

Université de Montréal

**Protection pharmacologique par les récepteurs A_{2A} de
l'adénosine**
Cardioprotection et réduction des dommages amygdaliens

par
Matthieu Boucher

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
en Pharmacologie

Mai, 2005

© Matthieu Boucher, 2005



W
4
U58
2005
v.177

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Protection pharmacologique par les récepteurs A_{2A} de l'adénosine
Cardioprotection et réductions des dommages amygdaliens

présentée par :

Matthieu Boucher

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Audrey Claing, présidente-rapporteure

Dr Guy Rousseau, directeur de recherche

Dr René Cardinal, co-directeur de recherche

Dre Michèle Brochu, membre du jury

Dr John Gordon Kingma, examinateur externe

Dr Pierre Moreau, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'effet bénéfique de la reperfusion du tissu myocardique ischémique est atténué par des phénomènes délétères, appelés lésions de reperfusion, se produisant durant cette période. En intervenant avec des agents pharmacologiques, il est possible de réduire ces lésions ainsi que la taille de l'infarctus. Parmi ces différents agents, les agonistes des récepteurs A_{2A} de l'adénosine se sont avérés efficaces à engendrer cette protection. Toutefois les mécanismes intracellulaires sous-jacents à cette cardioprotection demeurent encore inconnus. L'infarctus du myocarde a été généré en effectuant l'occlusion de l'artère antérieure descendante gauche chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande anesthésié pour une durée de 30 minutes suivie d'une reperfusion de cinq heures. Quatre groupes ont été constitués : 1) groupe témoin, 2) groupe recevant un agoniste sélectif des récepteurs A_{2A} de l'adénosine, le CGS21680 (0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$), cinq minutes avant l'initiation de la reperfusion (groupe Précoce; Early), 3) groupe recevant l'agoniste cinq minutes après l'initiation de la reperfusion (groupe Tardif; Late) et 4) groupe recevant l'agoniste simultanément à un inhibiteur de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K; LY294002, 1,66 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$) cinq minutes avant l'initiation de la reperfusion (Early + LY). Tous les traitements étaient d'une durée de 120 minutes. Le traitement précoce (Early) pharmacologique avec un agoniste spécifique des récepteurs A_{2A} de l'adénosine a permis de réduire significativement la taille de l'infarctus. De plus, cette protection était dépendante de la PI3K. En augmentant rapidement son activation et en réduisant aussi brusquement l'activité de l'enzyme de mort cellulaire caspase-3, la cardioprotection était générée.

Par ailleurs, cette même protection était présente à 72 heures de reperfusion (protection soutenue) dans un modèle identique chez le rat Sprague-Dawley anesthésié. Cette protection n'était seulement observée que dans le groupe Précoce (Early), la réduction significative des dommages étant absente au niveau du groupe Tardif (Late). Par ailleurs, la diminution des dommages était dépendante de la voie impliquant la protéine

Akt. La protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB) a été rapidement activée dans les deux groupes traités mais ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans cette cardioprotection. De plus, l'expression de la protéine de choc thermique Hsp27 s'est avérée augmentée dans les deux mêmes groupes traités pharmacologiquement, excluant son implication dans la génération de la cardioprotection soutenue.

En parallèle, la réduction de synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α s'avère efficace à réduire l'apoptose dans l'amygdale, une structure cérébrale du système limbique impliquée dans la dépression. Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine possèdent de puissantes propriétés anti-inflammatoires, réduisant la production de TNF α . Le même protocole expérimental précédemment décrit a été utilisé chez le rat anesthésié. Après 72 heures de reperfusion et un traitement Précoce (Early) avec l'agoniste A_{2A}, une réduction des processus apoptotiques dans l'amygdale a été constatée. Par ailleurs, l'effet anti-inflammatoire de ces récepteurs via une diminution de synthèse de TNF α pourrait être responsable de cette régression de l'apoptose.

Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine pourrait donc constituer une cible pharmacologique pour réduire efficacement non seulement la taille de l'infarctus mais aussi l'apoptose post-infarctus au niveau de l'amygdale et ultimement la dépression.

Mots-clés : Récepteurs A_{2A} de l'adénosine, infarctus du myocarde, lésions de reperfusion, cardioprotection, apoptose, dépression post-infarctus, myocarde, amygdale

Abstract

The beneficial effect of ischemic myocardial tissue reperfusion is attenuated by deleterious phenomena, reperfusion injuries, happening during this period. With pharmacological agents, it is possible to reduce these lesions as well as the infarct size. Among these different agents, A_{2A} adenosine receptor agonists have been found to be effective in generating this protection. However, the intracellular signalling pathways underlying this cardioprotection are unknown. Myocardial infarction was generated by occluding the left anterior descending coronary artery of the anesthetized New-Zealand white rabbit for 30 minutes followed by five hours of reperfusion. Four groups were constituted: 1) Control group, 2) Early group receiving a selective A_{2A} adenosine receptor agonist, CGS21680 (0.2 µg/kg/minute), five minutes before the onset of reperfusion (Early), 3) Late group receiving the same agonist but five minutes after the onset of reperfusion (Late), and 4) Early group receiving simultaneously the agonist and a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor (LY294002, 1.66 µg/kg/minute) five minutes before the onset of reperfusion. All treatments lasted 120 minutes. The early (Early) pharmacological treatment with the A_{2A} adenosine receptor agonist significantly reduced the infarct size. In addition, this protection was PI3K-dependent. By rapidly enhancing its activation and by reducing cell death enzyme caspase-3 activity, the cardioprotection is generated.

Moreover, this protection was present at 72 hours of reperfusion (sustained protection) in an identical model in the anesthetized Sprague-Dawley rat. This protection was only observed in the Early group and this significant damage reduction was absent in the Late group. As well, the damage reduction was dependent on a pathway involving Akt. The cAMP response element binding protein (CREB) was rapidly activated in both treated groups but did not seem to play an important role in this cardioprotection. In addition, heat shock protein Hsp27 expression was enhanced in the same two treated groups, excluding its implication in the sustained cardioprotection generation.

In parallel, synthesis of pro-inflammatory cytokine like $\text{TNF}\alpha$ is effective in reducing apoptosis in the amygdala, a limbic system member implicated in depression. Moreover, A_{2A} adenosine receptors possess powerful anti-inflammatory properties by reducing $\text{TNF}\alpha$ production. Following 72 hours of reperfusion and an early treatment with the A_{2A} adenosine receptor agonist (Early), apoptotic process reductions were observed in the amygdala. Additionally, the anti-inflammatory effect of these receptors via $\text{TNF}\alpha$ reduction seems to be responsible for apoptosis regression.

A_{2A} adenosine receptors could represent a pharmacological target to efficiently reduce myocardial infarct size and post-infarction apoptosis in the amygdala and ultimately depression.

Keywords: A_{2A} adenosine receptors, myocardial infarction, reperfusion injury, cardioprotection, apoptosis, post-infarction depression, myocardium, amygdala

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1	2
Le myocarde	2
1.1 Infarctus du myocarde	2
<i>1.1.1 Ischémie</i>	2
1.1.1.1 Définition	2
1.1.1.2 L'apport et la demande.....	3
1.1.1.2.1 Apport	3
1.1.1.2.2 Demande	6
1.1.1.2.3 Équilibre bouleversé lors de l'ischémie	7
1.1.1.3 Susceptibilité du susendocarde par rapport au subépicarde.....	8
1.1.1.4 Conséquences : biochimie et pathologie de l'ischémie.....	10
<i>1.1.2 Reperfusion</i>	13
1.1.2.1 Définition	13
1.1.2.2 Lésions de reperfusion	13
1.1.2.2.1 Lésions de reperfusion létales	14
1.1.2.2.1.1 Neutrophiles	14
1.1.2.2.1.2 Plaquettes	15
1.1.2.2.1.3 Surcharge calcique	16
1.1.2.2.1.4 Radicaux libres.....	18
1.1.2.2.1.5 Apoptose	20
1.1.2.2.2 Lésions de reperfusion non-létales.....	22
1.1.2.2.2.1 Stunning myocardique	22
1.1.2.2.2.2 Arythmies de reperfusion.....	23
<i>1.1.3 Somme des effets : l'infarctus du myocarde</i>	24

1.1.3.1	Apparition d'un infarctus du myocarde : occlusion d'une artère coronaire	24
1.1.3.2	Progression de l'infarctus.....	24
1.1.3.2.1	Phénomène du front de vague (« Wave Front »)	25
1.1.3.2.2	Déterminants de l'infarctus	26
1.1.3.2.3	Aspect d'un infarctus	26
Chapitre 2	29
Le cerveau	29
2.1 Dépression post-infarctus du myocarde	29
2.1.1	<i>Dépression</i>	29
2.1.1.1	Implication de l'amygdale.....	30
2.1.2	<i>Infarctus du myocarde et dépression post-infarctus</i>	32
2.1.2.1	Dépression et maladie cardiovasculaire	32
2.1.2.2	Mécanismes.....	33
2.1.2.2.1	Hyperactivité de l'axe hypothalamique-pituitaire-adrénocortical et du système adrénocortical	34
2.1.2.2.2	Variabilité du rythme cardiaque diminuée.....	34
2.1.2.2.3	Vulnérabilité ventriculaire et ischémie myocardique	35
2.1.2.2.4	Réactivité plaquettaire accrue	35
2.1.2.3	Amygdale et dépression post-infarctus : nouveau mécanisme	36
Chapitre 3	39
L'adénosine et ses récepteurs	39
3.1 Adénosine	39
3.2 Récepteurs	42
3.2.1	<i>Récepteurs A_1 de l'adénosine</i>	43
3.2.2	<i>Récepteurs A_{2A} de l'adénosine</i>	47
3.2.3	<i>Récepteurs A_{2B} de l'adénosine</i>	51
3.2.4	<i>Récepteurs A_3 de l'adénosine</i>	54

Chapitre 4	58
Protéines et signalisation	58
4.1 Apoptose	58
4.1.1 Voie extrinsèque (récepteurs de mort)	59
4.1.2 Voie intrinsèque (mitochondrie et noyau).....	61
4.1.2.1 Mitochondrie.....	61
4.1.2.2 Noyau	64
4.2 Phosphatidylinositol 3-kinase et Akt	65
4.2.1 Phosphatidylinositol 3-kinase	65
4.2.2 Akt	68
4.3 Protéine de choc thermique (Heat Shock Proteins)	71
4.3.1 Famille Ubiquitine	71
4.3.2 Famille Hsp10.....	71
4.3.3 Famille des petites Hsp	72
4.3.4 Famille Hsp40.....	72
4.3.5 Famille Hsp60.....	73
4.3.6 Famille Hsp70.....	73
4.3.7 Famille Hsp90.....	74
4.3.8 Famille Hsp110.....	74
4.4 Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB)	75
4.4.1 Structure de CREB	75
4.4.2 Activation de CREB.....	77
4.4.2.1 Phase de salve (« Burst phase »).....	77
4.4.2.2 Phase d'atténuation	78
4.4.2.3 Phase réfractaire	78
4.4.3 Transcription génique.....	79
4.4.4 Protéines similaires à CREB.....	80
4.4.4.1 CREM	80

4.4.4.2	ATF-1	80
Chapitre 5	82
Protection pharmacologique	82
5.1 Protection pharmacologique cardiaque	82
5.1.1	<i>Processus cardioprotectifs</i>	82
5.1.1.1	Préconditionnement.....	82
5.1.1.2	Postconditionnement	84
5.1.1.3	Interventions post-ischémiques	87
5.1.2	<i>Possibilité de thérapie cardioprotectrice post-ischémique</i>	88
5.1.2.1	Facteurs pour une cardioprotection post-ischémique.....	88
5.1.2.2	Cardioprotection aiguë et soutenue	90
5.1.3	<i>Propriétés cardioprotectrices de l'adénosine et de ses récepteurs</i>	92
5.1.3.1	Récepteur A ₁ de l'adénosine	93
5.1.3.2	Récepteur A _{2A} de l'adénosine	94
5.1.3.3	Récepteur A ₃ de l'adénosine	98
5.1.3.4	Études cliniques : adénosine et agonistes spécifiques.....	99
5.1.3.4.1	AMISTAD & AMISTAD II	99
5.1.3.4.2	ATTACC.....	100
5.1.3.4.3	ADMIRE	101
5.1.3.4.4	Consensus des études	101
5.1.4	<i>Cardioprotection post-ischémique et protéines</i>	102
5.1.4.1	PI3K et Akt	102
5.1.4.2	Apoptose	105
5.1.4.3	Hsp	106
5.1.4.4	CREB	107
5.2 Protection pharmacologique du cerveau : nouveau concept	109
5.2.1	<i>Inflammation, cytokines et dépression post-infarctus</i>	109
Chapitre 6	114

Hypothèses	114
6.1 Hypothèse 1 : Cardioprotection aiguë dépendante de la PI3K.....	114
6.2 Hypothèse 2 : Cardioprotection soutenue.....	115
6.3 Hypothèse 3 : Régression de l'apoptose post-infarctus	116
Chapitre 7	118
Méthodologie	118
Chapitre 8	119
Journal of Cardiovascular Pharmacology (2004)	119
Chapitre 9	145
Journal of Cardiovascular Pharmacology (2005)	145
Chapitre 10	173
Apoptosis (2005)	173
Chapitre 11	199
Discussion.....	199
11.1 Modèles expérimentaux.....	199
11.2 Protection pharmacologique du coeur : réduction de la taille de l'infarctus	
.....	201
11.2.1 Cardioprotection aiguë.....	201
11.2.2 Cardioprotection soutenue.....	203
11.2.3 Dosage pharmacologique et fenêtre thérapeutique	205
11.2.4 Autres effets.....	206
11.2.5 Possibilité d'une cardioprotection post-ischémique clinique.....	207
11.2.6 Signalisation.....	207
11.2.6.1 PI3K et Akt	207
11.2.6.2 Caspase-3 et apoptose	211
11.2.6.3 Hsp	214
11.2.6.4 CREB	216
11.2.6.5 Intégration des voies et vue générale	218

11.3 Protection pharmacologique du cerveau : régression de l'apoptose dans l'amygdale en situation post-infarctus du myocarde.....	221
<i>11.3.1 Apoptose et amygdale</i>	<i>221</i>
<i>11.3.2 Hypothèses de l'inflammation et de réduction intracérébrale.....</i>	<i>223</i>
<i>11.3.3 Implication au niveau de la dépression</i>	<i>227</i>
Conclusion.....	228
Bibliographie	229

Liste des tableaux

Tableau 3.1 Principaux ligands des différents récepteurs de l'adénosine.....	44
--	----

Liste des figures

Figure 1.1 Équilibre entre l'apport et la demande.....	4
Figure 1.2 Différences entre le débit sanguin en fonction de la région du myocarde étudié.....	8
Figure 1.3 Représentation schématique d'une paroi myocardique soumise à une ischémie via l'occlusion de son artère coronarienne.....	25
Figure 2.1 A) Représentation sagittale du cerveau	31
Figure 2.1 B) Localisation de l'amygdale.....	31
Figure 3.1 Structure moléculaire de l'adénosine.....	39
Figure 3.2 Synthèse, métabolisme et élimination de l'adénosine.....	40
Figure 3.3 Représentation schématique du récepteur A_{2A} de l'adénosine.....	48
Figure 4.1 Voie extrinsèque de l'apoptose.....	60
Figure 4.2 Voie intrinsèque apoptotique via la mitochondrie.....	62
Figure 4.3 Différentes voies de signalisation impliquant la PI3K et Akt	70
Figure 4.4 Schéma de la structure de CREB, CREM et ATF-1.....	76
Figure 5.1 Représentation schématique du préconditionnement.....	83
Figure 5.2 Représentation schématique du postconditionnement.....	85
Figure 5.3 Représentation schématique d'une intervention post-ischémique.....	87
Figure 11.1 Schéma de l'intégration des différentes voies de signalisation.....	219

Liste des abréviations

$\Delta\Psi$: Potentiel mitochondrial interne

A_{2A}R : Récepteur A_{2A} de l'adénosine

AB-MECA : N⁶-4-aminobenzyl
adénosine-5'-N-méthyluronamide

ADMIRE : AMP579 Delivery for
Myocardial Infarction Reduction

ADN : Acide désoxyridonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AIF : Apoptosis inducing factor

Akt : Protéine kinase B (PKB)

AMISTAD : Acute Myocardial Infarction
STudy of Adenosine

AMP579 : [1S-[1a,2b,3b,4a(S)]]-4-[7-[[2-
(3-chloro-2-thiényl)-1-méthylpropyl]
amino]-3H-imidazo[4,5-b]pyridyl-3-
yl]cyclopentane carboxamide

AMP : Adénosine monophosphate

AMPc : AMP 3'-5'-cyclique

ANT : Translocateur de nucléotide
adénine

APAF-1 : Apoptosis proteases activating
factor-1

AR : Area at risk

ARN : Acide ridonucléique

ARNi : ARN d'interférence

ARNm : ARN messenger

ATF-1 : Activating transcription factor 1

ATL-146e : Acide 4-[3-[6-amino-9-(5-
éthylcarbamoyle)-3,4-dihydroxy-tétra-
hydro-furan-2-yl]-9H-purin-2-yl]-prop-2-
ynyl]-cyclohexanecarboxylique méthyl
ester

ATTACC : ATTenuation by Adenosine
of Cardiac Complications

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

BH : Bcl-2 homology domain

BSA : Bovine serum albumin

bZIP : Domaine en zipper de leucine basique

cAMP : 3'-5'-cyclic AMP

CBP : CREB-binding protein

CCPA : 2-chloro-N⁶-cyclopentyl adénosine

CDK : Cyclin-dependent kinase

CGS15943 : 9-chloro-2-(2-furanyl)-[1,2,4]-triazolo-[1,5-c]-quinazolin-5-amine

CGS21680 : 2-p-(2-Carboxyéthyl)phenéthylamino-5'-N-éthylcarboxamido adénosine

CHO : Chinese hamster ovary cells

CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire

CHA : N⁶-cyclohexyladénosine

Cl-IB-MECA : 2-chloro-N⁶-3-iodobenzyl adénosine-5'-N-méthyluronamide

CPA: N⁶-cyclopentyladénosine

CP-532,903 : Acide (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3-amino-5-[6-(2,5-dichlorobenzylamino)purin-9-yl]-4-hydroxy tétrahydrofuran-2-carboxylic méthylamide

CRE : cAMP-response element

CREB : cAMP-response element binding protein

CREM : cAMP-response element modulator

CT-1 : Cardiotrophine-1

COX-2 : Cyclooxygénase de type 2

DAG : diacylglycérol

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPCPX : 1,3-dipropyl-8-cyclopentyl xanthine

DD : Domaine de mort (Death Domain)

DED : Death effector domain

EC₅₀ : Concentration efficace pour une réponse à 50 % du maximum

eNOS : Endothelial nitric oxide synthase

ERK : Extracellular-signal regulated kinase

FADD : Fas-associated death domain

FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide

GABA: Acide γ -hydroxybutyrique

GRK: G-protein coupled receptor kinase

GSK3 : Glycogen synthase kinase 3

HENECA : 2-hexyn-1-yl-5'-(N-éthyle carboxamido)adénosine

HEK293 : Human endothelial kidney cells 293

I : Infarctus ou Infarct

IAB-MECA : N⁶-4-amino-3-iodobenzyl adénosine-5'-N-méthyluronamide

IAP : Inhibitors of apoptosis

IB-MECA: N⁶-3-Iodobenzyladénosine-5'-N-méthyluronamide

IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber à 50 %

IGF : Insulin growth factor

IL-1 β : Interleukine-1 β

IL-6: Interleukine-6

i.m.: Intra-musculaire

IMP : Inositolmonophosphate

IP₃ : Inositol-triphosphate

i.v.: Intra-veineux

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

K_{ATP} : canal potassique dépendant de l'ATP

K_d : Constante de dissociation ou moitié de la quantité maximale de récepteur pouvant être occupé par un ligand

kDa : Kilodalton

K_i: Constante d'inhibition

KID : Kinase-inducible modulating domain

K_m : Concentration d'un substrat qui entraîne 50 % de la vitesse maximum d'un enzyme

KO : Knock-out

KW-6002 : (E)-1,3-diéthyl-8-(3,4-diméthoxystyryl)-7-méthyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione

LAD : Artère antérieure descendante gauche

LY294002: 2-(4-morpholinyl)-8-phényl-4H-1-benzopyran-4-one

LV : Left ventricule

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MEK : MAPK kinase

MRS1595: 8-[4-[[[(4-cyano)phénylcarbamoylméthyl]oxy]phényl]-1,3-di-(n-propyl)xanthine-N,N-(2,3-diméthyl maléyl)hydrazide

MRS1754: 8-[4-[[[(4-cyano)phénylcarbamoylméthyl]oxy]phényl]-1,3-di-(n-propyl)xanthine

mTOR : Mamalian target of rapamycin

NADH : Nicotinamide dinucléotide

NECA : 5'-(N-éthylecarboxamido) adenosine

NF- κ B : Facteur nucléaire κ B

NGF : Nerve growth factor

NLS : Nucleus localisation signal

NO : Oxyde nitrique

p70S6K : p70 S6 kinase

p90RSK : p90 ribosomal ribosomal S6 kinase

PARP : Poly-(ADP-ribose) polymerase

PCR : Polymerase chain reaction

PDK-1 : phosphoinositide-dependent kinase-1

PENECA : 2-(3-hydroxy-3-phényl)propyn-1-yl-5'-(N-éthylecarboxamido) adenosine

PFK-2 : 6-phosphofructo-2-kinase

PGE₂ : prostaglandines E₂

PH : Domaine d'homologie à la pleckstrine

PHPNECA: 2-(3-hydroxy-3-phényl)propyn-1-yl-5'-(N-éthylecarboxamido) adenosine

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc ou Protéine kinase A

PKB : Protéine kinase B ou Akt

PKC : Protéine kinase C

PLA₂ : Phospholipase A₂

PLC : Phospholipase C

PP-1 : Protéine phosphatase-1

PT : Canal de perméabilité de transition

PtdIns-3-P : phosphoinositol-3-phosphate

PtdIns-3,4-P₂ : phosphoinositol-3,4-biphosphate

PtdIns-3,4,5-P₃ : phosphoinositol-3,4,5-triphosphate

RISK: Reperfusion injury salvage kinase

R-PIA : R-N⁶-(phénylisopropyl)-adénosine

RT-PCR : Reverse-transcriptase polymerase chain reaction

SCH58261 : 7-(2-phényléthyl)-5-amino-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidine

SH2 : 2^{ème} domaine d'homologie à Src

SPECT : Single-photon emission computed tomography

S-PIA: S-N⁶-(phénylisopropyl)-adénosine

TAF : TBP-activating factor

TATA : Séquence d'ADN riche en A et en T retrouvée dans la plupart des promoteurs de gènes eukaryotes et favorisant la liaison de la machinerie transcriptionnelle

TBP : TATA-binding protein

TBS-T : Tris-buffered saline + Tween 20

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TNFR : Récepteur du TNF

TRADD : TNFR-associated death domain

TTC : chlorure de triphényltétrazolium

TUNEL : Terminal dUTP nick-end labelling

VDAC : Voltage-dependent anion channel

VG : Ventricule gauche

VUF8504: 4-methoxy-*N*-[2-(2-pyridinyl)quinazolin-4-yl]benzamide

XAC: 8-[4-[[[(2-aminoéthyl)amino]carbonyl]méthyl]oxy]phényl]-1,3-dipropylxanthine

YVAD-cmk : Acétyl-Tyr-Val-Ala-Asp-chlorométhylcétone

ZM241385 : 4-[2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ylamino]-éthyl]phénol

ZR : Zone à risque

ZVAD-fmk : Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluorométhylcétone

*À ma copine, ma famille et mes amis...
sources de support et de motivation*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Guy Rousseau. Étant mon directeur de recherche, il a su me motiver durant les moments plus laborieux et a su m'inculquer une démarche scientifique que j'utiliserai toute ma vie. Il a été un directeur scientifique hors pair. Guy a également su me supporter durant ces cinq années, peu importe l'état de mon humeur. Il était disponible pour m'aider quelle que soit l'heure du jour ou de la nuit. Je lui en suis infiniment reconnaissant.

J'aimerais également remercier le Dr René Cardinal pour sa co-direction et son support financier. Le Docteur Cardinal a été capable de me faire aller plus loin et à ne pas m'arrêter en surface.

J'aimerais remercier le département de pharmacologie sans lequel ces études n'auraient pas été possibles.

