., et al., *Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention*. Circulation, 2009. **119**(6): p. 902-7.
454. De Caterina, R., J.K. Liao, and P. Libby, *Fatty acid modulation of endothelial activation*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 213S-23S.
455. Kusumoto, A., et al., *Effects of arachidonate-enriched triacylglycerol supplementation on serum fatty acids and platelet aggregation in healthy male subjects with a fish diet*. Br J Nutr, 2007. **98**(3): p. 626-35.
456. Summers, L.K., et al., *Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity*. Diabetologia, 2002. **45**(3): p. 369-77.
457. Kark, J.D., et al., *Adipose tissue n-6 fatty acids and acute myocardial infarction in a population consuming a diet high in polyunsaturated fatty acids*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(4): p. 796-802.
458. Hussein, N., et al., *Long-chain conversion of [13C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men*. J Lipid Res, 2005. **46**(2): p. 269-80.
459. Lorgeril, M.d. <http://michel.delorgeril.info/cholesterol/cholesterol-et-statines/les-statines-inhibent-les-omega-3> 2015.
460. Toyama, K., et al., *Eicosapentaenoic Acid combined with optimal statin therapy improves endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease*. Cardiovasc Drugs Ther, 2014. **28**(1): p. 53-9.

461. Blais, C., *Les oméga-3 sont-ils tout puissants?* Les médecins du Québec, 2009. **44**(3).
462. Kromhout, D., et al., *Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work?* Eur Heart J, 2012. **33**(4): p. 436-43.
463. Hoogeveen, E.K., et al., *Effect of omega-3 fatty acids on kidney function after myocardial infarction: the Alpha Omega Trial.* Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(10): p. 1676-83.
464. Garcia Vicente, E., V. Del Villar Sordo, and Y.G.E.L. Garcia, *[Post-myocardial infarction depression]*. An Med Interna, 2007. **24**(7): p. 346-51.
465. Shetty, A., *Depression post-myocardial infarction.* Br J Psychiatry, 2007. **191**: p. 455-6; author reply 456-7.
466. Frasure-Smith, N., F. Lesperance, and M. Talajic, *Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival.* JAMA, 1993. **270**(15): p. 1819-25.
467. Wann, B.P., et al., *Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression.* J Psychiatry Neurosci, 2007. **32**(1): p. 11-6.
468. Wann, B.P., et al., *Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline.* J Psychopharmacol, 2009. **23**(4): p. 451-9.
469. Gilbert, K., et al., *Attenuation of post-myocardial infarction depression in rats by n-3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion.* Br J Nutr, 2013. **109**(1): p. 50-6.