Merci aussi à mes parents et grands-parents qui ont toujours cru en moi, qui ont toujours su m'aider et qui seront toujours là pour me supporter quels que soient mes choix. Je ne sais comment les remercier. Sans oublier ma belle-famille. Tant de discussions... simplement pour argumenter.

Finalement, j'aimerais remercier Stef pour son aide et son support dans le laboratoire... et comme amie. Sans toi Stef, la tâche aurait été bien plus ardue ! Il y a aussi mes amis Michel et Nadia pour les multiples encouragements et discussions. Sans oublier Julie, Maxime, Marie-Ève, Marie-Pier et tous les autres pour le support et les encouragements. J'aimerais remercier plus particulièrement ma copine Stéphanie. Elle m'a permis de terminer mes études de doctorat. Sans elle, je serais probablement encore à ce jour en train de travailler dans le laboratoire ! Merci Stéphanie pour ce que tu as fait pour moi, pour ce que tu fais encore et surtout pour les choses que tu feras pour moi dans l'avenir.

Introduction

Les maladies cardiovasculaires demeurent l'une des principales causes de décès dans les pays industrialisés. Celles-ci incluent entre autres l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque et l'infarctus du myocarde. L'infarctus du myocarde consiste en la mort des cellules provoquée par une occlusion complète d'une artère coronaire. L'irrigation sanguine du muscle cardiaque étant complètement arrêtée, une ischémie est ainsi provoquée. Afin de limiter les dommages occasionnés par l'ischémie, le moyen le plus efficace est de reperfuser les régions ischémiques. Des études ont démontré qu'une reperfusion précoce était efficace à limiter la taille de l'infarctus. Par contre, lors de la reperfusion, des phénomènes délétères surviennent. Ces phénomènes, appelés lésions de reperfusion, peuvent engendrer une augmentation de la taille de l'infarctus causée par des événements ayant lieu durant cette période. Parallèlement à ceci, une incidence plus élevée de dépression est observée suite à l'infarctus du myocarde. Cette pathologie est associée à la morbidité et à la mortalité en situations post-infarctus du myocarde.

Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine, des récepteurs couplés aux protéines G, ont démontré un potentiel cardioprotecteur, anti-inflammatoire et anti-apoptotique. Cependant, le mécanisme de cette protection pharmacologique est inconnu.

Les travaux réalisés au cours de ce projet avaient donc pour but d'évaluer le mécanisme permettant une protection pharmacologique par l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine du cœur post-ischémique et de l'amygdale au niveau du cerveau en situation post-infarctus du myocarde.

Chapitre 1

Le myocarde

1.1 Infarctus du myocarde

1.1.1 Ischémie

1.1.1.1 Définition

La racine du mot *ischémie* a pour source le mot grec *iskhaimos* qui signifie un arrêt de la circulation sanguine ou de la combinaison des mots *iskhein* et *haima* qui veulent dire respectivement conserver à l'arrière et sang. L'ischémie se définit donc comme étant une condition de privation d'oxygène secondaire à une perfusion sanguine réduite ou inadéquate en tenant compte de la demande myocardique en oxygène. Il est important de mentionner que non seulement une privation d'oxygène se fait ressentir mais aussi que la réduction de perfusion génère un déficit en substrats et en énergie dans le tissu. Cette situation produit par ailleurs une capacité insuffisante à dégager les métabolites potentiellement toxiques (CO_2 , lactate, H^+) du milieu. L'ischémie est donc le résultat d'un manque de perfusion sanguine engendrant un manque d'oxygène, un déficit énergétique et une incapacité à évacuer les métabolites.

Deux types d'ischémies cardiaques sont observés : 1) ischémie d'apport et 2) ischémie de demande (Ganz, 2001). Le premier type survient lorsque la perfusion coronarienne est réduite suite, par exemple, à une augmentation du tonus coronarien, à une agrégation plaquettaire anormale ou à la formation d'un thrombus. Ce type d'ischémie est responsable de l'infarctus du myocarde et de la majorité des épisodes d'angine instable. L'ischémie de demande quant à elle survient lorsque l'augmentation du débit coronarien demeure insuffisante pour pallier à la demande. Cette situation survient par exemple lors d'un effort physique important, une tachycardie ou encore une émotion subite.

En contraste et ce en raison d'une perfusion adéquate, il existe d'autres situations de réduction ou d'arrêt d'apport en oxygène : l'hypoxie et l'anoxie. Respectivement, ces deux conditions s'observent lors d'une réduction de la quantité d'oxygène (réduction de la pression partielle comme en hautes altitudes) et d'une absence complète d'oxygène (Neely, 1974). Ces situations peuvent avoir lieu en présence d'un débit coronarien normal.

1.1.1.2 L'apport et la demande

Le myocarde est en besoin constant en oxygène. En effet, battant en moyenne plus de deux milliards de fois durant une vie, le cœur et chacune de ses contractions demandent un acheminement constant d'oxygène vers les cardiomyocytes. Un équilibre entre l'apport et la demande en oxygène est donc essentiel pour permettre aux cardiomyocytes d'exécuter leurs fonctions.

1.1.1.2.1 Apport

Les facteurs influençant l'apport en oxygène sont le débit coronarien et la capacité de transport en oxygène du sang. Cette capacité de transport étant en général presque à son maximum, le déterminant clinique principal est le débit coronarien. Ce dernier est fonction de la phase diastolique de la contraction cardiaque et de la résistance vasculaire, qui elle-même est régulée par 1) les forces compressives extravasculaires, 2) des facteurs humoraux, 3) l'autorégulation, 4) le contrôle métabolique et 5) le contrôle neuronal (figure 1.1).

La phase diastolique constitue une importante période durant laquelle le myocarde est perfusé par les artères coronariennes (Ardehali, 1990). C'est à ce moment que les forces compressives extravasculaires et la résistance intravasculaire sont à leurs minimums et que le sang circule dans les artères. En systole, la pression intraventriculaire gauche (maximale au susendocarde et minimale à nulle au subépicarde) ainsi que la compression et le plissement des artères font en sorte que le tissu cardiaque en contraction empêche un débit

coronarien adéquat. Les forces de compression pourraient même entraîner une circulation sanguine rétrograde dans les artères coronariennes durant la systole (Morita, 1997). Ainsi, la phase diastolique demeure le seul moment où le myocarde est perfusé correctement.

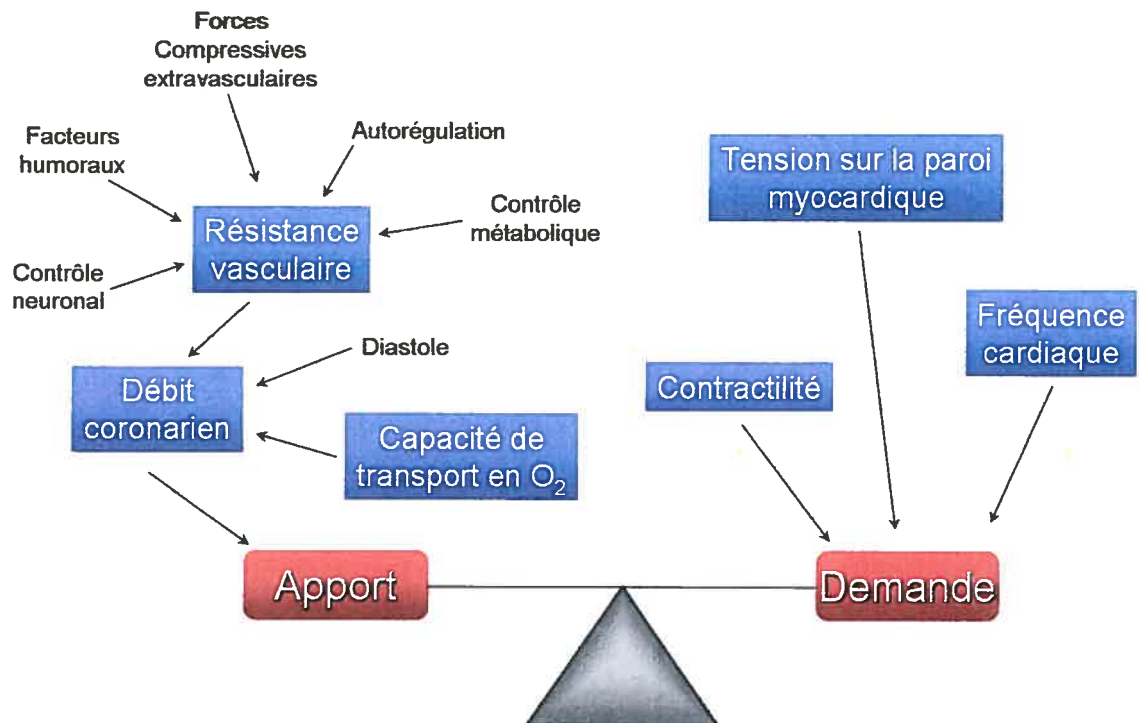


Figure 1.1. Équilibre entre l'apport et la demande. L'ischémie apparaît lorsque la demande excède l'apport (Adapté de (Ardehali, 1990).

Les facteurs humoraux constituent des substances circulantes ayant un impact sur l'apport sanguin au myocarde. En effet, des agents comme la bradykinine, l'angiotensine, les prostacyclines, le thromboxane et la sérotonine agissent sur l'endothélium vasculaire en favorisant un changement du débit coronarien (Ardehali, 1990; Antman, 2001).

L'autorégulation est un autre facteur déterminant dans l'apport sanguin coronarien. Elle est définie comme étant la capacité à maintenir une perfusion constante suite à un changement au niveau de la pression (Antman, 2001). La relation entre la perfusion et le

changement de pression est inverse afin de garder le débit constant : plus la pression diminue, plus la résistance augmente (vasoconstriction). Il demeure ardu d'étudier ce facteur *in vivo* étant donné qu'il est difficile de le dissocier de la pression de perfusion coronaire, de la pression aortique et de la post-charge ventriculaire (un déterminant de la consommation en oxygène). En effet, une diminution de la pression aortique entraînera une diminution de la post-charge et, concurremment, une réduction de la demande en oxygène. Le NO demeure probablement à ce jour la meilleure hypothèse pour expliquer l'autorégulation. À ce titre, l'inhibition de la génération de NO atténue la réponse autorégulatrice (Smith, 1993). Il a été suggéré que le contrôle myogénique pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans l'autorégulation. Il s'observe lors d'une contraction des muscles lisses suite à une augmentation de la pression intraluminale et permet un retour du débit sanguin à la normale. Sa contribution a été démontrée au niveau de l'autorégulation mais serait cependant minime (Rajagopalan, 1995).

Le contrôle métabolique demeure un des facteurs prépondérants dans le contrôle du débit coronarien. Le cœur doit ajuster sa consommation en oxygène en fonction de ce débit. Une relation directe existe entre cette consommation des cellules myocardiques et le débit coronarien. Cette connexion est due au fait que 1) les réserves d'oxygène du cœur sont très faibles, 2) le myocarde dépend presque exclusivement sur un métabolisme aérobique et 3) l'extraction d'oxygène du sang est maximale (saturation en oxygène faible dans le sang veineux) (Ardehali, 1990; Antman, 2001). La relation est telle que suite à un changement du métabolisme, une dilatation des artères coronariennes s'observe aussi rapidement qu'une seconde après ce changement. L'adénosine et le NO sont les deux principaux médiateurs du contrôle métabolique. L'adénosine et ses fonctions sont décrites au chapitre 3 (section 3.1). Le NO quant à lui augmente le débit coronarien en causant une vasodilatation. Par ailleurs, son inhibition réduit la réponse de dilatation (Duffy, 1999). D'autres médiateurs comme les prostaglandines (Duffy, 1999) et les canaux K_{ATP} (Brown, 1993) produisent également une vasodilatation lors d'un changement métabolique.

Le contrôle neuronal est un autre facteur dans le contrôle du débit coronarien. Les artères coronariennes épicaudiques sont innervées par des fibres des systèmes sympathiques et parasympathiques (Feigl, 1998). Une vasoconstriction sympathique est possible par les récepteurs α -adrénergiques. L'administration d'un antagoniste de ces récepteurs atténue la réponse vasoconstrictrice. Au contraire, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques de façon expérimentale entraîne une vasodilatation coronarienne. La stimulation parasympathique quant à elle entraîne généralement une vasodilatation des artères coronaires épicaudiques.

La durée de la phase diastolique et la résistance vasculaire, elle-même régulée par les forces compressives extravasculaires, des facteurs humoraux, l'autorégulation, le contrôle métabolique et le contrôle neuronal, constituent donc les médiateurs de l'apport en oxygène. Si l'équilibre est perturbé, l'apport est modifié. Évidemment, ce changement peut être nécessaire afin de pallier à la demande en oxygène.

1.1.1.2.2 Demande

La demande en oxygène est fonction de trois grands facteurs : 1) la fréquence cardiaque, 2) la contractilité et 3) la tension de la paroi myocardique (figure 1.1). La fréquence cardiaque demeure le facteur prépondérant dans la demande en oxygène. En effet, concurremment à une chronotropie augmentée dans un modèle de chien, la consommation en oxygène augmente (Boerth, 1969). La contractilité quant à elle est un autre déterminant majeur de la consommation d'oxygène et, donc, de la demande. Elle est influencée, par exemple, par le système nerveux autonome, la fréquence cardiaque, la température du corps ou par des stimuli inotropiques positifs (catécholamines ou calcium). Plus la contractilité ou la force de contraction est augmentée, plus la consommation et par le fait même la demande sont augmentées également. Finalement, la tension sur la paroi myocardique est un autre important facteur de demande en oxygène. Celle-ci est en

relation directe avec la consommation en oxygène : plus la tension augmente, plus la consommation s'élève afin de contrer cette force.

1.1.1.2.3 Équilibre bouleversé lors de l'ischémie

L'apport en oxygène et sa demande doivent absolument demeurer en équilibre sans quoi l'ischémie apparaît. En situation non-pathologique où les artères coronariennes sont saines, l'équilibre est maintenu et l'ischémie est moins probable. Le débit coronarien est facilement ajusté afin de maintenir un apport adéquat. Ce contrôle homéostatique est effectué par l'endothélium vasculaire et la musculature lisse. Plusieurs agents vasoactifs comme les catécholamines, la vasopressine, l'angiotensine et l'adénosine influencent le tonus vasculaire en agissant sur des récepteurs à la surface de l'endothélium (Ardehali, 1990; Antman, 2001). Celui-ci est également un élément clef dans le contrôle du débit. Il est responsable de la production de NO, de prostacycline ou d'endothéline qui influencent le débit. L'endothélium est de ce fait capable d'engendrer une augmentation du débit coronarien afin de palier à la demande en oxygène.

En situation pathologique, ce contrôle n'est plus aussi efficace. La présence de plaques athéromateuses dans les artères provoque une dysfonction endothéliale, la réponse vasodilatatrice étant réduite. Cette dysfonction apparaît rapidement dans la maladie coronarienne et est accrue par la présence des facteurs de risques (dyslipidémie, hypertension artérielle non-contrôlée, diabète, tabagisme, génétique, manque d'exercice, etc.).

Ce mauvais contrôle du débit coronarien provoque l'apparition de l'ischémie. La demande est supérieure à l'apport en oxygène, phénomène engendrant les signes et symptômes chez le patient : douleurs rétro-sternales, irradiation de cette douleur aux bras, au cou et à la mâchoire, anxiété, essoufflement, etc.

1.1.1.3 Susceptibilité du susendocarde par rapport au subépicarde

La distribution de la circulation sanguine est différente durant la systole et la diastole dans le susendocarde (figure 1.2). Le susendocarde, en comparaison au subépicarde, est plus susceptible à une réduction de l'apport sanguin et à l'ischémie (Downey, 1984). Les forces compressives sont beaucoup plus importantes au niveau de cette région du myocarde et celles-ci font en sorte de réduire le débit sanguin local (Downey, 1974) en formant une différence de pression (« waterfall » vasculaire) (Downey, 1975). Ce phénomène suggère que lorsque la pression à l'intérieur du tissu ou la pression veineuse est supérieure à la

pression artérielle (gradient de pression est nul à négatif), le débit sanguin local est réduit ou arrêté. Ainsi, le susendocarde est soumis à de telles forces compressives lors de la systole que le débit sanguin est réduit ou arrêté et cette région du myocarde n'est pas perfusée. Au contraire, lors de la diastole, le phénomène est inversé et le susendocarde est perfusé convenablement. Malgré les distinctions qui subsistent entre le susendocarde et le subépicarde au niveau de la perfusion aux différentes phases de la contraction, les deux régions, en fin de cycle cardiaque, ont été perfusées adéquatement (mais à des moments distincts du cycle). La circulation veineuse pourrait être un autre facteur impliqué dans le

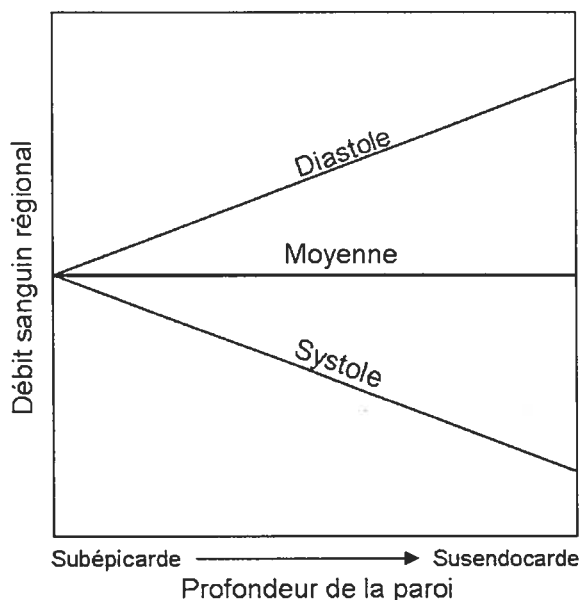


Figure 1.2. Différences dans le débit sanguin en fonction de la région du myocarde étudié. Le débit sanguin au niveau du susendocarde est plus élevé en diastole tandis que celui-ci est réduit considérablement lors de la systole. Cette manifestation est le résultat du « waterfall » vasculaire (Adapté de Downey (1984)).

« waterfall » vasculaire et la progression des dommages au myocarde. L'ischémie étant une différence d'apport en oxygène par rapport à la demande, il est à noter que l'ischémie consitue aussi un mauvais lavage des métabolites (lors de l'arrêt de la circulation coronarienne) par la circulation veineuse. Évidemment, ce mauvais lavage ne peut être présent sans l'occlusion coronarienne lors de l'ischémie. L'influence de la circulation veineuse au niveau de l'ischémie est cependant mal définie. L'arrêt de la circulation coronarienne artérielle n'entraîne pas un arrêt instantané de la circulation veineuse. En effet, Chilian et Marcus (Chilian, 1984) ont démontré que la circulation veineuse persistait après l'arrêt de la circulation artérielle (probablement par la capacité veineuse). Leur modèle canin utilisé n'était pas un infarctus du myocarde mais plutôt un blocage cardiaque de l'influx nerveux entraînant des périodes de diastole anormalement élevée. Substentiellement différent de l'infarctus, la période d'arrêt de la circulation artérielle est moins longue. Lors d'une ischémie myocardique prolongée comme l'infarctus du myocarde, le phénomène n'est que transitoire et la circulation veineuse est stoppée si l'arrêt de la circulation artérielle persiste. L'influence de la circulation veineuse ne serait donc pas un facteur prédominant dans la progression des dommages, le manque d'oxygène étant le facteur le plus important. Davantages de travaux seraient nécessaires afin de valider cette hypothèse.

En ce qui a trait aux besoins énergétiques du susendocarde, ceux-ci sont plus élevés en comparaison au subépicarde. Il a été démontré que la pression de l'oxygène dans le susendocarde était plus basse et que cette région du myocarde consomme plus rapidement l'oxygène que le subépicarde (Kirk, 1964; Gamble, 1974; Weiss, 1978). Une évidence métabolique, l'accumulation de lactate, a permis de supporter cette affirmation, à savoir que le susendocarde possède un métabolisme plus rapide (Dunn, 1975). Le susendocarde possède donc des besoins métaboliques plus élevés que le subépicarde.

La circulation collatérale est également un facteur distinguant les différentes couches du myocarde. Cette circulation sanguine est présente grâce à la formation

d'anastomoses entre les différentes artères. Ainsi, lors de l'occlusion d'une artère principale, le débit sanguin de la région affectée n'est pas nul. Il peut subsister, comme chez le chien, un débit entre 10 et 20 % du débit avant l'occlusion. Cette circulation provoque un délai avant la mort du tissu cardiaque (en comparaison avec un myocarde sans circulation collatérale) (Rivas, 1976) étant donné l'acheminement d'une certaine quantité de sang et d'oxygène à la région normalement perfusée par l'artère en occlusion. Ce débit collatéral est différent entre le susendocarde et le subépicarde, le premier étant moins bien perfusé. En effet, des évidences ont démontré que cette région recevait environ du tiers à la moitié du débit collatéral du subépicarde (Downey, 1973).

D'un autre côté, malgré le fait que le susendocarde semble posséder un certain niveau d'adaptation biochimique contre le déficit de circulation sanguine (glycogène, myoglobine et capacité mitochondriale plus élevée), il semble que celui-ci soit moins tolérant à une ischémie. Comme il sera discuté dans la section 1.1.3.2 (Progression de l'infarctus), les dommages liés à l'ischémie et à l'infarctus progressent en front de vague du susendocarde vers le subépicarde et ce, en fonction de la durée de l'ischémie.

En somme, les forces compressives sont beaucoup plus importantes au niveau du susendocarde, le soumettant à un métabolisme et à une consommation en oxygène plus élevée. Simultanément, le débit sanguin dans cette région semble être plus faible que dans le subépicarde, tant au niveau de la circulation coronarienne que de la circulation collatérale. De plus, malgré les phénomènes d'adaptation du susendocarde, il semble que celui-ci soit moins tolérant à l'ischémie que le subépicarde. Le susendocarde constitue donc une région du myocarde distincte du subépicarde et, de par ces différences, cette couche du tissu cardiaque est plus vulnérable à l'ischémie.

1.1.1.4 Conséquences : biochimie et pathologie de l'ischémie

Biochimiquement, l'ischémie se traduit par un arrêt de la phosphorylation oxydative, la principale source de phosphates hautement énergétiques (Hillis, 1977a,

1977b, 1977c). Dans des conditions normales, les cardiomyocytes utilisent les acides gras et le glucose. La β -oxydation (acides gras; 60 à 90 % de l'énergie totale générée) et la glycolyse aérobie (glucose) permettent la génération d'acétyl-coenzyme A. Celui-ci est utilisé dans le cycle de l'acide citrique et dans la phosphorylation oxydative, menant à la génération d'ATP via la production de NADH et FADH₂. La phosphorylation oxydative étant arrêtée par manque d'oxygène lors de l'ischémie, la génération d'ATP ne s'effectue que par la glycolyse anaérobie. Ceci est dû au fait que l'oxygène est l'accepteur final des électrons durant la phosphorylation oxydative. Le taux de glycolyse à l'intérieur des cellules myocardiques augmente de façon significative durant l'ischémie. Cette hydrolyse du glucose génère de l'ATP mais en quantité insuffisante (environ 7 % des phosphates hautement énergétiques nécessaires) (Kobayashi, 1979) au fonctionnement adéquat des cellules cardiaques, arrêtant ainsi la contraction et induisant l'apparition de dommages cellulaires.

La sévérité des dommages est proportionnelle à la durée de l'ischémie. En effet, plus la durée de l'occlusion est longue, plus l'étendue des dommages est importante (Reimer, 1977; Reimer, 1979; Lavallée, 1983). Durant les premières minutes de l'ischémie, des changements ultrastructuraux tels qu'un léger œdème cellulaire et mitochondrial, une relaxation et un étirement des myofibrilles, une perte progressive des particules de glycogène et une légère agglomération de la chromatine ont lieu. Ces changements dans l'ultrastructure cellulaire sont réversibles (Jennings, 1974a, 1976; Jennings, 1985).

La prolongation de la durée de l'ischémie provoque une transition de dommages réversibles vers l'irréversibilité. Des dommages tels que l'agglomération de la chromatine et la perte de granules de glycogène importante, l'incapacité de la cellule à réguler le passage des ions et de l'eau au travers de sa membrane, l'œdème cellulaire et mitochondrial, la ruptures de bandes Z et de myofibrilles, l'entrée massive de Ca²⁺ dans le sarcoplasme activement accumulé par la mitochondrie et précipité sous forme de phosphate

de calcium, la diminution marquée des quantités de lysosomes, l'apparition de densités amorphes dans la matrice mitochondriale et la rupture des unités trilaminaires de la membrane du sarcolemme apparaissent (Jennings, 1974a; Hearse, 1977). La transition n'a pas lieu simultanément pour toutes les cellules myocardiques, celle-ci débutant dans la région susendocardique après environ vingt minutes d'ischémie. Ils évoluent par ailleurs, chez le chien, selon un « front de vague » (section 1.1.3.2.1, Phénomène du front de vague) vers la surface subépicardique. Ces phénomènes irréversibles ou nécrose (catastrophe métabolique cellulaire où la cellule meurt par œdème et lyse de sa membrane plasmique) sont un point de non-retour : la cellule meurt et libère son contenu intracellulaire dans l'environnement, source de recrutement de cellules inflammatoires comme les polymorphonucléaires.

Lorsque l'ischémie est assez sévère et persistante, la nécrose de coagulation apparaît. Ce type de nécrose est principalement présent dans la région centrale de l'infarctus et résulte en l'arrêt de la contraction des cellules musculaires ischémiques dans un état passif et relâché (Kloner, 1983). Par microscopie, il est possible de caractériser ce type de nécrose par une diminution du volume nucléaire, de l'œdème cellulaire et, après un certain délai, par une infiltration neutrophilique et éosinophilique. En contraste, lors de la reperfusion (section 1.1.2, Reperfusion), la nécrose en bandes de contraction apparaît. Ce type de nécrose est caractéristique de la reperfusion étant donné qu'elle est essentiellement causée par une entrée massive de calcium à l'intérieur des cellules (Schoen, 1999). Cette entrée entraîne l'arrêt et la mort de cellules dans un état contracté. Ce phénomène est principalement observé en périphérie d'infarctus non-transmuraux (Miyazaki, 1987). Ce type de nécrose est caractérisé par des dommages mitochondriaux avec dépôts calciques et l'hypercontraction de myofibrilles.

Il est possible de freiner la progression des dommages en reperfusant le tissu ischémique par thrombolyse, par pontage cardiaque ou par angioplastie coronarienne transluminale (Antman, 2001). Cliniquement, les délais entre le début de l'occlusion et

l'arrivée du patient atteint à l'hôpital sont en général impossibles à éviter, entraînant ainsi des dommages au myocarde ischémique.

1.1.2 Reperfusion

1.1.2.1 Définition

La reperfusion consiste à rétablir la circulation sanguine au niveau du tissu ischémique et, par le fait même, à le réapprovisionner en oxygène. La reperfusion (arrêt de l'ischémie) est donc bénéfique et demeure à ce jour la seule thérapie possible permettant de limiter les dommages dus à l'ischémie et de rétablir l'équilibre entre l'apport et la demande (section 1.1.1.2, L'apport et la demande).

Il a été démontré que la taille de l'infarctus était proportionnelle à la durée de l'ischémie et que celle-ci pouvait être limitée en reperfusant rapidement le myocarde. Lavallée et coll. (Lavallée, 1983) ont observé que la taille de l'infarctus était moins importante dans un groupe où la reperfusion se produisait une heure après le début de l'ischémie en comparaison à un groupe où l'ischémie était d'une durée de trois heures.

Il a cependant été démontré expérimentalement par plusieurs groupes que, lors de la reperfusion, des phénomènes délétères au myocarde se produisaient. Ces phénomènes sont appelés lésions de reperfusion. Étonnamment, ils provoquent un accroissement de la taille de l'infarctus malgré la présence de la reperfusion.

1.1.2.2 Lésions de reperfusion

Comme mentionné précédemment, la reperfusion entraîne un accroissement paradoxal de la taille de l'infarctus. En effet, de Lorgeril et coll. (de Lorgeril, 1990b) ont observé que la taille de l'infarctus augmente avec la durée de la période de reperfusion, cette taille est de 22 % (de la zone à risque) à trois heures de reperfusion et se stabilise à environ 35 % à six heures de reperfusion. Ces phénomènes, appelés lésions de reperfusion,

sont caractérisés par certains événements délétères pour le myocarde. Deux types principaux de lésions de reperfusion existent, soit les lésions létales (section 1.1.2.2.1) et non-létales (section 1.1.2.2.2). Les lésions létales entraînent la mort de cellule et de tissu encore viables au moment de la reperfusion. Ces événements incluent 1) l'accumulation de neutrophiles et 2) de plaquettes, 3) la surcharge calcique, 4) le stress oxydatif (radicaux libres) et 5) l'apoptose. Cette liste n'est pas restrictive et pourrait s'allonger avec la découverte de nouveaux mécanismes. En ce qui a trait aux lésions non-létales, elles incluent principalement le « stunning » myocardique. Finalement, les arythmies de reperfusion de par leur nature délétère n'entraînent généralement pas un accroissement de la taille de l'infarctus et peuvent donc être incluses au niveau des lésions non-létales.

1.1.2.2.1 Lésions de reperfusion létales

1.1.2.2.1.1 Neutrophiles

Les neutrophiles s'accumulent rapidement dans les régions ischémiques reperfusées du cœur. Des études échelonnées sur plus de trois décennies ont démontré l'importance de l'apparition caractéristique de facteurs inflammatoires aigus et, donc, de l'activation et de la séquestration des neutrophiles suite à une ischémie (Sommers, 1964a; Mullane, 1984; Go, 1988; Smith III, 1988). Ceux-ci s'accumulent au pourtour de l'infarctus et s'associent à la nécrose en bande de contraction. De Lorgeril et coll. (de Lorgeril, 1990b) ont démontré l'importante accumulation de neutrophiles dans les régions ischémiques lors des premières heures de reperfusion, l'accumulation dans les régions non-ischémiques étant très faible à nulle. Dans un modèle canin d'infarctus du myocarde reperfusé, ce groupe a montré un taux d'accumulation de neutrophiles maximal à six heures de reperfusion concurremment à une augmentation significative de la taille de l'infarctus. De plus, à vingt-et-une heures de reperfusion, le taux d'accumulation de neutrophiles revient à des niveaux très faibles, similaires aux niveaux basaux (Mallory, 1939; Sommers, 1964a) ou aux degrés d'un infarctus non-reperfusé (Thakur, 1979; Chatelain, 1987). Ces résultats démontrent que

l'accumulation de neutrophiles est contemporaine à un accroissement de la taille de l'infarctus et suggèrent une relation possible entre ces deux événements.

De nombreuses études ont démontré que la réduction du nombre de neutrophiles circulants permettait l'induction d'un infarctus plus petit comparativement à un groupe témoin. En effet, Romson et coll. (Romson, 1983) ont observé une diminution d'environ 43 % de la taille de l'infarctus dans un groupe d'animaux traités avec un antisérum contre les neutrophiles. De Lorgeril et coll. (de Lorgeril, 1989) ont observé quant à eux une taille d'infarctus réduite dans un groupe de chiens avec leucopénie en comparaison à un groupe témoin. Ces résultats suggèrent une fois de plus la relation possible entre l'accumulation de neutrophiles et l'augmentation de la taille de l'infarctus. De plus, une neutropénie et des agents anti-neutrophiles (comme les prostaglandines, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les inhibiteurs de la lipoxigénase) possèderaient le potentiel de protéger le myocarde (Romson, 1983).

1.1.2.2.1.2 Plaquettes

L'activation plaquettaire par la rupture des plaques athéromateuses ou par la présence de celles-ci au niveau de la lumière vasculaire est fréquemment la cause de la formation d'un thrombus occlusif menant à l'ischémie (Gresele, 2002). L'activation plaquettaire survient lors d'interactions des plaquettes entre elles, avec les neutrophiles ainsi qu'avec les plaques athérosclérotiques ou lors de leur rupture.

L'implication des plaquettes dans les lésions de reperfusion a été étudiée. Le groupe de Bednar et coll. (Bednar, 1985) a démontré que l'accumulation plaquettaire était secondaire aux événements médiés par les neutrophiles lors de la reperfusion. En effet, ce groupe a démontré que lors d'une neutropénie, l'accumulation de plaquettes marquées à l'indium 111 était significativement réduite par rapport à un groupe témoin (contenant des neutrophiles). Mullane et McGriff (Mullane, 1985) ont démontré dans un modèle canin que les plaquettes seules ne contribuaient pas directement à l'évolution des dommages

induits par une occlusion coronarienne. En effet, ceux-ci ont montré que l'administration d'un antisérum anti-plaquettaire ne réduisait pas les dommages induits au myocarde. Finalement, Laws et coll. (Laws, 1983) ont démontré que les plaquettes s'accumulaient lors de la reperfusion, initialement de façon lente mais atteignant une cinétique maximale à environ 24 heures et ce, dans un modèle d'occlusion coronarienne chez le chien. Ces résultats suggèrent que l'accumulation plaquettaire a lieu lors de la reperfusion, selon une cinétique initiale lente mais qui évolue pour atteindre un maximum à environ 24 heures de reperfusion. Par ailleurs, cette accumulation s'effectue en relation directe avec la migration des neutrophiles au lieu des dommages.

Rousseau et coll. (Rousseau, 1993a) ont quant à eux démontré qu'en présence d'une sténose résiduelle lors de la reperfusion (une condition où l'on inhibe la réponse hyperémique vasculaire), une thrombocytopénie réduisait significativement la taille des dommages induits au myocarde. Cependant, ce même groupe a démontré qu'une neutropénie en combinaison avec une thrombocytopénie ne réduisait pas davantage la taille des dommages (par rapport à une thrombocytopénie seule). Au contraire, une thrombocytopénie sans sténose n'a pas permis de réduire la taille des dommages. Ces résultats suggèrent donc que les plaquettes pourraient médier les dommages au myocarde lorsque la reperfusion survient en présence d'une sténose résiduelle.

1.1.2.2.1.3 Surcharge calcique

Des changements intracellulaires dans l'homéostasie calcique sont observés lors de l'ischémie et de la reperfusion. Lors de l'ischémie, il est connu que le calcium s'accumule dans les cellules (Buja, 1980; Morris, 1989). De plus, il a été observé que, lors de la reperfusion après une occlusion d'une à trois heures, l'accumulation de calcium était beaucoup plus importante que lors de l'ischémie seule. Les myocytes apparaissent donc au microscope électronique surchargés de calcium (dépôts de calcium sous forme de phosphate de calcium ou corps denses) (Shen, 1972; Chien, 1981; Buja, 1983). Si

l'ischémie est d'assez longue durée, induisant ainsi des dommages irréversibles, la reperfusion engendrera une entrée massive de calcium à l'intérieur de la cellule. Cependant, si l'ischémie est de courte durée, la reperfusion n'entraînera pas d'accumulation de calcium.

L'altération de l'homéostasie calcique semble être expliquée en partie par la contribution fonctionnelle des phospholipides membranaires. En effet, des altérations structurales sont observées lors de l'ischémie. Chien et coll. (Chien, 1981) ont constaté une diminution des phospholipides totaux et spécifiques (phosphatidyléthanamine et phosphatidylcholine) dans le tissu ischémique susendocardique lors d'une occlusion coronarienne d'une à trois heures. De plus, le même groupe (Chien, 1983) a également mesuré une augmentation de la quantité d'acides gras libres (incluant l'acide arachidonique) après 40 à 60 minutes d'occlusion chez le chien. Ces changements observés dans le contenu en phospholipides et acides gras libres à la membrane cellulaire lors de l'ischémie myocardique sont suffisants pour altérer la perméabilité calcique (Chien, 1981). La stabilité de la membrane semble donc très importante pour l'homéostasie calcique mais les mécanismes expliquant les altérations calciques à l'intérieur des cellules demeurent encore aujourd'hui difficiles à cerner.

Dans une autre optique, Rousseau et coll. (Rousseau, 1991) ont démontré que l'administration de bloqueurs des canaux calciques pouvait réduire la taille de l'infarctus. En effet, cette étude a démontré que l'administration du diltiazem, un bloqueur des canaux calciques, lors de la reperfusion réduisait significativement la taille de l'infarctus et l'accumulation de neutrophiles. Rousseau et coll. (Rousseau, 1994) ont démontré la même réduction dans l'étendue des dommages lors de l'administration post-ischémique du clentiazem, un autre bloqueur des canaux calciques (dérivé chloré du diltiazem). Ces résultats démontrent que l'administration de bloqueurs des canaux calciques provoque une réduction de la taille de l'infarctus et que le calcium semble impliqué dans la pathogenèse des lésions de reperfusion.

Le ou les mécanismes d'action sous-jacents à cette protection demeurent cependant inconnus. Une hypothèse stipule que les ions de calcium entraînent une chimiotaxie des leucocytes vers le site d'accumulation du calcium (Elferink, 1985; Rouzer, 1985; Soberman, 1985; Alfonso, 1986; Balou, 1986). D'autres travaux sont nécessaires pour prouver cette hypothèse et identifier les mécanismes par lesquels la réduction de la taille de l'infarctus a lieu, que ce soit par réduction de l'accumulation des neutrophiles ou par simple diminution du taux de calcium intracellulaire.

1.1.2.2.1.4 Radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules hautement réactives et instables qui possèdent un électron non-pairé au niveau de l'orbital externe. Ceux-ci réagissent avec d'autres molécules, pouvant perdre et/ou gagner un électron. Plusieurs voies mènent à la génération des radicaux libres. La majorité de ces voies de synthèse peuvent être activées lors de la reperfusion. Mais deux questions demeurent : Sont-ils générés en quantités suffisantes pour tuer les cellules cardiaques ? En quoi consistent ces radicaux libres (nature et origine) ?

Des quantités suffisantes de radicaux libres sont générées lors de la reperfusion myocardique et que ceux-ci contribuent à la mort des cellules (Burton, 1988). Ceci implique que l'ischémie n'entraîne pas la mort de tout le pool cellulaire mais que c'est bien la réintroduction de l'oxygène à la reperfusion qui y parvient.

Il existe deux types majeurs de radicaux libres identifiés : 1) l'anion superoxyde et 2) le radical hydroxyl. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est quant à lui le précurseur chimique du radical hydroxyl. Ces différents radicaux libres sont générés via l'activation d'enzymes ou l'auto-oxydation de composés endogènes. Une voie enzymatique synthétisant des radicaux libres est la voie de la xanthine oxydase (De Artinano, 1999). Cette enzyme est rapidement mobilisée et activée durant les premières minutes suivant le

début de l'ischémie et lors de la reperfusion et est responsable de la synthèse de l'anion superoxyde et de H_2O_2 par oxydation de l'hypoxanthine (elle-même générée via l'hypoxie et l'adénosine) (Chambers, 1985; McCord, 1985). Les catécholamines sont une autre source de radicaux libres via auto-oxydation (Jewett, 1989) mais également par oxydation enzymatique. La voie des prostaglandines peut également générer des radicaux libres (Kontos, 1985). La mitochondrie constitue aussi une importante source de radicaux libres lors de l'ischémie. L'arrêt de la phosphorylation oxydative la rend susceptible à une production excessive de radicaux libres ou à une perte de ses antioxydants endogènes durant l'ischémie, rendant la cellule incapable de parer à l'attaque oxydative (Ferrari, 1986; Schlafer, 1987).

Par ailleurs, un autre mécanisme potentiel expliquant les lésions de reperfusion est la production massive de radicaux libres par les neutrophiles. En effet, la stimulation des neutrophiles par des médiateurs pro-inflammatoires permet la génération de radicaux libres. Ces radicaux libres attaquent par la suite l'endothélium vasculaire et permettent l'expression de molécules d'adhésion (Deisher, 1993) ainsi que la création de lésions sur celui-ci. Ces lésions résultent entre autres en une augmentation de la perméabilité de l'endothélium (Svendsen, 1991; Svendsen, 1992; Svendsen, 1994), une augmentation de l'adhérence des neutrophiles (McIntyre, 1995) ainsi qu'une diminution de la relâche de facteurs dérivés de l'endothélium avec propriétés anti-neutrophiles. Les radicaux libres oxydent les lipoprotéines de basses densités (LDL) sanguines et provoquent leurs transformations en facteurs pro-athérogéniques. En plus de posséder le potentiel d'induire des lésions au lit vasculaire, les radicaux libres possèdent également des propriétés chimiotactiques en stimulant la génération du complément ainsi que l'induction de l'expression de P-sélectine sur l'endothélium (Gaboury, 1994), augmentant ainsi les interactions endothélium-neutrophiles. La génération de radicaux libres pourrait donc expliquer les dommages supplémentaires par le recrutement de neutrophiles lors de la reperfusion.

Plusieurs agents anti-oxydants réduisent les dommages induits par les lésions de reperfusion. L'administration d'agents comme la superoxyde dismutase et la catalase améliore les fonctions ventriculaires (Shlafer, 1982) et réduit la taille des dommages (Jolly, 1984; Werns, 1985; Ambrosio, 1986; Engler, 1989), suggérant ainsi un rôle délétère aux radicaux libres dans les lésions de reperfusion. Toutefois, il a aussi été observé que l'administration de ces agents pouvait ne pas protéger (Uraizee, 1987; Richard, 1988; Tanaka, 1993). Cette absence de protection pourrait s'expliquer par le protocole expérimental (dose, moment et durée de l'administration ainsi que la présence ou non d'une sténose résiduelle lors de la reperfusion) et dans la méthode de mesure de la taille de l'infarctus (coloration aux sels de tétrazolium et histologie). D'autres études permettront d'élucider les fonctions de ces molécules instables.

1.1.2.2.1.5 Apoptose

L'ischémie myocardique provoque la mort des cellules par nécrose, une catastrophe métabolique résultant en une rupture de la membrane cellulaire et en une libération du contenu intracellulaire. Comme mentionné précédemment, l'étendue des dommages augmente durant la reperfusion à cause de phénomènes appelés lésions de reperfusion. L'apoptose est impliquée dans ces lésions. Ce type de mort cellulaire est décrit en détails au chapitre 4 (section 4.1, Apoptose). Plusieurs groupes ont observé que la reperfusion induisait l'apoptose des cellules myocardiques dans des modèles de lapins (Gottlieb, 1994) et de rats (Fliss, 1996). En effet, ces groupes ont démontré une augmentation des phénomènes apoptotiques lors de la reperfusion au cours d'études par essai TUNEL (« Terminal dUTP Nick-End Labelling » ou marquage *in situ* consistant à effectuer un marquage de l'ADN aux extrémités 3') et par fragmentation de l'ADN (analyse de l'ADN clivé sur gel d'électrophorèse). L'apoptose a été détectée dans le tissu subissant une ischémie ainsi qu'une reperfusion. Cependant, les phénomènes apoptotiques demeurent absents ou s'observent peu dans le tissu subissant seulement une ischémie. Ces résultats ont été également observés dans un modèle canin par Freude et coll. (Freude, 2000). Par

ailleurs, ce même groupe a démontré qu'une ischémie suivie d'une reperfusion engendrait les processus apoptotiques (fragmentation de l'ADN et clivage de la PARP ou « Poly-(ADP-ribose) polymerase », une protéine clivée lors de l'apoptose).

Le groupe de Vinten-Johansen (Zhao, 2001b) a également suggéré la présence de phénomènes apoptotiques lors de la reperfusion. En effet, en plus d'observer une augmentation de la taille des dommages par nécrose à vingt-quatre heures de reperfusion, Zhao et coll. (Zhao, 2001b) ont démontré par essai TUNEL que, dans la région péri-nécrotique, le nombre de cellules apoptotiques s'accroissait en fonction de la durée de la reperfusion, passant de 26 % de tous les noyaux normaux pour une reperfusion de six heures à 59 % pour une période de reperfusion de 72 heures. Par ailleurs, l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques détectées par essai TUNEL correspondait à l'augmentation de la fragmentation de l'ADN. Ce groupe a aussi observé la modulation de l'expression de deux protéines impliquées dans l'apoptose, Bcl-2 et Bax. Bcl-2 permet aux caspases de demeurer sous forme zymogène (inactive; effet anti-apoptotique) tandis que Bax en engendre le clivage sous leur forme active (effet pro-apoptotique). Zhao et coll. (Zhao, 2001b) ont donc observé une diminution significative de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et une augmentation significative de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax. Ces résultats suggèrent que l'apoptose aurait un rôle à jouer lors de la reperfusion dans l'induction de lésions supplémentaires.

Plusieurs groupes (Itob, 1995; Olivetti, 1997; Saraste, 1997) ont démontré chez l'humain la présence d'apoptose dans la région péri-nécrotique entourant l'infarctus et ce, par essai TUNEL et fragmentation de l'ADN. Des résultats similaires ont été publiés par Anversa et coll. (Anversa, 1998) où, dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, une augmentation des processus apoptotiques (mesurée par essai TUNEL) lors de l'infarctus du myocarde a été observée. Black et coll. (Black, 1998) ont démontré quant à eux dans un modèle de rat, que la caspase-3 (une caspase effectrice de l'apoptose) co-localisait *in vivo* avec les cellules apoptotiques lors de l'ischémie-reperfusion. De plus,

Huang et coll. (Huang, 2000) et Holly et coll. (Holly, 1999) ont observé que l'inhibition de ces caspases engendrait une réduction des processus apoptotiques lors d'une ischémie-reperfusion ainsi qu'une réduction de la taille de l'infarctus.

L'infarctus du myocarde entraîne donc l'apparition de phénomènes de mort cellulaire par nécrose lors de l'ischémie. L'ischémie permet l'enclenchement de phénomènes de mort par apoptose qui ont lieu lors de la reperfusion. Les résultats laissent suggérer que lors d'une ischémie-reperfusion, l'apoptose est impliquée dans les lésions de reperfusion en provoquant des dommages supplémentaires. Des études plus approfondies de l'apoptose lors de la reperfusion myocardique permettront d'élucider son rôle dans les lésions de reperfusion.

1.1.2.2.2 Lésions de reperfusion non-létales

1.1.2.2.2.1 Stunning myocardique

Le stunning myocardique (ou myocarde sidéré) est une dysfonction mécanique persistante suite à la reperfusion malgré le rétablissement du débit coronarien normal ou presque normal (Bolli, 1990). Ce phénomène n'est pas causé par un déficit de perfusion et est complètement réversible.

Ce dysfonctionnement serait causé essentiellement par une réponse anormale ou diminuée de la machinerie contractile au calcium. Gao et coll. (Gao, 1995) ont démontré que la réponse contractile était réduite pour une même quantité de calcium activatrice dans du tissu cardiaque en stunning. Également, les radicaux libres auraient un rôle à jouer dans cette réponse réduite (pour une revue voir (Bolli, 1990)) via une désensibilisation des myofilaments (Macfarlane, 1992) et la dégradation protéolytique de la troponine I (Gao, 1996b). Par ailleurs, l'activation de calpaines, des protéases activées par le calcium, aurait un effet délétère dans la réponse contractile, provoquant la dégradation partielle de plusieurs composantes cellulaires de contraction (Yoshida, 1995; Gao, 1996a). En somme,

les facteurs délétères impliqués dans les lésions de reperfusion létales (calcium, radicaux libres) auraient une implication dans le stunning myocardique (lésion non-létale). Les mécanismes exacts expliquant le stunning sont par contre mal connus. Le stunning serait une condition multifactorielle en réponse au calcium et aux radicaux libres suite à l'ischémie-reperfusion.

1.1.2.2.2 Arythmies de reperfusion

Suite à la reperfusion, des arythmies peuvent se déclencher. Par exemple, une bradycardie sinusale transitoire avec hypotension observée en clinique chez des patients souffrant d'infarctus antérieurs reperfusés résulte en des contractions ventriculaires prématurées, un rythme idioventriculaire accéléré ou même une tachycardie ventriculaire non-soutenue. L'existence d'arythmies de reperfusion n'est cependant pas un marqueur de reperfusion adéquat étant donné leur présence tout au long de l'ischémie et de la reperfusion (Califf, 1988). Ceci empêche donc le diagnostic clinique spécifique pouvant être attribué à la réussite de la reperfusion du tissu myocardique. Par ailleurs, de Lorgeril et coll. (de Lorgeril, 1990a) ont démontré que la présence d'arythmies de reperfusion n'entraîne pas la progression supplémentaire des dommages lors de cette reperfusion. Selon ce groupe, la fibrillation de reperfusion et la défibrillation électrique interne (basse énergie) ne sont pas des facteurs influençant le myocarde à risque ni les lésions de reperfusion. La taille de l'infarctus n'est donc pas modifiée de façon significative. En somme, les arythmies de reperfusion peuvent être incluses dans les lésions de reperfusion non-létales dans le sens où elles n'entraînent pas de progression de la taille de l'infarctus lors de cette reperfusion.

1.1.3 Somme des effets : l'infarctus du myocarde

1.1.3.1 *Apparition d'un infarctus du myocarde : occlusion d'une artère coronaire*

Dans le myocarde, l'infarctus du myocarde survient principalement lors de la rupture d'une plaque athérosclérotique suivie de la formation d'un thrombus plaquettaire occlusif au niveau d'une artère coronarienne. La fissuration de la plaque expose l'endothélium et ses substances thrombogéniques aux plaquettes (Gresele, 2002). Les plaquettes s'activent, s'agrègent et entraînent la formation d'un thrombus occlusif ainsi qu'un arrêt de la circulation sanguine. L'arrêt de la circulation réduit ou arrête complètement l'apport en oxygène (ischémie). L'apport étant inférieur à la demande, ce déficit induit des changements biochimiques et ultrastructuraux aux cellules cardiaques menant à leur mort.

1.1.3.2 *Progression de l'infarctus*

Comme discuté précédemment (section 1.1.1.3, Susceptibilité du susendocarde par rapport au subépicarde), le susendocarde possède une vulnérabilité inhérente à l'ischémie en comparaison avec le subépicarde. En effet, le débit sanguin au niveau de cette région est réduit étant donné les forces de compressions supérieures, une tolérance moins grande à l'ischémie ainsi qu'une demande métabolique plus élevée. Étant donné ces faits, les dommages irréversibles débutent généralement au niveau du susendocarde et se poursuivent suivant un *front de vague* vers le subépicarde.

1.1.3.2.1 Phénomène du front de vague (« Wave Front »)

Le phénomène du front de vague a été décrit par Reimer et coll. en 1977 (Reimer, 1977). Ce groupe a constaté que plus la durée de l'ischémie était longue, plus l'infarctus était grand. Par ailleurs, ils ont également démontré que les dommages irréversibles progressaient de la région la moins tolérante à l'ischémie (le susendocarde) vers celle moins touchée par cette ischémie (région la plus tolérante, le subépicarde).

Cette progression adoptait un « front de vague » (figure 1.3), rappelant la forme qu'une vague prend lorsqu'elle arrive sur le rivage d'une plage. En d'autres termes, l'infarctus passe du susendocarde vers le subépicarde de façon

transmurale si l'ischémie est assez sévère et d'assez longue durée pour endommager de façon irréversible et permanente la paroi myocardique. Évidemment, la reperfusion constitue le meilleur traitement pour limiter ces dommages.

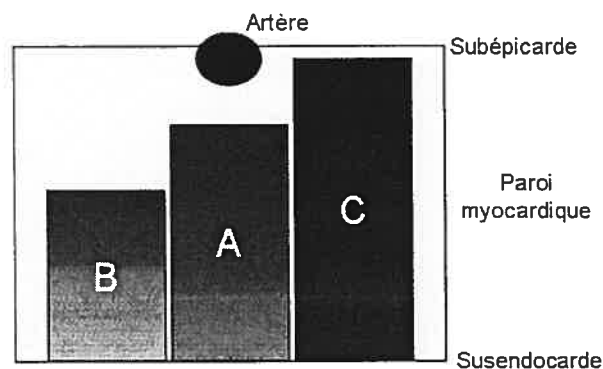


Figure 1.3 Représentation schématique d'une paroi myocardique soumise à une ischémie via l'occlusion de son artère coronaire. En présence de circulation collatérale, l'infarctus pourrait, par exemple, progresser vers le point A. Ce dernier représente le point où le myocarde subira des dommages irréversibles sans pour autant être transmuraux (par la présence d'un apport sanguin via la circulation collatérale). Cependant, si la circulation collatérale est limitée ou la demande myocardique est augmentée, l'infarctus pourrait progresser jusqu'au point C, situation où les dommages sont presque transmuraux. Au contraire, si la reperfusion est rapide, l'infarctus pourrait n'être que de 50 % de la zone à risque, le point B. (Adapté de Hearse (1984)).

1.1.3.2.2 *Déterminants de l'infarctus*

Les déterminants primordiaux de la taille d'un infarctus du myocarde sont :

- Durée de l'ischémie (occlusion coronarienne);
- Taille de la zone à risque;
- Demande métabolique du myocarde;
- Débit de la circulation collatérale (si présente).

Évidemment, comme mentionné précédemment, la durée de l'ischémie est le principal déterminant de la taille d'un infarctus, à savoir que la limitation de l'ischémie engendre un infarctus de moindre envergure. Également, la taille de l'infarctus est proportionnelle à l'étendue de sa zone à risque. Miura et coll. (Miura, 1987) ont démontré une corrélation entre la taille de l'infarctus et la taille de la zone à risque. Par ailleurs, plus la demande métabolique est élevée, plus la consommation en oxygène est importante, plus haute sera la demande et plus grande sera la taille d'un infarctus. Finalement, plusieurs groupes ont démontré l'importance de la circulation collatérale pour limiter la progression et la taille d'un infarctus (Harken, 1981; Reimer, 1985; Miura, 1987). Il existe une relation inverse entre l'étendue de l'infarctus et la circulation collatérale (Bishop, 1976). Il est même possible que cette circulation soit capable d'acheminer suffisamment d'oxygène pour supporter des périodes de glycolyse intermittentes au niveau de la zone ischémique (Jennings, 1983), limitant ainsi l'infarctus.

1.1.3.2.3 *Aspect d'un infarctus*

L'ultrastructure et l'aspect histologique d'un infarctus sont différents lorsque celui-ci est reperfusé en comparaison à un infarctus non-reperfusé. En effet, ce dernier présente des changements morphologiques visibles au microscope électronique aussi tôt qu'à

15 minutes d'ischémie, comme l'apparition de granules et de particules amorphes à hautes densités dans la mitochondrie ainsi que la destruction de ses crêtes, l'œdème du noyau cellulaire avec une marginalisation de la chromatine, un commencement de la destruction du sarcolemme (Jennings, 1974b; Schaper, 1979) et la libération d'enzymes du lysosome dans le cytosol (Whalen, 1974). Cependant, il demeure incertain si le relâchement de ces enzymes s'effectue concurremment au dysfonctionnement de la mitochondrie et à la destruction du sarcolemme. De plus, ce type d'infarctus présente une nécrose de coagulation visible au microscope standard par coloration à l'hématoxyline-éosine. Par ailleurs, il est possible d'observer une granulation et une désorganisation des myofibrilles ainsi qu'un œdème cellulaire des fibres musculaires au centre de l'infarctus après deux heures d'occlusion (Sommers, 1964b). Les neutrophiles sont absents de ce type d'infarctus dans les premières heures (Sommers, 1964b) mais font leur apparition de 24 à 48 heures après l'occlusion coronarienne. Une réponse inflammatoire suit dans les quatre à sept jours suivants et s'estompe vers le jour 14, ayant ainsi pour conséquence une infiltration lymphocytaire et de macrophages de la périphérie de l'infarctus vers son centre. Finalement, la cicatrice et la fibrose apparaissent et sont complètes après six à huit semaines (Fishbein, 1978).

En contraste, l'infarctus reperfusé présente une nécrose en bandes de contraction. Ce type de nécrose est caractéristique de la reperfusion et aurait pour source le calcium (Hearse, 1978). En effet, l'entrée massive de calcium durant la reperfusion cause ce type de nécrose. Ce phénomène provoque une hypercontraction des fibres et endommage les myocytes. Par ailleurs, l'infarctus reperfusé présente un œdème massif et une augmentation du contenu en eau est observée (Whalen, 1974). Il y a également vacuolisation des myocytes, destruction de l'architecture des mitochondries et altération du sarcolemme (Kloner, 1974; Decker, 1978; Schaper, 1979; Schaper, 1983). Les mitochondries accumulent une partie de l'excès de calcium sous l'aspect de calcification (Ca^{2+} et calcium inorganique) et le sarcolemme quant à lui devient supercontracté et forme les bandes de contraction (Kloner, 1974; Jennings, 1983). Tous ces phénomènes de

destruction et désintégration de l'architecture cellulaire se font plus rapidement que lors de l'ischémie seule et peuvent être observés au microscope standard après vingt minutes de reperfusion.

La reperfusion entraîne donc la progression des dommages, phénomène appelé lésions de reperfusion (section 1.1.2.2). Comme déjà discuté, la réintroduction du sang dans l'artère coronarienne cause l'accumulation de neutrophiles au niveau du myocarde à risque et de l'infarctus lui-même, la génération massive de radicaux libres entre autre par ces neutrophiles, l'accumulation de plaquettes, la surcharge calcique des myocytes et l'apoptose des cellules cardiaques. Cependant, il est important de noter que malgré la progression des dommages et l'augmentation de la taille de l'infarctus entraînée par la reperfusion, celle-ci demeure le meilleur traitement pour limiter cette étendue des dommages. Cette dernière sera toujours plus petite en comparaison à un infarctus avec occlusion coronarienne permanente sans reperfusion (Reimer, 1979). Évidemment, si l'infarctus n'est pas reperfusé, toute la région ischémique sera éventuellement détruite en absence ou détruite à environ 70 à 80 % en présence de circulation collatérale (Jennings, 1983).

Chapitre 2

Le cerveau

2.1 Dépression post-infarctus du myocarde

Il a été démontré qu'une dépression majeure pouvait être associée à la maladie coronarienne. En effet, près de la moitié des patients souffrant d'un infarctus du myocarde subissent un épisode de dépression (mineure ou majeure) (Schleifer, 1989) et entre 15 à 20 % de ces mêmes patients seraient victimes d'une dépression majeure (Schleifer, 1989; Ladwig, 1991; Frasure-Smith, 1993). Mais en fait, qu'est-ce que la dépression ?

2.1.1 Dépression

« People never die of love or grief alone: though some die of inherent maladies, which the tortures of those passions prematurely force into destructive action »

Charlotte Brontë, *Shirley*, 1848

La dépression selon le DSM-IV {American Psychiatric, 1994 #416} est une situation mentale généralisée où il y a présence d'un état dépressif (peine) durant la majorité de la journée avec ou sans perte marquée d'intérêt ou de plaisir pour les activités usuelles. Cet état doit persister depuis au moins les deux dernières semaines et le patient doit le percevoir à chaque jour. Par ailleurs, il doit ressentir d'autres signes et symptômes comme perte/gain de poids significatif, perte d'appétit, insomnie/hypersomnie, agitation psychomotrice (ou l'inverse), fatigue, perte d'énergie, sentiments d'être sans valeur, sentiment de culpabilité excessive ou inappropriée, concentration/habilité à penser diminuée, indécision et pensées récurrentes à propos de la mort et du suicide (pensée, plan pour le commettre et/ou tentative). Ces symptômes causent un affaiblissement et une détresse clinique significative. La dépression n'est pas un mauvais état mental de

pessimisme ou de peine durant des jours plus mauvais ou lors de la perte d'un être cher, des situations habituellement transitoires. La dépression est loin d'être une simple maladie avec manifestations psychologiques mais elle est plutôt une pathologie systémique avec des effets délétères sur les différents systèmes et organes de la victime (Michelson, 1996; Musselman, 1998; Ciechanowski, 2000; Schulz, 2000).

L'étiologie et la pathophysiologie de la dépression sont encore peu connues. Les systèmes des neurotransmetteurs monoaminergiques du cerveau ont longtemps été considérés comme grands responsables de la maladie dépressive. Les fonctions sérotonergiques et noradrénergiques sont réduites en ce qui a trait à la synthèse des monoamines ainsi que de leurs transporteurs et récepteurs chez les sujets dépressifs en comparaison à des patients normaux (Charney, 1998; Ordway, 2002; Schatzberg, 2002). Toutes ces observations dérivent principalement d'études et d'observations utilisant des anti-dépresseurs comme agents pharmacologiques pour la réduction des symptômes de dépression et la régression de ces changements.

Par des procédés d'imagerie, des anomalies ont été constatées dans certaines régions cérébrales en ce qui a trait au débit sanguin et au métabolisme du glucose. Ces paramètres augmentent dans le système limbique et dans le cortex préfrontal chez les patients dépressifs. Ces régions du cerveau, particulièrement l'amygdale (structure du système limbique), sont impliquées dans la modulation des émotions et dans la dépression (Drevets, 2000).

2.1.1.1 Implication de l'amygdale

L'amygdale (corps amygdalien ou complexe amygdaloïde) est une structure cérébrale membre du système limbique (Nieuwenhuys, 1996) (Figure 2.1). Anatomiquement, l'amygdale est située dans le lobe temporal médian (figure 2.1). Sa composition est excessivement complexe (revue par Sah et coll. (Sah, 2003)). Essentiellement, plus de treize noyaux sont identifiés à ce jour et maintiennent des

connections avec d'autres structures du cerveau, incluant l'hippocampe, le thalamus, le néocortex et le striatum. L'amygdale est impliquée dans la régulation des fonctions cardiaques en modulant l'activité neuronale au niveau du système parasympathique et du baroréflexe (Ter Horst, 2000). Ceci démontre la relation entre le système cardiovasculaire et le système limbique.

L'amygdale est une composante essentielle des circuits neuronaux qui détectent l'importance des émotions en assignant une réponse appropriée (Gloor, 1960; Kapp, 1992; LeDoux, 2000). Elle est donc centrale à la modulation des émotions (Davis, 2001). Historiquement, cette notion provient de modèles animaux où les lobes temporaux (incluant l'amygdale; figure 2.1) étaient endommagés. Des dommages

bilatéraux à l'amygdale chez l'humain étant extrêmement rares et les animaux ne pouvant pas nous faire part de leur « émotions », la caractérisation des fonctions de l'amygdale s'est restreinte à l'étude de la peur (LeDoux, 1998). Cette émotion engendre une myriade de réponses autonomiques et hormonales comme l'augmentation des niveaux de noradrénaline, de la pression sanguine et de la fréquence cardiaque, autant chez l'homme que chez l'animal (Chapman, 1954). Les animaux ayant subi des dommages aux lobes temporaux démontraient une réduction drastique de la peur et de la colère ainsi qu'une augmentation de l'exploration de l'espace (Klüver, 1937). Des comportements similaires ont été observés chez d'autres animaux avec seulement une lésion à l'amygdale (Weiskrantz, 1956), démontrant le rôle prépondérant du complexe amygdalien dans la

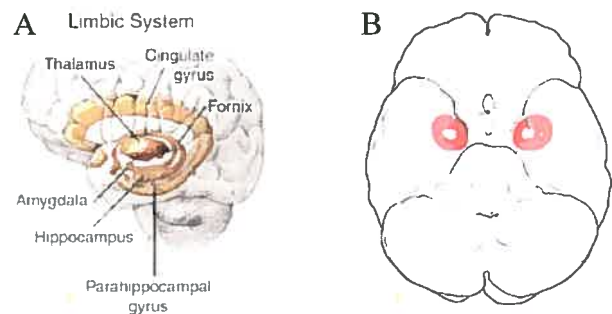


Figure 2.1 A) Représentation sagittale du cerveau montrant les différentes structures du système limbique dont l'amygdale; B) Localisation de l'amygdale. Cette représentation graphique montre une vue ventrale du cerveau situant l'amygdale (rouge) dans le lobe temporal du cerveau. (Source : <http://en.wikipedia.org/wiki/Amygdala>)

gestion des émotions. L'amygdale est donc une structure centrale dans l'intégration des stimuli externes et des émotions.

Tel que mentionné précédemment, l'amygdale est impliquée dans la dépression. Cette pathologie associée à une activation de cette structure (Drevets, 1999b). En ce sens, des augmentations de débit sanguin et de métabolisme du glucose ont été constatées dans l'amygdale de patients dépressifs. Ces altérations sont en corrélation avec la sévérité de la pathologie (LeDoux, 1987; Drevets, 1992; Abercrombie, 1998). Le traitement avec anti-dépresseurs provoque un retour à des niveaux similaires chez des patients non-dépressifs. Ceci corrobore les évidences chez les animaux démontrant que cette modulation pharmacologique engendre un effet inhibiteur sur les fonctions amygdaliennes (Drevets, 1999a; Drevets, 2000). En plus des modifications de débit sanguin et du métabolisme du glucose, des changements morphologiques ont été constatés dans l'amygdale. Sheline et coll. (Sheline, 1998) ont montré que le volume de certains noyaux cellulaires à l'intérieur de la structure était réduit bilatéralement chez des patients atteints de dépression majeure. Le nombre de cellules gliales semble également réduit dans l'amygdale de patients dépressifs (évaluation *post mortem*) (Bowley, 2002). L'amygdale est, de la sorte, touchée lors d'une dépression et pourrait constituer une cible potentielle de traitement anti-dépresseur.

2.1.2 Infarctus du myocarde et dépression post-infarctus

2.1.2.1 Dépression et maladie cardiovasculaire

La dépression est difficile à diagnostiquer. La présence d'une autre pathologie comme l'infarctus du myocarde n'entraîne qu'une complication de son diagnostic clinique (Cohen-Cole, 1993). En effet, un patient ne souffrant que de dépression et ayant accepté son statut pathologique pourra rapidement discuter de ses signes et symptômes. Leurs analyses chez des patients souffrant d'une maladie coronarienne montre que ces signes et symptômes sont beaucoup plus subtils, indirects et atypiques (Freedhand, 1992) que chez

les patients sans maladie coronarienne. Ces symptômes incluent une fatigue et un manque d'énergie peu commun ou chronique, apparition récente d'irritabilité ou de colère, sentiment d'être stressé, perte de poids sans diète, insomnie, réduction des contacts sociaux, perte d'hygiène personnelle, pas de retour aux activités normales (avec un délai raisonnable suite à la maladie coronarienne), intérêt réduit pour les activités autrefois plaisantes (perte de plaisir), visites fréquentes en milieu hospitalier pour des symptômes inexplicables, anxiété et pessimisme chroniques, absence prolongée du travail, conformité médicamenteuse et modification des facteurs de risques pauvres. Le patient dépressif souffrant d'une maladie coronarienne démontre aussi des symptômes similaires à un patient simplement dépressif (perte de plaisir, etc.). Ces patients tendent cependant à les attribuer à la maladie coronarienne et non pas à la dépression elle-même. Malgré ce fait, les patients souffrant d'une dépression post-infarctus du myocarde encourrent un risque de mortalité cardiaque de trois à quatre fois plus élevé subséquemment à cette dépression en comparaison à des patients n'en souffrant pas (Ladwig, 1991; Frasure-Smith, 1993, 1995). Ce risque est similaire à celui observé lors d'une dysfonction ventriculaire gauche ou d'un âge avancé (Volpi, 1993). En comprenant mieux les mécanismes sous-jacents à cette dépression omniprésente suite à un infarctus du myocarde, il sera possible de traiter les victimes afin d'en réduire le risque.

2.1.2.2 Mécanismes

Les mécanismes entourant la dépression post-infarctus ne sont pas complètement cernés encore aujourd'hui mais incluraient 1) l'hyperactivité de l'axe hypothalamique-pituitaire-adrénocortical et du système adrénocortical, 2) une variabilité du rythme cardiaque diminuée, 3) une vulnérabilité ventriculaire et l'ischémie myocardique en réponse à un stress mental ainsi 4) qu'une réactivité plaquettaire accrue.

2.1.2.2.1 Hyperactivité de l'axe hypothalamique-pituitaire-adrénocortical et du système adrénocortical

Les patients souffrant de dépression montrent une hyperactivité de l'axe hypothalamique-pituitaire-adrénocortical. En réponse à un stress, l'hypothalamus libère le facteur de relâche de corticotropine, libérant ainsi par la suite la corticotropine (ACTH) de la glande pituitaire (hypophyse). Cette réponse est plus élevée chez les sujets dépressifs que normaux (Nemeroff, 1984). Par ailleurs, un dysfonctionnement du système sympathoadrénalien est également observé. Des niveaux anormalement élevés de noradrénaline sont constatés chez les patients dépressifs (Wyatt, 1971).

2.1.2.2.2 Variabilité du rythme cardiaque diminuée

Les fluctuations du rythme cardiaque permettent l'adaptation d'un organisme aux différents changements et seraient un indice de mesurer de la réactivité des systèmes nerveux sympathique et parasympathique ainsi que du système rénine-angiotensine (Musselman, 1998). En effet, des changements rapides (battement-par-battement) dans les paramètres hémodynamiques reflètent la réponse dynamique de contrôle du système cardiovasculaire lors de perturbations physiologiques et psychologiques. Or, une grande variabilité est observée chez des patients normaux en comparaison à des patients souffrant de dépression (Dalack, 1990). Le risque de mortalité étant plus élevé lors d'une variabilité réduite (Kleiger, 1987), il est possible de croire que les patients dépressifs sont plus à risque. Une étude clinique a d'ailleurs démontré que cette variabilité était normalisée concurremment à une atténuation de la dépression par un traitement avec anti-dépresseurs (Balogh, 1993). Cette observation démontre que la variabilité du rythme cardiaque pourrait constituer un paramètre pouvant être normalisé afin de réduire le risque cardiovasculaire.

2.1.2.2.3 *Vulnérabilité ventriculaire et ischémie myocardique*

La vulnérabilité ventriculaire suite à un infarctus du myocarde, l'ischémie myocardique et le stress émotionnel négatif sont connus comme pouvant provoquer des arythmies fatales (Verrier, 1990). Il a été démontré que les patients souffrant de maladies coronariennes étaient plus à risque de subir des événements délétères cardiaques fatals ou non-fatals lors d'une ischémie myocardique engendrée par un stress mental (Jiang, 1996). Le système nerveux central contrôle le seuil de déclenchement d'une arythmie comme la fibrillation ventriculaire. En le stressant, ce seuil est abaissé. En conséquence, le risque de ces événements arythmiques s'élève. Ce risque de mortalité est donc plus grand chez les patients en stress (Tavazzi, 1986; Follick, 1988). Évidemment, le stress n'est pas synonyme de dépression. Étant donné que certaines structures cérébrales activées sont identiques lors du stress et de la dépression (par exemple, l'amygdale), il est possible de croire que ces observations s'appliquent aussi à la dépression. Il est à noter que le stress peut dégénérer vers un état pathologique (Chrousos, 1992) comme la dépression (Paykel, 1979; Kendler, 1993), laissant croire que ces deux situations délétères pour le patient souffrant de maladie coronarienne provoquerait une vulnérabilité ventriculaire lors d'une émotion intense.

2.1.2.2.4 *Réactivité plaquettaire accrue*

Les plaquettes de patients dépressifs ou stressés démontrent une réactivité augmentée par rapport aux patients normaux (Musselman, 1996; Laghrissi-Thode, 1997; Strike, 2004). Ces cellules sanguines s'activent et s'agrègent plus facilement. Il a également été démontré que la densité des récepteurs plaquettaires à la sérotonine était significativement augmentée chez les patients souffrant de dépression (Biegon, 1987). En parallèle, ces mêmes patients présentent une réduction du nombre de transporteurs de sérotonine dans le cerveau (Briley, 1980). La sérotonine étant un agent activant les plaquettes, une densité de récepteurs plus élevée et une altération du nombre de

transporteurs de sérotonine augmenteraient l'agrégation plaquettaire en réduisant la recapture de la monoamine et en exposant ainsi les récepteurs à la molécule. Cette susceptibilité d'activation pourrait expliquer la vulnérabilité des patients dépressifs à une maladie coronarienne et vice versa.

2.1.2.3 *Amygdale et dépression post-infarctus : nouveau mécanisme*

L'apoptose à l'intérieur de certaines structures cérébrales pourrait constituer un nouveau mécanisme expliquant les symptômes de dépression post-infarctus. En regard à cette hypothèse, Lucassen et coll. (Lucassen, 2001) ont démontré la présence d'apoptose dans l'hippocampe chez l'humain dépressif. Ces évidences d'apoptose étaient rares mais étaient néanmoins présentes. Il est à noter que l'hippocampe est un membre du système limbique et est impliqué dans la dépression (Nieuwenhuys, 1996). Utilisant un modèle animal de stress social menant à la dépression chez la musaraigne d'arbres, Lucassen et coll. (Lucassen, 2004) ont également observé des cellules apoptotiques dans l'hippocampe de ces animaux. Ce modèle a été validé auparavant par d'autres groupes en ce qui a trait à la dépression (Fuchs, 2002; van Kampen, 2002). Parallèlement, l'administration d'un anti-dépresseur a permis de réduire ces phénomènes apoptotiques (Lucassen, 2004). L'amygdale étant également une structure du système limbique, elle pourrait être touchée par ces phénomènes apoptotiques, expliquant ainsi en partie la dépression.

En regard à l'amygdale, Wann et coll. (Wann, 2005a) ont développé un modèle de dépression post-infarctus chez le rat consistant en une occlusion coronarienne de 40 minutes et une reperfusion de 72 heures. Suite au sacrifice, ce groupe a observé de l'apoptose au niveau de l'amygdale (structure impliquée dans la dépression; section 2.1.1.1). Cette apoptose a été caractérisée par diverses méthodes incluant la coloration TUNEL (permettant une quantification de l'apoptose), l'expression des protéines Bcl-2 et Bax (respectivement anti- et pro-apoptotique) ainsi que l'activité des enzymes PI3K et caspase-3 (respectivement anti- et pro-apoptotique) (pour plus de détails quant aux

fonctions de ces différentes protéines, voir le chapitre 2, section 2.1). La coloration TUNEL permet de quantifier l'apoptose en permettant un marquage à l'extrémité 3' de l'ADN suivi d'une visualisation et d'une quantification rapide des processus apoptotiques avec l'aide d'un microscope à fluorescence. Un simple comptage des cellules positives est alors nécessaire : plus le nombre de cellules est grand, plus les processus apoptotiques sont importants. Ainsi, le groupe de Wann et coll. (Wann, 2005a) ont observé une augmentation significative du nombre de cellules positives à la coloration TUNEL dans le groupe ayant subi un infarctus du myocarde en comparaison à un groupe témoin (chirurgie de type « Sham », identique mais sans occlusion coronarienne). Le ratio des protéines Bax/Bcl-2 est également une autre méthode pour déterminer si un système tend vers l'apoptose ou non : plus le ratio est élevé, plus l'apoptose est probable. Ce ratio est significativement plus élevé (deux fois) dans le groupe subissant un infarctus du myocarde en comparaison au témoin (l'expression de Bax étant réduite et celle de Bcl-2 augmentée). La mesure de l'activité de la caspase-3 constitue une méthode supplémentaire de discriminer la présence d'apoptose. Son activité était significativement supérieure dans le groupe avec infarctus par rapport au groupe témoin. En contraste, l'activité de la PI3K constitue un signal anti-apoptotique. Cette activité était réduite significativement dans le groupe subissant une occlusion coronarienne. Tous ces résultats démontrent donc que l'apoptose a lieu au niveau de l'amygdale suite à un infarctus du myocarde, phénomène caractérisé par une augmentation des processus pro-apoptotiques et une réduction de ceux anti-apoptotiques.

L'apoptose dans l'hippocampe a également été démontrée lors de la dépression (comme décrit précédemment dans cette section). Wann et coll. (Wann, 2005a) n'ont cependant observé aucune différence significative dans cette région du cerveau des rats ayant subi un infarctus du myocarde. Ce groupe n'exclut pas la possibilité que l'apoptose ait lieu dans une fenêtre temporelle différente (avant ou après la période de 72 heures de reperfusion). Par ailleurs, il est possible que les mêmes phénomènes apoptotiques prennent place dans un sous-compartiment de cette structure cérébrale. Ce groupe est présentement à travailler à la caractérisation des différents sous-compartiments de l'hippocampe suite à

24, 48 et 72 heures de reperfusion myocardique. Ces travaux sont en cours et seront publiés d'ici l'année 2006.

En parallèle, le même groupe (Wann, 2005b) a démontré que la dépression était bel et bien présente dans le même modèle d'infarctus du myocarde chez le rat. La dépression a été caractérisée par le test de préférence au glucose (eau sucrée) et par la nage forcée (Porsolt). Ces résultats permettent de suggérer que la dépression est présente suite à l'infarctus du myocarde. Essentiellement, dans le premier test, un animal normal (exempt de symptômes dépressifs) préfère l'eau sucrée en comparaison à un animal dépressif. Le deuxième test (Porsolt) permet aussi de discriminer les animaux dépressifs : ces derniers nagent généralement pour une période de temps plus limitée en comparaison aux animaux normaux. Ces deux tests sont couramment utilisés pour déterminer la présence de dépression dans un modèle animal. Ainsi, les animaux ayant subi un infarctus du myocarde préféraient moins la solution d'eau sucrée en comparaison au groupe témoin. De plus, les animaux avec infarctus du myocarde nageaient moins longtemps que les animaux du groupe témoin. Ces observations suggèrent donc fortement que les animaux avec infarctus du myocarde sont dépressifs. Par ailleurs, cette pathologie est complètement renversée lorsque les rats sont traités avec un anti-dépresseur, la désipramine (famille des tricycliques). Les animaux ayant subi un infarctus du myocarde et traités avec la désipramine préfèrent l'eau sucrée au même titre et nagent aussi longtemps que les animaux du groupe témoin. Ces observations démontrent donc que dans ce modèle, la dépression est présente suite à l'infarctus du myocarde et que la pathologie peut être renversée par l'administration d'anti-dépresseur.

En conséquence, l'apoptose pourrait constituer un mécanisme expliquant la dépression subséquente à un infarctus du myocarde. Davantage de travaux sont nécessaires pour bien caractériser ces phénomènes. Ceux-ci feront l'objet de publications durant les années 2005 et 2006 par le groupe du Dr Roger Godbout et du Dr Guy Rousseau.

Chapitre 3

L'adénosine et ses récepteurs

Dans ce chapitre, l'adénosine et ses différents récepteurs seront décrits. Les notions exposées sont nécessaires à la bonne compréhension des données discutées dans les articles figurant dans cette thèse. L'adénosine possède *a priori* des propriétés protectrices. Ainsi, ce chapitre exposera sa structure, sa synthèse et sa dégradation. Par ailleurs, ses différents sites de liaisons, ou récepteurs de l'adénosine, seront décrits également.

3.1 Adénosine

L'adénosine est un nucléoside purine comportant un squelette ribose attaché à une molécule d'adénine par un lien glycosidique (figure 3.1). Cette molécule est distribuée dans différents organes ou tissus (poumons, cerveau, système immunitaire, cœur, milieu vasculaire, testicules, etc.) et permet la régulation de certaines fonctions tissulaires. Aucun site précis de stockage ou de relâchement n'a cependant été identifié à ce jour (Sommerschild, 2000).

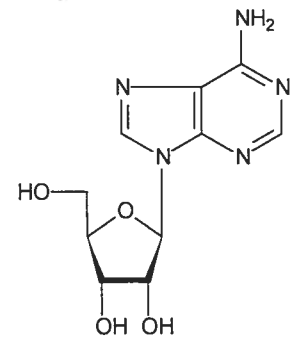


Figure 3.1 Structure moléculaire de l'adénosine.

En normoxie, l'adénosine est synthétisée continuellement en petites quantités à l'intérieur et à l'extérieur des cellules (Fredholm, 2001) (figure 3.2). Au niveau intracellulaire, cette synthèse s'effectue par hydrolyse du S-adénosylhomocystéine en adénosine et homocystéine par la S-adénosylhomocystéinase (Broch, 1980; Ohisalo, 1987). La déphosphorylation de l'AMP par l'endo-5'-nucléotidase, retrouvée dans le cytosol, permet également de générer l'adénosine (Schubert, 1979; Ohisalo, 1987; Zimmermann, 1998). Suivant la synthèse, l'adénosine peut être ensuite exportée à l'extérieur de la cellule par des transporteurs spécifiques (Williams, 1991; Anderson, 1996) ou par diffusion simple (Sommerschild, 2000). Ce transport conserve des concentrations similaires de l'autacoïde de part et d'autre de la membrane cellulaire (Svenningsson, 1999). Au niveau

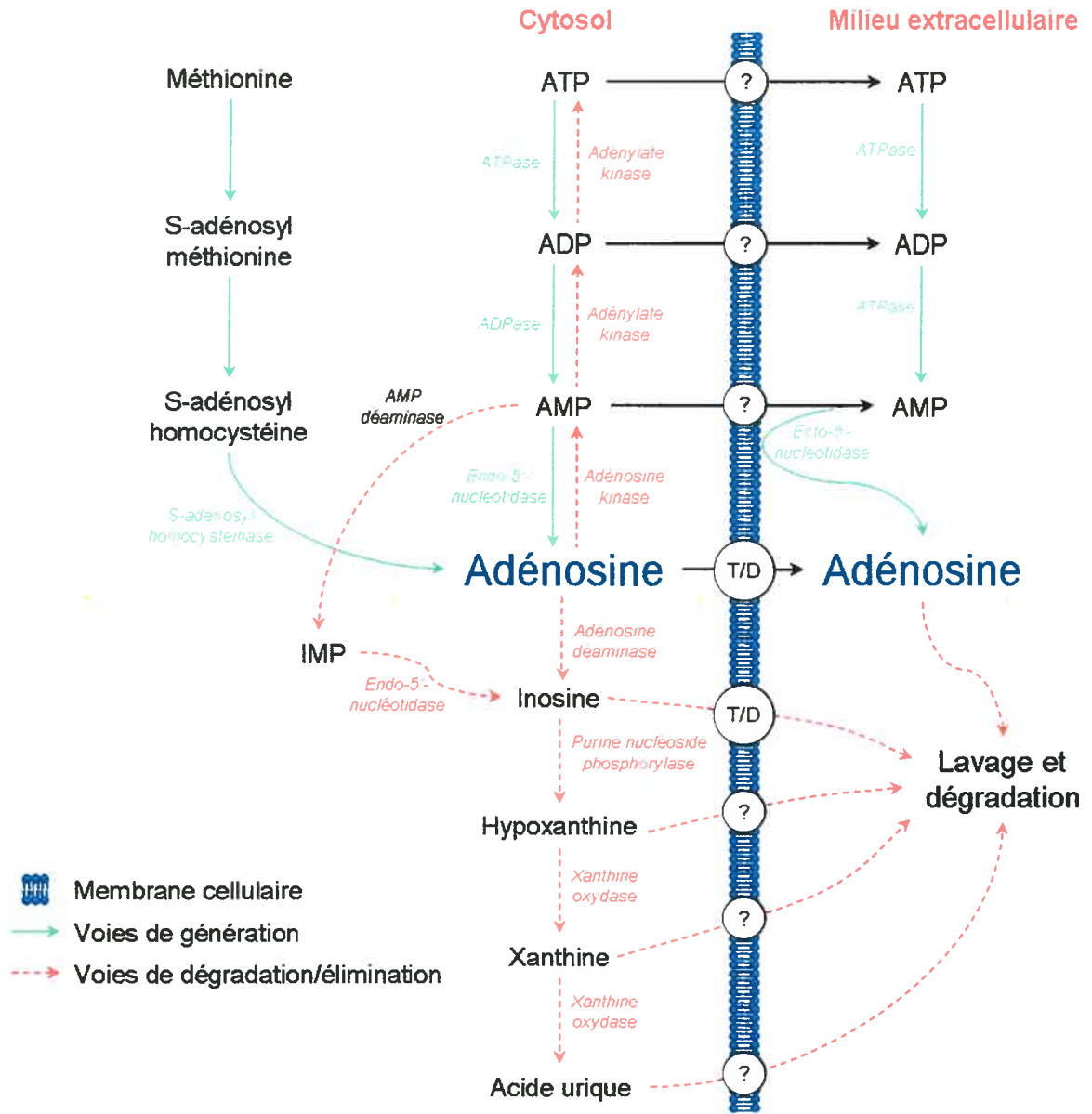


Figure 3.2 Synthèse, métabolisme et élimination de l'adénosine. L'adénosine est principalement générée par l'hydrolyse du S-adenosylhomocystéine et par la déphosphorylation de l'AMP. En situation ischémique, la voie de la déphosphorylation de l'AMP devient prédominante. Par ailleurs, la dégradation et l'élimination de l'adénosine s'effectue très rapidement. (T/D, Transport ou diffusion simple).

extracellulaire, l'ecto-5'-nucléotidase liée à la face externe de la membrane (Dunwiddie, 1997) ou soluble (Todorov, 1997) entraîne la génération d'adénosine.

L'élimination de l'adénosine s'effectue très rapidement, sa demi-vie sanguine étant de 0,5 à 1,5 secondes (Möser, 1989). Elle est recyclée à l'intérieur de la cellule par sa rephosphorylation en AMP par l'adénosine kinase ou par sa déamination en inosine par l'adénosine déaminase (figure 3.2) (Hori, 1991; Mullane, 1995; Mubagwa, 1996). La déamination en inosine constitue une méthode moins efficace en regard de l'affinité de l'enzyme pour son substrat (K_m de 20 à 100 μM pour la déamination (Arch, 1978; Lloyd, 1995) en comparaison à un K_m de 0,1 à 2,0 μM pour la rephosphorylation (Spychala, 1996)). Son relâchement dans le milieu extracellulaire constitue aussi une méthode d'élimination de la cellule elle-même et, ainsi libérée, l'adénosine est dégradée dans l'espace extracellulaire ou dans la circulation (Lloyd, 1995).

L'équilibre entre la génération et l'élimination permet de maintenir des concentrations normales dans l'espace extracellulaire et le fluide interstitiel au-dessous de 0,5 μM (Van Wylen, 1992; Martin, 1997a) et dans le sang humain à environ 0,1 à 1 μM (Möser, 1989). La concentration cytosolique quant à elle serait d'environ 0,04 à 0,1 μM et l'adénosine serait liée à environ 90 % aux protéines intracellulaires (principalement en grande partie la S-adénosylhomocystéinase).

L'adénosine est également générée lors de stress tissulaire où la demande énergétique excède son approvisionnement. En effet, dans le cœur, le cerveau et les reins, la production d'adénosine est augmentée lors d'une ischémie (chapitre 1, section 1.1.1) (Mubagwa, 1996; Shryock, 1997) par catabolisme de l'ATP et production de purines. Ce catabolisme peut augmenter jusqu'à 50 fois lors du déséquilibre entre l'apport en oxygène et la demande. Au niveau cardiaque, durant l'ischémie, l'adénosine est produite dans les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les muscles lisses vasculaires par déphosphorylation de l'AMP via les endo- et ecto-5'-nucléotidases (Sommerschild, 2000).

Le taux d'hydrolyse du SAH lors de l'ischémie demeure cependant similaire au taux en situation normoxique (Sommerschild, 2000). Aucune accumulation d'adénosine n'a été détectée dans le fluide interstitiel lorsque la circulation coronarienne était au-dessus de 50 à 60 % par rapport à la normale dans un modèle d'ischémie chez le chien (Delyani, 1994). Cette situation représente le point où les compensations fonctionnelles et métaboliques sont outrepassées et que le myocarde n'est plus en situation de maintien de l'équilibre énergétique. Au niveau du cerveau, les niveaux d'adénosine augmentent jusqu'à cent fois lors d'une ischémie ou d'un stress oxydatif (Rudolphi, 1992). À ce moment, les taux d'ATP chutent et ceux d'adénosine augmentent dramatiquement (Berne, 1974).

L'adénosine influence les fonctions de plusieurs types cellulaires afin de les altérer. Ses effets incluent la vasodilatation des artérioles coronaires (Berne, 1980), la diminution des interactions entre les neutrophiles et l'endothélium (Cronstein, 1986), l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la relâche de thromboxane (Tanabe, 1984) et l'inhibition de la neurotransmission sympathique (Richardt, 1987). Ces changements sont dus à l'activation des différents récepteurs de l'adénosine.

3.2 Récepteurs

Quatre grands sous-types de récepteurs de l'adénosine ont été clonés et caractérisés chez les mammifères jusqu'ici et sont nommés A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3 . Les quatre sous-types sont des protéines possédant sept passages transmembranaires, glycosylés sur un résidu asparagine au niveau extracellulaire, exprimés à la surface cellulaire et sont couplés aux protéines G. Tous ces récepteurs, sauf le sous-type A_{2A} , possèdent des sites de palmylation sur l'extrémité carboxy-terminale (Linden, 2001). L'adénosine en est le principal ligand (Fredholm, 2001).

3.2.1 Récepteurs A₁ de l'adénosine

Les récepteurs A₁ de l'adénosine sont des protéines de 326 acides aminés (humains, rats et souris) d'environ 36 kDa couplés aux protéines G_{αi}. Le gène du récepteur se trouve chez l'humain sur le chromosome 1q32.1 (Megson, 1995). La transcription du gène résulte en deux différents transcrits. Le premier contient les exons 4, 5 et 6 et se retrouve dans tous les tissus exprimant ce récepteur. Les tissus où l'expression est la plus forte renferment cependant le deuxième transcrit possible, contenant les exons 3, 5 et 6 (Ren, 1994, 1995). L'inactivation (knock-out ou KO) du gène des récepteurs A₁ de l'adénosine chez la souris n'entraîne pas de défaut de développement mais provoque une hyperalgésie et une anxiété accrue (Johansson, 2001; Sun, 2001). Par ailleurs, l'hypoxie neuronale est mieux tolérée en regard de l'activité des neurones (Brown, 2001a). Le réflexe tubuloglomérulaire (en réponse à une augmentation de débit dans l'anse de Henlé) est absent et l'activité de la rénine plasmatique est augmentée chez ces mêmes souris (Brown, 2001a). De plus, ces animaux ont une température interne normale, sont fertiles mais ont une progéniture moins nombreuse (Minelli, 2004). L'inactivation du gène quant à elle confère une intolérance à l'ischémie-reperfusion cardiaque (Reichelt, 2005). Au contraire, la surexpression spécifique au tissu cardiaque de ces récepteurs entraîne une résistance et une meilleure récupération aux dommages liés à l'ischémie-reperfusion (Matherne, 1997; Gauthier, 1998).

Le tableau 3.1 résume les principaux ligands des récepteurs de l'adénosine. Le sous-type A₁ possède une plus grande affinité pour les agonistes tels que le 5'-(N-éthylecarboxamido)adénosine (NECA), le N⁶-3-Iodobenzyladénosine-5'-N-méthyluronamide (IB-MECA), le R-N⁶-(phénylisopropyl)-adénosine (R-PIA) et le N⁶-cyclopentyladénosine (CPA) (Zhou, 1992; Klotz, 1998). Il semble que ce récepteur soit stéréosélectif étant donné sa plus faible affinité (75 nM) pour l'isomère *S* du PIA, le S-N⁶-(phénylisopropyl)-adénosine (S-PIA) par rapport au R-PIA. Par ailleurs, un autre agoniste avec modification par ajout d'un atome de chlore en position 2 de

Ligands	Espèces	A ₁	A _{2A}	A _{2B}		A ₃	Références
		Ki	Ki	Ki	EC ₅₀	Ki	
Agonistes							
NECA	h	14	20	330-360	2400-3100	6.2-10	1-8
	r	3.7-63	7.8-22			113-260	
IB-MECA	h	3.7	2500	54000	11000	1.2	1-3, 9, 10
	r	54	56			1.1	
AB-MECA	h	1500	3600		51500	22	1-3, 10
	r	430	1600			14	
IAB-MECA	h	8.5	470		25200	0.64	1-3, 10
	r	18	200			1.3	
CI-IB-MECA	h	120	2100			11	1, 2, 11, 12
	r	820	470			0.33	
CGS21680	h	290	27		88800	67	1-3, 9, 13-17
	r	2600-3100	15-22			361000	
HENECA	h	60	6.4		6100	2.4	8, 11, 14, 18-20
	r	130-160	1-3.8			18-26	
PENECA	h	560	620		100000	6.2	1, 2, 11, 19, 21
	r	698-1000	120-267			728	
PHPNECA	h	2.7	3.1		1100	0.42	1, 2, 11, 19, 21, 22
	r	2.5-3.8	0.9-2.7			7.7	
AMP579	h	2	56			1000	23
	r	1.7-5	56			>10000	
R-PIA	h	2	860		11200	16	1-3, 5-7, 16, 24, 25
	r	0.51-1.3	124-730			160-220	
S-PIA	h	75	7800	62000	21700	45	1-3, 5, 8, 9, 16
	r	29-49	1800			920	
CPA	h	2.3	790	21000-34400	18600	43	1-5, 9, 16, 24, 25
	r	0.6-0.8	460-2000			240	
CCPA	h	0.8	2300	40100	18800	42	1-3, 6, 9, 16, 24, 25
	r	0.23-0.4	3900			240	
Antagonistes							
Théophylline	h	6800	1700	7900	40000	8600	1-3, 9, 24-26
	r	11000	32000			>100000	
DPCPX	h	3.9	129	50-51	1000	4000	1-3, 9, 16, 20, 27
	r	0.18-0.3	340			>10000	
XAC	h	29	1	7-12	140	92	1-4, 9, 13, 26-28
	r	2.8-4	24-50			>100000	
MRS1574	h	400	500	2		570	1, 26
MRS1595	h	3000	2000	34		670	2, 3, 29
MRS1706	h			1.4			26
KW6002	h		2.2				30, 31
CGS15943	h	3.5	4.2	16-112	910	14-90	1-4, 13, 20, 23, 26, 32,
	r	6.4-21	1.2-3.3			>100000	
ZM241385	h	260	0.8	31		>10000	1-3, 9, 20, 23, 34, 35
	r	2000-2040	0.3			87	
SCH58261	h	290	0.6			>10000	1-3, 23, 33, 34
	r	120-128	2.3				

Tableau 3.1 Principaux ligands des différents récepteurs de l'adénosine. L'affinité est exprimée selon le Ki pour tous les sous-types ainsi que selon l'EC₅₀ (adénylate cyclase) pour les récepteurs A_{2B} de l'adénosine. Les unités sont en nM. Les espèces étudiées sont l'humain (h) et le rat (r). Les noms chimiques complets des ligands sont énumérés dans la section « Liste des abréviations » et dans le texte du présent chapitre de cette thèse. D'avantages d'agonistes et d'antagonistes sont décrits dans le texte faute de caractéristiques pharmacologiques. Les références de ce tableau sont situées à l'annexe 1.

l'adénosine, le 2-chloro-CPA (CCPA), possède une bonne affinité pour le récepteur A₁ (Klotz, 1998). La modification du CPA en 5'-éthylthio-CPA engendre une molécule agoniste partiel pour le récepteur A₁ de l'adénosine (65 % de l'efficacité intrinsèque du CPA avec une affinité de 45 nM) (van der Wenden, 1998). Une sélectivité moins élevée pour le récepteur A₁ de l'adénosine en comparaison au sous-type A₃ s'observe pour tous ces types agonistes. Ce phénomène pourrait s'expliquer en partie par le fait que ces deux sous-types de récepteurs possèdent un ancêtre commun et que l'homologie dans la structure primaire est plus élevée (> 50 %) en comparaison avec les A₂ de l'adénosine (sous-types A_{2A} et A_{2B} possèdent une homologie de séquence < 45 %) (Fredholm, 2001). En ce qui a trait aux antagonistes, la méthylxanthine théophylline possède une affinité de l'ordre du µM et n'est donc pas sélective. L'affinité la plus élevée pour le récepteur A₁ est attribuée à l'antagoniste xanthine 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX) (Linden, 1999). Il est 100 à 10 000 fois plus sélectif chez ce sous-type de récepteur de l'adénosine par rapport aux autres mais possède malgré tout une affinité de l'ordre de 50 nM pour le sous-type A_{2B}. La non-xanthine 9-chloro-2-(2-furanyl)-[1,2,4]-triazolo[1,5-c]-quinazolin-5-amine (CGS15943) est également un exemple d'antagoniste avec une bonne affinité pour le sous-type A₁ en comparaison aux récepteurs A₃ de l'adénosine mais sa sélectivité est inférieure à celle du DPCPX (Ji, 1999). La sélectivité de ces molécules est une variable capitale pour discriminer le récepteur A₁ de l'adénosine des autres sous-types. Évidemment, le simple usage des outils pharmacologiques n'est pas recommandé pour cette discrimination. Il va de soi qu'il est nécessaire d'utiliser d'autres techniques (RT-PCR, détection de type Northern, immunodétection) afin de montrer l'expression ou la présence de ces récepteurs ou même des autres sous-types dans un système donné.

Les récepteurs A₁ de l'adénosine sont présents dans l'œil, les glandes surrénales, le tissu adipeux, les testicules, l'estomac, le foie, la rate, le cœur, l'hypophyse et le système nerveux central au niveau du cortex, de l'hippocampe, du cervelet, du thalamus, la base du cerveau et la moëlle épinière (Reppert, 1991; Dixon, 1996). Ces récepteurs sont exprimés

également dans les autres régions du cerveau, les poumons, les muscles squelettiques, les reins, les glandes salivaires et les intestins. Ils seraient impliqués dans l'inhibition de la lipolyse, la réduction de la filtration glomérulaire et l'anti-nociception. Ils jouent également un rôle prépondérant dans le préconditionnement ischémique (section 5.1.1.1) (Fredholm, 2000; Miura, 2000; Sommerschild, 2000; Fredholm, 2001; De Jong, 2002). De plus, la stimulation des récepteurs A_1 de l'adénosine situés dans du tissu excitable comme le coeur ou les neurones engendre un changement de conductance des ions K^+ et Ca^{2+} (Dolphin, 1986). Par ailleurs, une stimulation de ces mêmes récepteurs au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques permet de diminuer la relâche de norépinéphrine (effet « anti-adrénergique ») pour ultimement engendrer une diminution du travail cardiaque et la résistance vasculaire (Burgdorf, 2001; Burgdorf, 2005) via des effets cardiaques inotropes, chronotropes et dromotropes négatifs. La protection par les récepteurs A_1 de l'adénosine pourrait aussi produire une réponse angiogénique et provoquer ainsi une stimulation de la réparation tissulaire (Linden, 2003).

Lors de leur stimulation, ces récepteurs inhibent l'adénylate cyclase (réduction de la quantité d'AMPc produite) via l'activation de la protéine $G_{\alpha i}$ (Stiles, 1992; Linden, 1993b). Au niveau des oreillettes et des ventricules cardiaques où les catécholamines et l'histamine sont des molécules qui activent l'adénylate cyclase, les récepteurs A_1 de l'adénosine réduisent cette activation (ceux-ci réduisant minimalement l'activité de cette enzyme en absence de stimulation). Ceci a pour conséquence de diminuer certains courants ioniques membranaires cardiaques (Belardinelli, 1995) via réduction d'AMPc. Il a également été démontré que les récepteurs A_1 de l'adénosine étaient couplés à la phospholipase C (PLC) via les protéines $G_{i1/2/3}$ et $G_{\beta\gamma}$ (Dickenson, 1998), permettant ainsi la génération de diacylglycérol (DAG) et d'inositol-triphosphate (IP_3) (Akbar, 1994). Cette synthèse de DAG entraîne l'activation de la protéine kinase C (PKC). Par ailleurs, il a été observé que les récepteurs A_1 de l'adénosine pouvaient se coupler à la phospholipase A_2 (PLA_2) via une protéine G_i et menaient à la génération d'arachidonate (Akbar, 1994).

La désensibilisation de ce sous-type de récepteur de l'adénosine requiert une exposition prolongée à l'agoniste (plusieurs minutes, voire même heures) (Parsons, 1987; Ramkumar, 1991; Abbracchio, 1992; Casati, 1994) via sa phosphorylation par les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (G-Protein Coupled Receptor Kinase ou GRK) (Ramkumar, 1991) et le découplage fonctionnel de sa protéine G. L'exposition prolongée (jours) à un antagoniste provoque sa resensibilisation et sa régulation positive (Murray, 1982; Ramkumar, 1991; Shi, 1994). À ce titre, aucun changement dans le contenu de son ARNm n'est observé. L'effet semble être induit par des modifications au niveau post-traductionnel (Johansson, 1993).

3.2.2 Récepteurs A_{2A} de l'adénosine

Le récepteur A_{2A} de l'adénosine, avec ses 410 acides aminés chez l'humain (409 acides aminés chez le rat et la souris), est le récepteur de l'adénosine possédant le poids moléculaire le plus élevé (environ 45 kDa; figure 3.3). Ceci serait dû à sa longue extrémité carboxy-terminale cytoplasmique. Ces récepteurs sont couplés à la protéine G_{αs} et permettent la stimulation de l'adénylate cyclase ainsi que la production d'AMPc (Liang, 1996; Xu, 1996; Olah, 1997). Ces récepteurs possèdent un pont disulfure entre les résidus cystéine⁷⁴ et cystéine¹⁶³ ainsi qu'une haute affinité pour l'adénosine (EC₅₀ d'environ 0,1 μM). De plus, ils ne possèdent aucun site de palmytylation connu et sont glycosylés sur le résidu asparagine¹⁵¹.

Le gène du récepteur A_{2A} de l'adénosine est situé sur le chromosome 22q11.23 chez l'homme (MacCollin, 1994) et sur le chromosome 10 chez la souris. Deux exons forment sa structure (Fredholm, 2000). Trois différentes lignées de souris KO pour les récepteurs A_{2A} de l'adénosine ont été générées (CD1, C57BL/6 et 129-Steel) (Ledent, 1997; Chen, 1999; Chen, 2001). Ces trois lignées sont viables et fertiles. Le groupe de Ledent et coll. (Ledent, 1997) a constaté que l'absence de ce récepteur entraîne une augmentation de l'agressivité, de la pression sanguine, du rythme cardiaque et de l'agrégation plaquettaire

ainsi qu'une hypoalgésie. Le groupe de Chen et coll. (Chen, 1999) n'a quant à lui détecté aucun changement de pression artérielle ni de rythme cardiaque (Chen, 1999; Day, 2003). Ces différences entre les groupes de Ledent et Chen pourraient s'expliquer par le fait que les souches utilisées sont différentes (Chen, 1999).

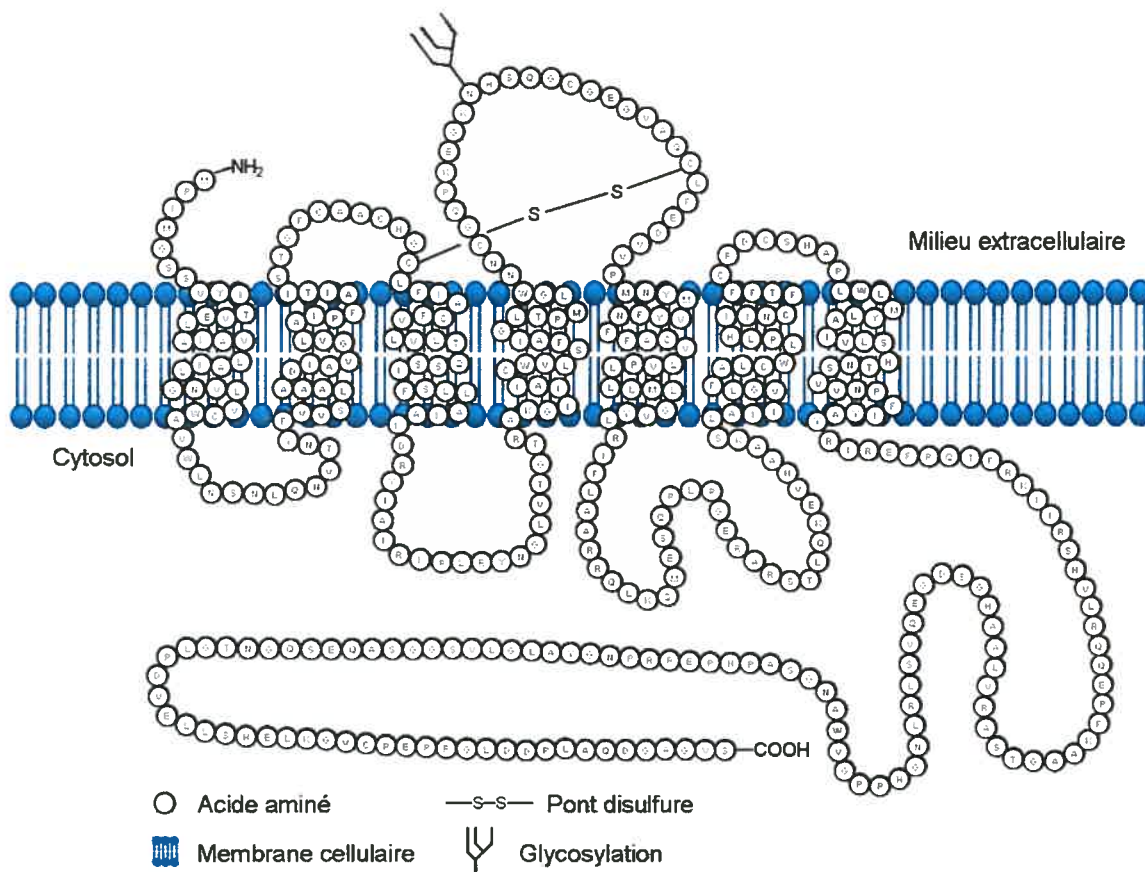


Figure 3.3 Représentation schématique du récepteur A_{2A} de l'adénosine. Le pont disulfure est situé entre les résidus Cys⁷⁴ et Cys¹⁶³. De plus, le résidu Asn¹⁵¹ porte la glycosylation. Son extrémité carboxy-terminale est la plus longue de tous les récepteurs de l'adénosine.

Le tableau 3.1 montre que le récepteur A_{2A} de l'adénosine possède une affinité particulièrement élevée pour l'agoniste 2-p-(2-Carboxyéthyl)phenéthylamino-5'-N-éthylcarboxamidoadénosine (CGS21680), un dérivé de la molécule NECA (Hutchison,

1989; Klotz, 1998). Ce ligand est 170 fois plus sélectif pour le sous-type A_{2A} que pour le récepteur A_1 de l'adénosine chez le rat et de deux à trois fois plus sélectif pour le récepteur A_{2A} de l'adénosine qu'au sous-type A_3 chez l'humain (Jarvis, 1989; Klotz, 1998; Kull, 1999a). Un autre agoniste, l'ATL146e, a été généré et a démontré une affinité 50 fois plus élevée pour le récepteur A_{2A} de l'adénosine en comparaison au CGS21680 (Ross, 1999; Linden, 2001; Rieger, 2001). Le dérivé du NECA 2-hexyn-1-yl-5'-(N-éthylecarboxamido)adénosine (HENECA) détient également une bonne affinité pour le récepteur A_{2A} de l'adénosine (Klotz, 1999) mais sans grande sélectivité (il possède aussi une haute affinité pour le récepteur A_3 de l'adénosine, empêchant donc l'utilisation de ces ligands pour discriminer le sous-type A_{2A} des autres). En ce qui a trait aux antagonistes, la non-xanthine 7-(2-phényléthyl)-5-amino-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidine (SCH58261) et sa congénère 4-[2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]-éthyl]phénol (ZM241385) possèdent une très haute affinité pour le récepteur A_{2A} de l'adénosine autant chez le rat que l'humain (Poucher, 1995; Linden, 1999; Ongini, 1999). Le ZM241385 possède cependant une certaine affinité pour le sous-type A_{2B} (Ji, 1999; Linden, 1999; Ongini, 1999; Uustare, 2005). Le (E)-1,3-diéthyl-8-(3,4-diméthoxystyryl)-7-méthyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione (KW-6002) possède quant à lui une affinité de 2,2 nM et une sélectivité 68 fois supérieure au sous-type A_1 (Nonaka, 1997; Kanda, 1998). Un nouvel antagoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine dérivé du KW-6002 (nom inconnu jusqu'à maintenant) a été synthétisé (Matasi, 2005) et possède une affinité de 0,8 nM et une sélectivité 100 fois supérieure pour le récepteur A_{2A} de l'adénosine que pour le sous-type A_1 . Récemment, d'autres antagonistes dérivés aminés du 6-(2-furanyl)-9H-purine ont été synthétisés (Kiselgof, 2005), ceux-ci possédant une très bonne affinité (1,4 à 3,1 nM) ainsi qu'une sélectivité de 400 à 600 fois supérieure pour le sous-type A_{2A} par rapport aux récepteurs A_1 de l'adénosine. D'autres caractéristiques pharmacologiques seront disponibles sous peu.

Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine sont exprimés au niveau des poumons, de la rate, du thymus, des leucocytes, des plaquettes sanguines, des cellules endothéliales, des cellules

musculaires lisses vasculaires (CMLV), des myocytes cardiaques, du striatum, du bulbe olfactif ainsi que dans les neurones GABAergiques des noyaux accumbens (Svenningsson, 1999; Fredholm, 2002). Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine ont plusieurs fonctions dans différents systèmes. Ils permettent entre autres une régulation de l'intégration sensorimotrice dans les ganglions basaux et une stimulation de l'activité de certains nerfs sensoriels (Svenningsson, 1999; Fredholm, 2002). De plus, leur activation entraîne une inhibition de l'agrégation des plaquettes (Hourani, 1996) ainsi qu'un puissant effet anti-inflammatoire en diminuant l'activation des leucocytes et la génération de cytokines pro-inflammatoires comme le $TNF\alpha$ (Le Vraux, 1993; Cronstein, 1994; Fredholm, 1996; Vinten-Johansen, 1999; Haskó, 2000; Link, 2000; Ohta, 2001; Lukashev, 2004; Lappas, 2005; Zhang, 2005a). Il a également été démontré que le sous-type A_{2A} pouvait créer une vasodilatation directe en agissant sur l'endothélium vasculaire ou sur les CMLV (Shryock, 1997). Par ailleurs, l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine à la reperfusion (intervention post-ischémique au chapitre 5, section 5.1.1.3) engendre une réduction de la taille de l'infarctus dans plusieurs modèles d'ischémie-reperfusion incluant le chien, le lapin et le rat (Schlack, 1993; Jordan, 1997; Lozza, 1997; Cargnoni, 1999; Xu, 2000; Lasley, 2001a; Xu, 2001; Peart, 2002; Kis, 2003; Xu, 2003; Boucher, 2004; Boucher, 2005b). De plus, la stimulation du sous-type A_{2A} par l'adénosine endogène pourrait expliquer en partie l'effet protecteur du postconditionnement (section 5.1.1.2) (Linden, 2005). De façon similaire au sous-type A_1 , les récepteurs A_{2A} de l'adénosine pourraient promouvoir l'angiogénèse suite à un dommage tissulaire lors de leur stimulation au niveau des cellules endothéliales (Desai, 2005). Paradoxalement à l'effet protecteur de l'activation de ces récepteurs, l'utilisation d'antagoniste des récepteurs A_{2A} au niveau du cerveau s'est avérée efficace à réduire les dommages liés à une ischémie cérébrale (Monopoli, 1998), à la maladie de Parkinson (Chen, 2003; Schwarzschild, 2003), à la maladie de Huntington (Blum, 2003a; Blum, 2003b) ainsi qu'à réduire les symptômes liés à la dépression (El Yacoubi, 2001; Fedorova, 2003).

Comme mentionné précédemment, les récepteurs A_{2A} de l'adénosine sont couplés à la protéine $G_{\alpha s}$ et entraînent une activation de l'adénylate cyclase ainsi que la génération d'AMPc (Palmer, 1995a). De plus, selon certaines études, ce sous-type de récepteur peut activer les protéines G_{olf} et $G_{15/16}$, engendrant respectivement la génération d'AMPc (Olah, 1997; Fredholm, 2000) et l'activation de la PLC (production d' IP_3 (Offermanns, 1995)). Par ailleurs, la stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine permet l'activation des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) ERK1/2. Les voies menant à cette activation diffèrent selon le type et les propriétés des cellules étudiées mais impliqueraient soit, d'une part, la voie AMPc-Ras-MEK1 dans des cellules CHO (Sexl, 1997) ou, d'autre part, la voie PKC-Ras-SOS dans des cellules HEK293 (Seidel, 1999).

La désensibilisation du récepteur A_{2A} de l'adénosine requiert quelques minutes à quelques heures (Anand-Srivastava, 1989; Ramkumar, 1991; Chern, 1993; Makujina, 1993; Palmer, 1994) via sa phosphorylation par GRK2 (Palmer, 1994; Mundell, 1997; Palmer, 1997b). Le résidu Thréonine²⁹⁸ situé au niveau de la longue extrémité carboxy-terminale semble essentiel à ces phénomènes (Palmer, 1997a). Par contre, la présence de la structure complète n'est pas un élément prépondérant dans la désensibilisation. La délétion des 95 derniers acides aminés n'entraîne pas de changement significatif dans le profil de désensibilisation (Palmer, 1997a). La fonction précise de l'extrémité carboxy-terminale demeure cependant incertaine (Piersen, 1994). Le récepteur A_{2A} de l'adénosine fait aussi l'objet d'une resensibilisation et d'une régulation positive suite à une exposition prolongée à un antagoniste mais à un degré moins élevé que son congénère A_1 (Johansson, 1993; Traversa, 1994).

3.2.3 Récepteurs A_{2B} de l'adénosine

Les récepteurs A_{2B} de l'adénosine sont des protéines de 328 acides aminés (humain) d'environ 36 kDa. Ces récepteurs sont couplés à la protéine $G_{\alpha s}$ et permettent ainsi la stimulation de l'adénylate cyclase (Pierce, 1992). Le gène des récepteurs A_{2B} est situé sur

le chromosome 17p12-11.2 chez l'homme (Jacobson, 1995) et engendre des transcrits de 1,8 et de 2,2 kb (Stehle, 1992). Aucune lignée de souris KO pour ce gène n'a encore été réalisée mais l'utilisation d'ARNi au niveau de fibroblastes cardiaques a permis de démontrer leur importance dans la prolifération ainsi que dans la synthèse de collagène et d'autres protéines (Chen, 2004). L'utilisation de souris KO pour le sous-type A_{2A} a quant à elle permis de démontrer l'importance du récepteur A_{2B} de l'adénosine dans le contrôle du débit coronarien (Morrison, 2002).

Ce récepteur possède une affinité moins élevée pour les agonistes actuellement disponibles en comparaison au sous-type A_{2A} (tableau 3.1) (Fredholm, 2001). Le plus puissant ligand utilisé pour le récepteur A_{2B} de l'adénosine est le NECA (Klotz, 1998). Il possède une bonne affinité pour ce sous-type en comparaison aux autres agonistes mais n'est pas très sélectif (Gao, 2004). Le 2-(3-hydroxy-3-phényl)propyn-1-yl-5'-(N-éthylecarboxamido)adénosine (PHPNECA) possède quant à lui une bonne affinité pour ce sous-type (Volpini, 2003) mais possède également une mauvaise sélectivité (affinité pour le sous-type A_3 à 0,42 nM). Au contraire, les antagonistes de type xanthine tels le 8-[4-[(4-cyano)phénylcarbamoyleméthyl]oxy]phényl]-1,3-di-(n-propyl)xanthine (MRS1754) (Kim, 2000) et le 8-[4-[(4-cyano)phénylcarbamoyleméthyl]oxy]phényl]-1,3-di-(n-propyl)xanthine-N,N-(2,3-diméthylmaléyl)hydrazide (MRS1595) (Kim, 1999) détiennent à la fois une bonne affinité et une bonne sélectivité pour le sous-type A_{2B} (en moyenne 20 à 300 fois plus sélectif). Le nouvel antagoniste N-(4-acétylphényl)-2-(4-[2,3,6,7-tétrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl]phénoxy)acétamide (MRS1706) possède également une excellente affinité d'environ 1,4 nM pour le récepteur A_{2B} de l'adénosine, largement inférieure aux 100 à 200 nM requis pour les autres sous-types de récepteurs de l'adénosine (Kim, 2000; Kiec-Kononowicz, 2001; Desai, 2005; Teng, 2005). Il est donc 70 à 140 fois plus sélectif pour le récepteur A_{2B} de l'adénosine. Malgré le MRS1706, le manque d'outils pharmacologiques agonistes est pour l'instant un problème majeur dans l'étude du sous-type A_{2B} . D'autres techniques utilisant les ARNi ou l'utilisation de souris KO permettront de clarifier efficacement le rôle exact de ces récepteurs.

De hauts niveaux d'expression des récepteurs A_{2B} ont été mesurés par la quantité d'ARNm dans le caecum, le gros intestin et la vessie. Par ailleurs, de plus faibles niveaux ont été observés dans les poumons, les vaisseaux sanguins, certaines cellules lymphatiques (mastocytes), les yeux, le tissu adipeux, les glandes surrénales, le cerveau, les reins, le foie, les ovaires ainsi que l'hypophyse (Stehle, 1992). Malgré leur présence dans l'endothélium vasculaire et dans la musculature lisse, le rôle des récepteurs A_{2B} de l'adénosine dans le système cardiovasculaire est encore peu connu mais seraient entre autres impliqués dans la vasodilatation (Haynes, 1995; Morrison, 2002; Talukder, 2003). En effet, les récepteurs A_{2B} de l'adénosine peuvent engendrer une vasodilatation et une augmentation du débit coronarien. Ces récepteurs seraient aussi impliqués dans la sécrétion d'interleukine-8 par les mastocytes (Feoktistov, 1995). L'angiogénèse via la stimulation du récepteur A_{2B} de l'adénosine au niveau de l'endothélium vasculaire (Feoktistov, 2002) ou via la coopération de ce même récepteur avec le sous-type A_3 au niveau des mastocytes (Feoktistov, 2003) est aussi possible. Par ailleurs, contrairement au récepteur A_{2A} de l'adénosine, le sous-type A_{2B} posséderait des propriétés pro-inflammatoires (Auchampach, 1997a; Schwaninger, 1997; Sitaraman, 2001; Feoktistov, 2002; Zhong, 2005) et son blocage pourrait constituer une stratégie anti-inflammatoire. Le rôle exact du récepteur A_{2B} de l'adénosine reste encore à être précisé.

La stimulation des récepteur A_{2B} de l'adénosine entraîne l'activation de l'adénylate cyclase via la protéine G_{α_s} (Brackett, 1994; Peakman, 1994). Cette même stimulation serait également en mesure d'activer la PLC par la protéine $G_{q/11}$ et augmenterait la génération d' IP_3 (Feoktistov, 1995; Gao, 1999; Linden, 1999). Par ailleurs, il a été observé que les récepteurs A_{2B} de l'adénosine entraînent l'activation des MAPK ERK1/2 et des protéines kinases JNK et p38. En effet, Feoktistov et coll. (Feoktistov, 1999) ont observé une activation rapide maximale d'ERK après une minute de stimulation des récepteurs A_{2B} de l'adénosine et dix à quinze minutes pour JNK et p38, démontrant ainsi la capacité de ces récepteurs à stimuler les MAPK. Par ailleurs, Teng et coll. (Teng, 2005) ont également

démontré l'activation de p38 suite à la stimulation des récepteurs A_{2B} de l'adénosine dans des artères coronariennes porcines. Schulte et Fredholm (Schulte, 2003) ont quant à eux établi l'implication de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et de PKA dans l'activation de ERK1/2 et p38 par les récepteurs A_{2B} de l'adénosine. ERK1/2 semblerait être activée par une voie engageant la PI3K mais pas la PKA. La protéine p38 quant à elle serait activée par la voie de la PKA et de l'AMPc sans impliquer la PI3K.

La désensibilisation du récepteur A_{2B} de l'adénosine implique sa phosphorylation par GRK2 (Mundell, 1997) pour éventuellement mener à son endocytose (Clain, 2000). Il demeure incertain s'il existe des différences entre celui-ci et son congénère A_{2A} dans les profils de désensibilisation. Étant donné l'affinité réduite pour l'adénosine du sous-type A_{2B}, celui-ci pourrait être plus résistant à la désensibilisation que le récepteur A_{2A} de l'adénosine dans les mêmes conditions.

3.2.4 Récepteurs A₃ de l'adénosine

Les récepteurs A₃ de l'adénosine sont des protéines de 318 acides aminés (humain) et sont couplés à la protéine G_{αi} (Palmer, 1995b). Le gène humain est situé sur le chromosome 1p21-p13 (Atkinson, 1997) (chromosome 3 chez la souris). De façon similaire au sous-type A₁, deux différents transcrits du gène sont générés (2 et 5 kb, le premier étant prédominant) (Atkinson, 1997). L'inactivation (KO) du gène chez la souris n'entraîne pas d'altération majeure du phénotype (rythme cardiaque, pression artérielle, fertilité, viabilité) mais ces souris possèdent une pression oculaire et une réponse inflammatoire réduites en comparaison au type sauvage (Salvatore, 2000; Avila, 2002). De plus, ces mêmes souris ont une réponse vasodilatatrice anormalement élevée lors de l'administration d'adénosine (Zhao, 2000). Par ailleurs, l'absence de ces récepteurs confère au myocarde une résistance à l'ischémie-reperfusion (Guo, 2001) en réduisant la réponse inflammatoire (réduction d'accumulation de neutrophiles).

Comme le montre le tableau 3.1, les ligands comme le R-PIA, le S-PIA, le CPA et le CCPA ont des affinités de l'ordre de 16 à 45 nM, une affinité bien moins élevée que pour les récepteur A₁ de l'adénosine (Klotz, 1998). Cependant, plusieurs agonistes comme le HENECA, le PHPNECA, le N⁶-4-aminobenzyladénosine-5'-N-méthyluronamide (AB-MECA), le N⁶-4-amino-3-iodobenzyladénosine-5'-N-méthyluronamide (IAB-MECA) ou le 2-chloro-N⁶-3-iodobenzyladénosine-5'-N-méthyluronamide (Cl-IB-MECA) possèdent des affinités en deçà de 15 nM et sont de 3 à 70 fois plus sélectifs pour le sous-type A₃ (Klotz, 1998; Klotz, 1999). Le NECA lui-même possède plus d'affinités pour le récepteur A₃ de l'adénosine que les sous-types A₁ ou A_{2A} (Klotz, 1998). Aucun antagoniste de type xanthine ne possède une bonne affinité ou sélectivité pour le récepteur A₃ de l'adénosine. La xanthine 8-[4-[[[(2-aminoéthyl)amino]carbonyl]méthyl]oxy]phényl]-1,3-dipropylxanthine (XAC) possède une affinité de l'ordre du 92 nM (Klotz, 1998) mais détient également une bonne affinité pour les autres sous-types de récepteurs de l'adénosine (Linden, 1999), l'empêchant ainsi d'être utilisée pour discriminer le sous-type A₃. Il a par contre été démontré que le composé non-xanthine 4-methoxy-N-[2-(2-pyridinyl)quinazolin-4-yl]benzamide (VUF8504) dispose d'excellentes affinité et sélectivité pour le récepteur A₃ de l'adénosine (17 nM) en comparaison aux sous-types A₁ et A_{2A} (van Muijlwijk-Koezen, 1998). Par ailleurs, d'autres antagonistes non-xanthines tels le 9-chloro-2-(2-furyl)-5-[(phénylacétyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (MRS1220) (Kim, 1996), le 3-éthyl-5-(4-nitrobenzyl)-2-méthyl-4-phényléthynyl-6-phényl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate (MRS1334) (Jiang, 1997) et le 5N-(4-methoxyphenylcarbamoyl)amino-8-propyl-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine (MRE3008F20) (Varani, 2000) possèdent aussi de bonnes affinités (affinités respectives de 0,7, 2,7 et 0,29 nM) et sont en moyenne de 500 à 30 000 fois plus sélectifs au sous-type A₃ qu'aux autres.

Ces récepteurs se retrouvent dans les testicules, les mastocytes, le thalamus, l'hypothalamus, la thyroïde, le foie, les reins, l'utérus, le placenta, le jéjunum, le colon proximal, les yeux, l'aorte ainsi que dans le tissu cardiaque (Zhou, 1992; Salvatore, 1993;

Linden, 1994; Dixon, 1996). Les testicules de rat montrent une expression très élevée de ce récepteur aux niveaux des spermatozoïdes et des spermatides (Linden, 1993a; Salvatore, 1993). Par ailleurs, les plus hauts niveaux d'ARNm du récepteur A₃ de l'adénosine ont été observés dans les poumons (Salvatore, 1993). Ainsi exprimés, ces récepteurs auraient un rôle à jouer dans l'inflammation des voies respiratoires. En effet, il a été observé que dans les patients souffrant de cette inflammation, l'expression du récepteur était augmentée au niveau des poumons et des éosinophiles périphériques (Walker, 1997).

Parralèlement, les récepteurs A₃ de l'adénosine sont impliqués dans le préconditionnement ischémique (section 5.1.1.1) (Liu, 1994; Auchampach, 1997b; Stambaugh, 1997; De Jong, 2002). De façon similaire aux récepteurs A₁ de l'adénosine, l'administration avant l'ischémie d'un agoniste spécifique au sous-type A₃ permet de réduire la taille de l'infarctus et l'administration d'un antagoniste A₃ en atténue par ailleurs les effets protecteurs (Liu, 1994; Auchampach, 1997b; Stambaugh, 1997), démontrant l'implication de ces récepteurs dans ce phénomène. De plus, la coopération entre les récepteurs A₃ et A_{2B} de l'adénosine des mastocytes pourrait permettre une réponse angiogénique lors de dommage tissulaire (Feoktistov, 2003).

Les récepteurs A₃ sont couplés à la protéine G_{αi}, réduisant ainsi l'activation de l'adénylate cyclase et la génération d'AMPc (Palmer, 1995b). Ces récepteurs peuvent aussi activer la protéine G_{q/11} pour augmenter la génération d'IP₃ et de DAG via la PLC (Palmer, 1995b). Par ailleurs, la stimulation des récepteurs A₃ de l'adénosine permet l'activation d'ERK1/2 avec des concentrations de NECA ou d'adénosine aussi basses que 10 à 30 nM, et ce en cinq minutes (Schulte, 2000).

Au contraire des autres récepteurs de l'adénosine, le phénomène de désensibilisation s'effectue en quelques minutes via la phosphorylation du récepteur au niveau de sa queue carboxy-terminale (Palmer, 1996) par la kinase GRK2 (Palmer, 1995a, 1997b, 2000). La génération de récepteurs chimériques (récepteur A₁ avec extrémité carboxy-terminale du

récepteur A₃ de l'adénosine) a permis de démontrer l'importance de l'extrémité carboxy-terminale dans cette désensibilisation (Palmer, 1996). De plus, la dépalmitoylation du récepteur le rend susceptible à une phosphorylation par GRK et une désensibilisation (Palmer, 2000).

Chapitre 4

Protéines et signalisation

Ce chapitre présente les différentes protéines et voies de signalisation qui sont étudiées dans cette thèse. Les notions exposées sont nécessaires à la bonne compréhension des données discutées dans les articles figurant dans cette thèse. L'apoptose, ses voies de signalisation et ses différentes protéines pro- et anti-apoptotiques y sont décrites. La phosphatidylinositol 3-kinase et son effecteur Akt sont subséquentement exposés. Ces deux protéines sont caractérisées de par leur structure, leur localisation et leur rôle respectif dans l'homéostasie et la survie cellulaire. Les protéines de choc thermique, qui sont responsables de la réponse rapide à un stress cellulaire, sont ensuite décrites. Les différentes familles de cette classe de protéines sont caractérisées. La protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc est exposée en dernier lieu. Ce facteur de transcription est rapidement activé lors de l'accumulation d'AMPc et engendre la transcription génique lors de sa dimérisation à l'intérieur du noyau cellulaire. Sa structure, son activation et le mécanisme de transcription génique sont expliqués à la dernière section de ce chapitre.

4.1 Apoptose

L'apoptose consiste en une mort cellulaire génétiquement programmée, naturellement développée lors de l'évolution, hautement régulée et qui survient lors de stimuli bien spécifiques. L'apoptose permet de maintenir l'homéostasie cellulaire et l'élimination des cellules anormales, non essentielles et potentiellement dangereuses pour l'organisme. Ainsi, l'apoptose est nécessaire lors de l'organogenèse de l'embryon, pour la sélection des cellules T dans le thymus (système immunitaire) et pour le renouvellement cellulaire normal mais est déficiente lors de pathologies comme le cancer (le taux d'élimination des cellules dangereuses pour l'organisme étant considérablement réduit). L'apoptose apparaît également dans diverses pathologies comme l'insuffisance cardiaque ou l'infarctus du myocarde, aggravant ainsi ces pathologies.

Les changements morphologiques et moléculaires ayant lieu durant l'apoptose sont différents de ceux observés durant la nécrose (chapitre 3, section 3.1, Infarctus du myocarde). L'apoptose est un processus pouvant affecter une seule ou un groupe de cellules, afin d'être éliminées et phagocytées par les cellules environnantes et celles du système immunitaire. Au contraire de la nécrose, l'apoptose n'enclenche généralement pas de réactions immunitaires ou inflammatoires (Neuss, 2001).

Deux voies majeures d'activation apoptotique ont été décrites à ce jour : 1) voie extrinsèque (récepteurs de mort) et 2) voie intrinsèque (mitochondrie et noyau).

4.1.1 Voie extrinsèque (récepteurs de mort)

En fonction du type cellulaire, des signaux reçus et de l'environnement entourant ces cellules, les récepteurs de mort peuvent engendrer la prolifération, la survie, la différenciation ou la mort (Nagata, 1997; Ashkenazi, 1998; Wallach, 1998). Cette voie apoptotique implique les récepteurs de mort cellulaire (« Death Receptors ») (figure 4.1). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires appartenant à la superfamille des gènes du facteur de nécrose tumorale (« Tumor Necrosis Factor » ou TNF) comportant des domaines extracellulaires riches en cystéines (Smith, 1994; Gruss, 1995). Ces récepteurs possèdent également des séquences cytoplasmiques homologues (domaine de mort ou « Death Domain », DD) qui permettent des interactions entre les récepteurs eux-mêmes et la machinerie apoptotique intracellulaire. Chez les mammifères, plusieurs récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs de mort, dont entre autres Fas (aussi appelé CD95 ou Apo1), TNFR et Apo3 (DR3). Fas et son ligand FasL auraient un rôle important dans l'apoptose lors de la délétion périphérique de cellules T à la fin d'une réaction immunitaire, dans la mort des cibles des cellules T cytotoxiques et NTK (cellules infectées par virus ou cellules cancéreuses) et dans la mort de certaines cellules inflammatoires (Nagata, 1997). Le TNFR, le récepteur au TNF, permet l'induction de gènes pro-inflammatoires et immunomodulateurs (Tartaglia, 1992) des macrophages et lymphocytes activés. Le

troisième type de récepteurs de mort, Apo3, est exprimé au niveau de la rate, du thymus et dans les cellules du sang périphérique (contrairement au TNFR qui est quant à lui exprimé de façon ubiquitaire) (Chicheportide, 1997; Marsters, 1998) et enclenche des phénomènes similaires au TNFR.

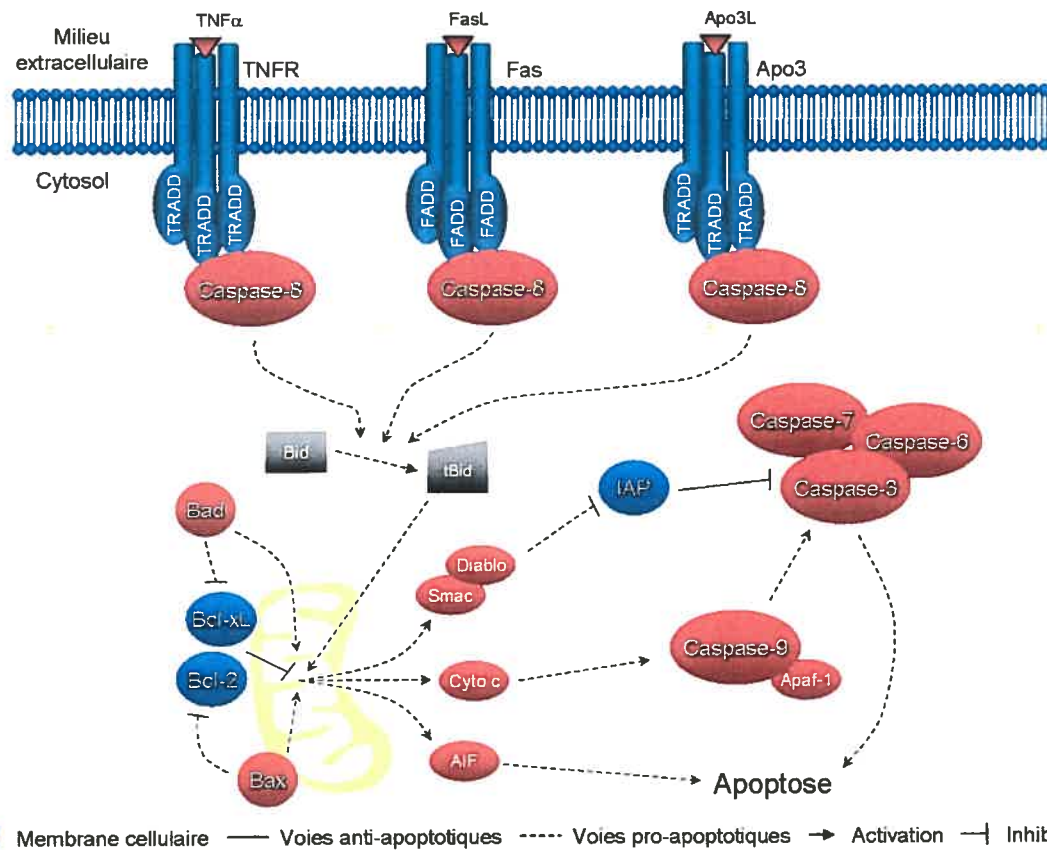


Figure 4.1 Voie extrinsèque de l'apoptose. Les récepteurs de morts (TNFR, Fas et Apo3) sont les médiateurs de cette voie. Via l'interaction entre ceux-ci et un ligand de mort à l'extérieur de la cellule, ils permettent l'activation de la voie apoptotique de la caspase-8.

Les trois types de récepteurs de mort, lors de la liaison du ligand, trimérisent (Smith, 1994; Gruss, 1995) et recrutent des molécules adaptatrices. Les récepteurs et les molécules adaptatrices s'associent via leurs DD respectifs. Les molécules adaptatrices sont

les mêmes pour les trois types de récepteurs de mort mentionnés précédemment. Ces trois récepteurs interagissent avec FADD, ou « Fas-Associated Death Domain », directement (comme pour Fas) ou indirectement via un autre adaptateur (comme pour TNFR et Apo3, l'adaptateur étant TRADD, ou « TNFR-Associated Death Domain »). En plus de posséder un DD, FADD comporte également un domaine effecteur de mort (« Death Effector Domain » ou DED). Ce DED permet de recruter la caspase-8 (elle aussi contenant un DED; caspase initiatrice), de l'activer et d'enclencher ainsi l'apoptose. Les caspases sont des enzymes constitutivement présentes dans toutes les cellules (sous forme zymogène) et sont activées par clivage protéolytique lors du stimulus apoptotique (Thornberry, 1998). La caspase-8, contenant un DED, interagit avec la molécule adaptatrice FADD et est activée lors de la liaison du ligand de mort au récepteur. La caspase-8 ira ensuite activer les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7) par clivage protéolytique. Ces caspases cliveront divers substrats à l'intérieur de la cellule pour engendrer sa dégradation.

4.1.2 Voie intrinsèque (mitochondrie et noyau)

La mitochondrie, site de la phosphorylation oxydative et de la génération de l'énergie, joue un rôle central dans l'apoptose. En effet, cette organelle contient à elle seule plusieurs facteurs pro- et anti-apoptotiques qui permettent une fine régulation de ces processus. Plusieurs stimuli mettent en péril l'équilibre précaire de la survie et peuvent enclencher une série d'événements menant ultimement à la mort de la cellule. Par ailleurs, le noyau cellulaire, site de l'expression génique, joue également un rôle dans la régulation des phénomènes apoptotiques. En effet, des facteurs nucléaires permettent d'enclencher la mort cellulaire programmée.

4.1.2.1 Mitochondrie

La mitochondrie, site majeur impliqué dans l'apoptose, contient des facteurs pro- et anti-apoptotiques. Lors de stimuli appropriés, la mitochondrie relâche ces facteurs. Ceux-ci régulent l'activation des caspases, des protéases à cystéine clivant divers substrats

La mitochondrie contient d'autres protéines pro-apoptotiques relâchées simultanément au cytochrome c et initiant l'apoptose. Ces facteurs (Smac/Diablo et AIF ou « Apoptosis Inducing Factor ») inhibent l'activité anti-apoptotique des IAP ou « Inhibitors of Apoptosis », ceux-ci inactivant normalement les caspases. Les AIF (facteur d'induction d'apoptose) transloquent vers le noyau pour causer la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Susin, 1999). Le relâchement de ces facteurs s'effectue via l'ouverture de pores mitochondriaux constitués de protéines membranaires. Deux hypothèses expliquent la relâche des facteurs apoptotiques : 1) le pore est constitué de protéines de la famille Bcl-2 et 2) le pore est un canal de perméabilité de transition.

La première hypothèse implique les protéines de la famille Bcl-2. Quelque quinze membres ont été identifiés chez les mammifères et possèdent au moins un des quatre motifs connus sous le nom de domaine d'homologie à Bcl-2 (BH ou « Bcl-2 Homology Domain »; BH1 à BH4). Les membres anti-apoptotiques de cette famille contiennent les domaines BH1 et BH2. Ce groupe de protéines inclut entre autres Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w. Les protéines pro-apoptotiques quant à elles ont une structure différente des protéines anti-apoptotiques. En effet, ces protéines pro-apoptotiques (dont entre autres Bax, Bak et Bok) possèdent non seulement les domaines BH1 et BH2 mais aussi un domaine BH3. De plus, certains membres de cette famille pro-apoptotique sont composés seulement d'un domaine BH3 (Bik, Bid et Bad) (Chittenden, 1995; Kelekar, 1998). Toutes ces protéines constitueraient et réguleraient l'ouverture d'un pore mitochondrial. Les protéines pro-apoptotiques sont capables d'oligomériser et de former un pore dans des doubles membranes lipidiques artificielles. Ces observations permettent de spéculer que ces protéines pourraient littéralement former des canaux assez grands pour la relâche du cytochrome c. Ce modèle propose donc que, par exemple, des oligomères de Bax (pro-apoptotique) formeraient des canaux relâchant le cytochrome c tandis que l'hétérodimérisation de Bcl-2 (anti-apoptotique) avec Bax ne permettrait pas au cytochrome c d'être libéré (Schendel, 1997; Kluck, 1999).

La deuxième hypothèse expliquant les pores mitochondriaux est le modèle du canal de perméabilité de transition (pore PT). Contrairement au modèle précédent où certaines protéines pro-apoptotiques constituent elles-mêmes le canal, ce modèle implique la présence de protéines formant un large pore de conductance. Il semblerait que la présence de protéines des membranes mitochondriales internes (comme le translocateur de nucléotide adénine ou ANT) et externes (comme la porine ou « Voltage-Dependent Anion Channel »; VDAC) (Bernardi, 1994; Petit, 1996) soient nécessaires. La perte du potentiel mitochondrial interne ($\Delta\Psi_m$) (Petit, 1996) indiquerait la présence d'un canal de conductance ionique, supportant l'hypothèse du pore PT et celle de la relâche de facteurs apoptotiques de la mitochondrie. Le $\Delta\Psi_m$ et le pore PT auraient donc un rôle central dans la régulation de l'apoptose. En effet, le maintien de $\Delta\Psi_m$ et l'inhibition de l'ouverture du pore PT bloquent l'apoptose (Zamzami, 1996). Cependant, la composition exacte du pore mitochondrial par lequel s'échappent les facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome c, APAF-1, Smac/Diablo ou AIF, est encore à ce jour inconnue.

4.1.2.2 Noyau

Le noyau cellulaire est le deuxième site intrinsèque de régulation de l'apoptose. Plusieurs facteurs et stimuli apoptotiques permettent d'enclencher la mort de la cellule et son élimination. Des mutations de l'ADN des organismes multicellulaires au niveau des gènes régulant la prolifération ou la survie causeraient un cancer. La réparation des dommages à l'ADN devient une option afin de conserver la cellule mais l'élimination est aussi une solution. Le noyau de la cellule enclenche alors une série d'événements qui mèneront, éventuellement, à l'élimination de celle-ci par apoptose.

L'induction de l'apoptose par le noyau s'effectue via les produits de traduction des gènes de suppression tumorale. La protéine la plus connue est p53 et agit en tant que facteur de transcription et est constitutivement inhibée et maintenue à de bas niveaux d'expression par des interactions avec Mdm-2. Celle-ci est phosphorylée lors de

dommages à l'ADN entraînant la fin des interactions avec p53. La protéine p53 est alors stabilisée et active. Ce facteur de transcription engendre la transcription et l'expression de plusieurs gènes, dont ceux des récepteurs de mort Fas (Owen-Schaub, 1995; Müller, 1997; Bennett, 1998) et de la protéine pro-apoptotique Bax (Zhan, 1994; McCurrach, 1997; Wolter, 1997; Yin, 1997). La protéine p53 provoque également l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ ou G₂ par des interactions avec l'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDK) p21 et avec le complexe de la cycline E et de CDK2 (Hansen, 1997). Suite à cet arrêt, l'apoptose est enclenchée par des phénomènes impliquant les caspases via la mitochondrie.

4.2 Phosphatidylinositol 3-kinase et Akt

4.2.1 Phosphatidylinositol 3-kinase

Les phospholipides sont des molécules messagères fondamentales dans la transduction du signal au niveau de cellules mammifères. La PLC permet l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate en IP₃ (augmentant le niveau de Ca²⁺ intracellulaire) et en DAG (activant la PKC). De façon similaire, une seconde voie, impliquant les phospholipides, nécessite la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Cette enzyme permet la phosphorylation en position 3'-hydroxyl des inositols phospholipides, générant ainsi des phosphatidylinositol-3-phosphates, des phosphatidylinositol-3,4-biphosphates et des phosphatidylinositol-2,4,5-triphosphates. Ces lipides lient ensuite le domaine homologue à la pleckstrine (PH) de certaines protéines pour en contrôler l'activité et la localisation cellulaire (Cantrell, 2001).

Trois classes de PI3K ont été identifiées à ce jour. La classe I est composée d'une sous-unité catalytique p110 (~ 110 kDa) ainsi que d'une sous-unité adaptatrice régulatrice p85. La deuxième classe de PI3K possède une large sous-unité catalytique (170-210 kDa) homologue à 45-50 % à la classe I de PI3K. La classe II de PI3K détient également une

région carboxy-terminale homologue aux domaines C2 médiant la liaison calcium-lipide des PKC. Finalement, la classe III des PI3K a été identifiée par la caractérisation du produit de traduction protéique du gène de levure *VPS34* et semble être impliquée dans la régulation du transport vésiculaire.

La classe I de PI3K est subdivisée en deux sous-classes. La classe I_A est composée de sous-unités catalytiques p110 et régulatrices p85. La sous-unité catalytique p110 possède trois isoformes (p110 α , p110 β et p110 δ) encodées par trois différents gènes. La sous-unité régulatrice possède quant à elle au moins sept formes possibles générées par l'expression et l'épissage alternatif de trois différents gènes (p85 α , p85 β et p55 γ). Le tissu de mammifère montre principalement l'expression des sous-unités p110 α et p110 β , l'isoforme p110 δ est quant à elle restreinte essentiellement aux leucocytes. La vaste majorité des récepteurs à activité tyrosine kinase activent la classe I_A de PI3K (Stephens, 1993; Fry, 1994; Wymann, 1998). Le mécanisme fonctionnel de la PI3K a été élucidé dans des fibroblastes au niveau des récepteurs tyrosine kinase, ceux-ci recrutant la p110 via l'adaptateur p85. Cette dernière via ses domaines d'homologie à Src (SH2) interagit avec les mêmes domaines des récepteurs tyrosine kinase. La signalisation intracellulaire est régulée par la capacité de p85 à acheminer p110 à la membrane plasmique. En effet, Reif et coll. (Reif, 1996) ont démontré que l'acheminement constitutif de la p110 à la membrane activait continuellement l'enzyme.

Il a été démontré que la PI3K peut également être stimulée par les récepteurs couplés aux protéines G. En effet, Stephens et coll. (Stephens, 1994) ont montré que la sous-unité catalytique p110 γ est activée par la protéine G hétérotrimérique. Appartenant à la deuxième sous-classe de PI3K, la classe I_B, la p110 γ possède une sous-unité régulatrice de 101 kDa (p101). L'hétérocomplexe p110 γ /p101 est activé par les sous-unités G $\beta\gamma$ de la protéine G, p101 étant essentielle pour cette réponse à G $\beta\gamma$ (Krugmann, 1999). Plusieurs groupes ont même démontré que la sous-unité G α pouvait stimuler la PI3K constituée de

p110 γ et de p101 (Stoyanov, 1995; Murga, 1998). La classe I_B de PI3K semble n'être présente que chez les mammifères et sa distribution est limitée, essentiellement abondante au niveau des cellules immunitaires sanguines. Cette distribution expliquerait que la stimulation des récepteurs couplés aux protéines G n'engendre pas toujours une activité PI3K dans tous les types cellulaires.

La classe I de PI3K est principalement retrouvée au niveau du cytosol dans des cellules à l'état basal. Lorsque ces cellules sont stimulées, la PI3K est recrutée à la membrane plasmique au niveau des récepteurs via des interactions protéiques par des adaptateurs. La stimulation de la PI3K entraîne la génération de phosphoinositides sous trois formes majeures (Toker, 2000): le phosphoinositol-3-phosphate (PtdIns-3-P), le phosphoinositol-3,4-biphosphate (PtdIns-3,4-P₂) et le phosphoinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns-3,4,5-P₃). La PI3K elle-même permet la conversion du PtdIns-3,4-P₂ en PtdIns-3,4,5-P₃. La génération de ce PtdIns active subséquemment la protéine Akt, une sérine/thréonine kinase (Datta, 1996). Cette protéine sera décrite dans la section suivante (section 2.2.2). La PI3K interagit également avec la protéine phosphoinositide-dépendent kinase-1 (PDK-1), une autre sérine/thréonine kinase. Cette dernière a pour rôle de phosphoryler Akt pour son activation (section 2.2.2).

La classe II quant à elle est constituée de trois isoformes (PI3K-C2 α , β et γ) situées sur trois gènes différents. La PI3K de classe II est généralement constitutivement associée aux structures membranaires de la cellule (Fry, 2001). Les adaptateurs protéiques liés à cette PI3K, leur mécanisme d'activation et leur rôle exact sont indéterminés. Cette classe de PI3K serait impliquée dans la signalisation par les intégrines et par certains facteurs de croissance et chémokines (Brown, 2001b) pour ainsi lier les phospholipides membranaires et médier des interactions protéine-protéine (Djordjevic, 2002).

La classe III, comme mentionné précédemment, a été identifiée par la caractérisation du produit de traduction protéique du gène de levure *VPS34*. Son

homologue humain est la PIK3R4. Peu caractérisée, elle semble être impliquée dans la régulation du transport vésiculaire comme la fusion endosomale (Wurmser, 1999), le transport nucléaire (Roggo, 2002) ou le transport au niveau du Golgi (Burda, 2002). Cette classe est retrouvée sur les structures membranaires cellulaires (Wurmser, 1999).

Deux principaux inhibiteurs de la PI3K existent, la wortmannin et le 2-(4-morpholinyl)-8-phényl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). La wortmannin provient d'un métabolite fongique et, par un lien covalent, inhibe la PI3K via un réarrangement conformationnel du site actif de l'enzyme. Cet inhibiteur possède une affinité pour la PI3K de l'ordre de 20 à 50 nM (IC_{50}). Le LY294002 quant à lui est synthétisé chimiquement et ne possède pas une structure similaire à la wortmannin. Le blocage de la PI3K s'effectue sans liaison covalente au site actif mais plutôt par une inhibition compétitive du site de liaison de l'ATP (Vlahos, 1994). De plus, le LY294002 possède une affinité de l'ordre de 1 à 20 μ M. Il est donc moins sélectif en contraste avec la wortmannin. Le LY294002 est cependant plus stable en solution aqueuse et interagit peu avec les protéines du sérum de façon *in vivo* en comparaison avec la wortmannin (Vanhaesebroeck, 2001). Malgré ces différences, les deux agents pharmacologiques sont couramment utilisés afin d'inhiber la PI3K.

4.2.2 Akt

Akt (aussi appelée protéine kinase B ou PKB) est une protéine serine/thréonine kinase d'environ 57 kDa. Trois différents gènes pour Akt ont été observés et ceux-ci mènent à la formation de trois différentes isoformes de l'enzyme (Akt1/PKB α , Akt2/PKB β et Akt3/PKB γ). Ces isoformes possèdent une forte homologie de structure primaire (80-83 %) (Vanhaesebroeck, 2000). L'homologie de séquence en acides aminés est d'environ 95 % entre l'humain et la souris et 60 % entre l'humain et *C. elegans*. Akt est donc une protéine conservée durant l'évolution. Akt possède un domaine PH en position aminoterminal qui détient une plus grande affinité pour les lipides PtdIns-3,4-P₂ ou PtdIns-3,4,5-

P₃ (James, 1996), un domaine kinase central et un domaine régulateur en position carboxy-terminale (Vanhaesebroeck, 1999). Akt est une protéine cytosolique lorsque inactive. Cependant, lorsque activée via la liaison de phospholipides au domaine PH, elle transloque à la membrane plasmique (Franke, 1997; Vanhaesebroeck, 2000). Cet acheminement à la membrane favorise l'interaction avec PDK1. Cette dernière permettra la phosphorylation des résidus Thr³⁰⁸ de la boucle d'activation et Ser⁴⁷³ du motif carboxy-terminal hydrophobique d'Akt. Cette phosphorylation est nécessaire à l'activité catalytique d'Akt.

Une des fonctions (figure 4.3) majeures d'Akt est de jouer un rôle de facteur de survie cellulaire. En effet, cette protéine kinase a été démontrée comme possédant des propriétés anti-apoptotiques. Son activité comme kinase engendre la phosphorylation de protéines pro-apoptotiques comme Bad (Datta, 1997; Datta, 1999; Kuwahara, 2000) ou la caspase-9 (Cardone, 1998).

Bad est un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 formant des hétérodimères avec les membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, empêchant ceux-ci d'exercer leurs rôles anti-apoptotiques. Lorsque Bad est phosphorylé sur ses résidus Ser¹¹² et Ser¹³⁶, l'apoptose est inhibée et les interactions entre celle-ci et Bcl-2 ou Bcl-xL sont stoppées. La phosphorylation de la caspase-9 inhibe les phénomènes apoptotiques. Le mécanisme ou le site de phosphorylation n'est cependant pas encore élucidé. D'autres cibles comme les facteurs de transcription pro-apoptotique de type Forkhead (FKHR, FKHL1 et AFX) sont aussi inhibés par leur phosphorylation (Brunet, 1999). Ils sont ainsi maintenus dans le cytosol et ne peuvent participer à la transcription de gènes pro-apoptotiques.

Akt est également impliquée dans la signalisation à l'insuline et à l'insulin growth factor (IGF). Lorsque stimulés, les récepteurs à l'insuline ou IGF entraînent l'activation d'Akt. Cette dernière phosphoryle la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) (figure 2.3) pour l'inactiver et permettre le stockage de glucose (Cross, 1995). De plus, Akt active la 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) par sa phosphorylation, augmentant ainsi la glycolyse (Deprez, 1997). Akt peut phosphoryler les protéines CREB (protéine liant l'élément de

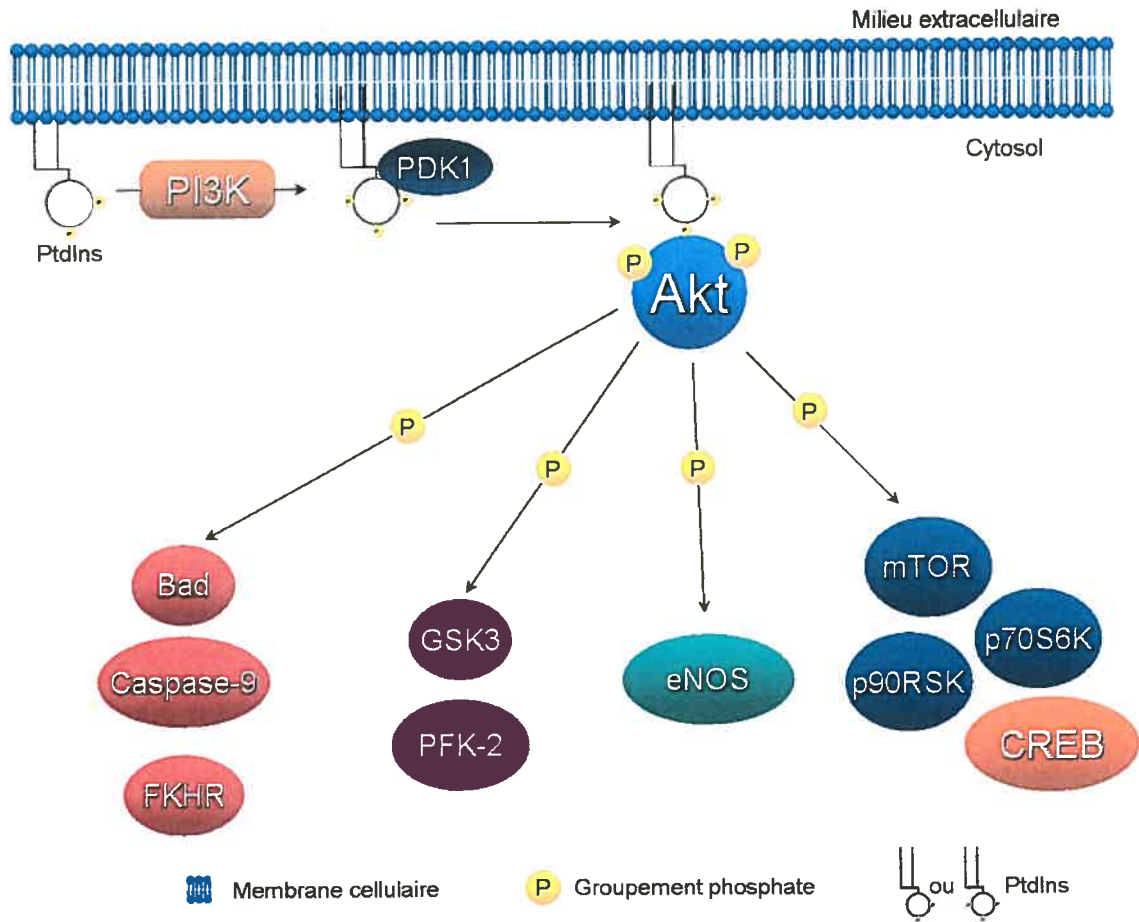


Figure 4.3 Différentes voies de signalisation impliquant la PI3K et Akt. Cette dernière phosphoryle divers substrats intracellulaires ayant une vaste gamme de cibles.

réponse à l'AMPC; section 4.4) (Du, 1998), p70 S6 kinase (p70S6K), mammalian target of rapamycin (mTOR) et p90 ribosomal ribosomal S6 kinase (p90RSK), altérant ainsi la transcription génique et la synthèse protéique (Toker, 2000). De plus, la phosphorylation de eNOS (endothelial nitric oxide synthase) résulte en son activation et augmente la génération de NO (Fulton, 1999).

4.3 Protéine de choc thermique (Heat Shock Proteins)

Les cellules détiennent la capacité de se défendre en activant un programme génétique et protéique suite à un stress. Ces stress, incluant les toxines bactériennes, l'hypoxie, les cytokines pro-inflammatoires, l'exposition à des drogues cytotoxiques, les infections bactériennes ou même le stress oxydatif, peuvent déstabiliser l'architecture et l'homéostasie cellulaire. En réponse à ces stress, la cellule déclenche un processus adaptatif impliquant les protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins ou Hsp). Celles-ci sont des protéines ubiquitaires permettant à la cellule de contrer au stress et de se protéger. Les Hsp sont par ailleurs impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires comme l'assemblage, le repliement, la translocation d'autres protéines dans la cellule ainsi qu'à sa cytoprotection en agissant à titre de chaperone (Lindquist, 1988; De Maio, 1999; Feder, 1999; Santoro, 2000; Latchman, 2001; Li, 2002).

Plusieurs Hsp ont été décrites à ce jour et sont classifiées selon leur poids moléculaire : 1) Ubiquitine, 2) Hsp10, 3) Petites Hsp, 4) Hsp40, 5) Hsp60, 6) Hsp70, 7) Hsp90 et 8) Hsp110.

4.3.1 Famille Ubiquitine

Les Ubiquitines constituent la famille détenant le plus faible poids moléculaire (76 acides aminés et environ 8 kDa). Leur expression est constitutive au niveau du cytoplasme et du noyau cellulaire. Elles auraient un rôle à jouer dans la dégradation des protéines anormales en les acheminant vers la dégradation (Bond, 1985).

4.3.2 Famille Hsp10

La protéine Hsp10 constitue également une Hsp de faible poids moléculaire exprimée de façon constitutive. Elle est retrouvée dans la mitochondrie (Hartman, 1992) et, conjointement à Hsp60, serait impliquée dans la maintenance de ses fonctions (Lau, 1997;

Lin, 2001). Par ailleurs, lorsque retrouvée au niveau du cytosol, elle pourrait également engendrer une cytoprotection (Kirchhoff, 2002).

4.3.3 Famille des petites Hsp

La famille des petites Hsp quant à elle contient les protéines α A-crystalline, α B-crystalline, Hsp27 et Hsp32. L' α A-crystalline et la α B-crystalline se retrouvent de façon constitutive au niveau du cytoplasme et en périphérie du noyau. Elles agissent en tant que chaperone protéique (Takemoto, 1993; Caspers, 1995). Hsp27 quant à elle se retrouve aussi de façon constitutive dans le cytoplasme et en en périphérie du noyau et peut également y transloquer lors d'un stress afin d'y stabiliser certaines protéines (chaperone protéique). Par ailleurs, Hsp27 possède plusieurs résidus sérines pouvant être phosphorylés, les Ser¹⁵, Ser⁷⁸ et Ser⁸² (Concannon, 2003). La phosphorylation précède l'augmentation de son contenu protéique. Évidemment, cette augmentation d'expression protège la cellule (cytoprotection). Le dernier membre de cette famille de Hsp, Hsp32 (ou Heme Oxygénase-1), est présente dans le cytoplasme et est induite lors de l'hypoxie (Ewing, 1991). Elle provoque le clivage de l'hème afin de générer la biliverdine, une molécule anti-oxydante protectrice.

4.3.4 Famille Hsp40

Les protéines Hsp40 et Hsp47 sont membres de la famille Hsp40. Leur expression est constitutive mais leur localisation et rôle sont différents. Hsp40 se retrouve principalement au niveau du cytoplasme et peu au noyau (Hattori, 1992). Lors d'un stress, cette protéine transloque au noyau pour y assurer le bon repliement des protéines conjointement avec Hsp70 et Hsc70 (Hattori, 1992). Hsp47, quant à elle (Hosokawa, 1993), se retrouve principalement dans le réticulum endoplasmique. Elle y lie le collagène et en permet son bon transport du réticulum endoplasmique cellulaire à l'appareil de Golgi (Nakai, 1992).

4.3.5 Famille Hsp60

La famille Hsp60 englobe les protéines Grp58, TRiC et Hsp60. Grp58 se retrouve constitutivement dans le réticulum endoplasmique et aurait un rôle à jouer dans les phénomènes de réduction enzymatique (Murthy, 1994; Hirano, 1995). En ce qui a trait à TRiC (ou TCP1), elle se retrouve au niveau du cytosol (Hendrick, 1993; Becker, 1994) et est impliquée dans le bon repliement d'autres protéines (chaperone protéique). Hsp60 quant à elle est présente constitutivement dans la mitochondrie. Comme mentionnée précédemment, elle assure, de concert avec Hsp10, le bon fonctionnement de la relâche d'ATP et de substrats au niveau de la mitochondrie. Par ailleurs, elle permet également l'importation de protéines vers l'intérieur de l'organelle conjointement avec Hsp70.

4.3.6 Famille Hsp70

La famille Hsp70 est l'une des mieux caractérisées à ce jour. Elle englobe les protéines Hsc70, Hsp70, Hsp75, Grp78 et mortaline. Hsc70 (Sorger, 1987a) est exprimée de façon constitutive dans la cellule tant au niveau du cytosol que du noyau mais aussi dans le peroxisome et le lysosome (Agarraberes, 1997). Lors d'un stress, il a été observé qu'elle pouvait transloquer au noyau afin d'être impliquée dans la synthèse et la dégradation protéique en agissant comme chaperone. Similairement, Hsp70 a pour rôle de guider le repliement des protéines nouvellement synthétisées (Beckmann, 1990; Hartl, 1992) et de diriger les protéines repliées de façon inadéquate vers le peroxisome (Walton, 1994) ou le lysosome (Agarraberes, 1997). Elle assure également l'acheminement de protéines au travers des membranes mitochondriales et du réticulum endoplasmique (Craig, 1990; Kang, 1990; Horst, 1996). Cette Hsp est normalement absente du cytosol et du noyau cellulaire mais est cependant hautement inductible en présence d'un agent stressant. Elle transloque ensuite du cytosol vers le noyau cellulaire pour y jouer son rôle de chaperone (Welch, 1984). Hsp75 quant à elle incarne une chaperone protéique retrouvée constitutivement au niveau de la mitochondrie (Bhattacharyya, 1995). Elle guide le repliement adéquat des

protéines s'y insérant et aide à conserver leurs structures secondaire, tertiaire et quaternaire dans un état fonctionnel (Herrmann, 1994). Grp78 est résidente constitutive du réticulum endoplasmique (Zala, 1980) agissant en tant que chaperone protéique. Elle permet le repliement des protéines ainsi que leur translocation adéquate (Haas, 1994). La mortaline quant à elle se retrouve au niveau du cytoplasme et de la membrane péri-nucléaire (Kaul, 1993; Wadhwa, 1993). Le rôle exact de cette protéine est encore mal défini mais elle pourrait être impliquée dans la sénescence cellulaire ou dans le cancer (attribuant aux cellules un phénotype d'immortalité (Kaul, 2002)).

4.3.7 Famille Hsp90

Hsp90- α , Hsp90- β et Grp94 font partie de la famille Hsp90. Grp94 est inductible, lie le calcium et réside dans le réticulum endoplasmique (Sorger, 1987b). Par ailleurs, elle serait impliquée dans la croissance cellulaire et dans le repliement et l'assemblage des immunoglobulines (Lin, 1993; Vitadello, 1998). Hsp90- α et β (Welch, 1982) sont constitutivement maintenues dans le cytosol et à la membrane péri-nucléaire. Elles composent la catégorie de Hsp la plus abondante au niveau du cytosol et lient spécifiquement les récepteurs aux stéroïdes, les microtubules et les filaments d'actine (Koyasu, 1986). Hsp90 est essentielle au fonctionnement adéquat des récepteurs hormonaux (stéroïdes) intracellulaires. Suivant un stress, Hsp90 peut être phosphorylée, son expression augmentée (Lees-Miller, 1989) et serait transloquée au noyau (Collier, 1986; Edington, 1989). À ce niveau, elles stabilisent la conformation des protéines nucléaires, agissant ainsi comme chaperone (Jacob, 1995) afin de contrer l'effet délétère du stress. De plus, via des interactions avec l'actine du cytosol, Hsp90 aurait pour rôle de permettre le transit des récepteurs hormonaux vers le noyau (Pratt, 1993).

4.3.8 Famille Hsp110

La famille Hsp110 détient les protéines Hsp de poids moléculaires élevés comme Hsp104, Hsp110 et Grp170. L'expression de Hsp104 (ou Hsp105) est constitutive au

niveau du cytoplasme cellulaire. Elle aurait pour rôle de conférer à la cellule une résistance à la chaleur (Hatayama, 1994). L'expression Grp170 est également constitutive mais celle-ci ne se retrouve qu'au niveau du réticulum endoplasmique et est impliquée dans le repliement ainsi que l'assemblage des immunoglobulines conjointement avec Grp78 et Grp94 (Lin, 1993; Chen, 1996). Hsp110 est quant à elle constitutivement exprimée dans le cytoplasme de la cellule et transloque au noyau lors d'un stress afin d'y exercer un rôle de chaperone protéique (Oh, 1997).

4.4 Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB)

La protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB ou cAMP-Response Element Binding Protein) est un facteur de transcription d'environ 43 kDa répondant à l'augmentation d'AMPc à l'intérieur de la cellule. Sa concentration nucléaire a été estimée à environ 100 nM (Hagiwara, 1993). Des récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha s}$, comme les récepteurs A_{2A} de l'adénosine, possèdent le potentiel d'activation de CREB. Lors de sa stimulation, la phosphorylation et la dimérisation de la protéine entraînent le déclenchement de la transcription génique. Plusieurs isoformes de CREB existent, les mieux caractérisés étant CREB α , CREB Δ et CREB β . Elles sont exprimées de façon ubiquitaire. D'autres isoformes existent et semblent être présentes principalement au niveau des testicules (Waeber, 1991; Ruppert, 1992; Waeber, 1992; Cao, 2002; Huang, 2004) et du thymus (Yang, 1997) mais en plus faibles quantités. Le rôle et la structure de ces isoformes sont mal définis mais elles seraient probablement impliquées dans la spermatogénèse et le développement des cellules T.

4.4.1 Structure de CREB

La structure des isoformes CREB a été élucidée (figure 4.4). Elles possèdent (de l'extrémité amino- vers carboxy-terminale) un domaine Q1, un domaine α (seulement chez

CREB α), un domaine de transactivation comprenant le domaine inductible par une kinase (KID) ainsi que le domaine Q2 et un domaine en zipper de leucine basique (bZIP).

Le domaine Q1 est riche en glutamine et est impliqué dans l'activation transcriptionnelle (Gonzalez, 1991) en interagissant avec CBP (CREB-Binding Protein). Le domaine de transactivation contient les domaines KID et Q2. Le premier est composé d'une région d'environ 60 acides aminés et présente le résidu Ser¹³³ pouvant être phosphorylé lors de la génération d'AMPc. Ce résidu est hautement conservé dans tous les membres de la famille CREB ainsi que chez CREM (section 2.4.4.1) et ATF-1 (section 2.4.4.2).

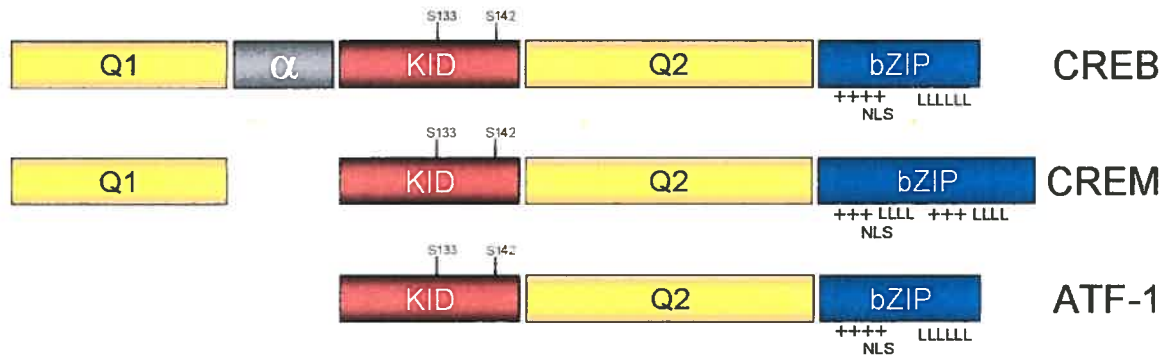


Figure 4.4 Schéma de la structure de CREB, CREM et ATF-1 (Q1, domaine Q1; α , le domaine α ; KID, le domaine inductible par une kinase; Q2, le domaine Q2; L, résidus Leucine; bZIP, le domaine en zipper de leucine basique; +, les résidus chargés positivement; NLS, le domaine de localisation au noyau; S133 et S142, les résidus sérine¹³³ et sérine¹⁴² respectivement) (Adapté de Montminy (1997), Shaywitz (1999) et Mayr (2001)).

La phosphorylation de CREB provoque son activation. Le domaine KID confère deux principales fonctions au facteur de transcription. D'une part, il engendre la reconnaissance de CREB (ainsi que sa phosphorylation) par la PKA. En effet, la mutation au niveau de ce domaine de certains résidus en amont (Arg¹³⁰ et Arg¹³¹) ou en aval (Tyr¹³⁴) de la Ser¹³³ entraîne une perte de la reconnaissance de la PKA pour CREB. De plus, la délétion de la série d'acides aminés Asp¹⁴⁰-Leu¹⁴¹-Ser¹⁴²-Ser¹⁴³-Asp¹⁴⁴ bloque cette même

reconnaissance (Gonzalez, 1991), démontrant l'importance des acides aminés de part et d'autre du résidu Ser¹³³ pour la reconnaissance de CREB par la kinase PKA. D'autre part, le domaine KID permet l'association de CREB avec la machinerie transcriptionnelle, de concert et en synergie avec le domaine Q2 afin d'augmenter la transcription génique (Brindle, 1993; Quinn, 1993). Le domaine Q2 quant à lui est riche en glutamines (de façon similaire au domaine Q1) et coopère avec le domaine KID lors de la stimulation de la transcription génique (Ferreri, 1994). Le domaine Q2 interagit avec le facteur TFIID lors de l'assemblage du complexe transcriptionnel incluant l'ARN polymérase II (Ferreri, 1994). La délétion du domaine Q2 provoque par ailleurs une perte de transactivation de CREB et de transcription génique (Brindle, 1993). Le domaine bZIP quant à lui est positivement chargé par des résidus lysine et arginine. Ces acides aminés sont les médiateurs de l'interaction et de la liaison à l'ADN (Dwarki, 1990). De plus, ce domaine détient une séquence de localisation au noyau (NLS) permettant à CREB de transloquer au noyau. Il est également important de noter que la dimérisation de ce facteur de transcription s'effectue via ce domaine en formant une structure en zipper de leucine. Cette structure est retrouvée au niveau d'autres facteurs de transcription dimérisant lors de la liaison à l'ADN (comme c-jun, c-fos, c-myc ou encore l'homologue chez la levure GCN4).

4.4.2 Activation de CREB

Trois phases caractérisent l'induction de la transcription génique par CREB : 1) la phase de salve, 2) la phase d'atténuation et 3) la phase réfractaire.

4.4.2.1 Phase de salve (« Burst phase »)

L'activation de CREB s'effectue lors de l'accumulation d'AMPc à l'intérieur de la cellule. Cette accumulation entraîne la dissociation des sous-unités catalytiques et des sous-unités régulatrices de la PKA. Les sous-unités catalytiques diffuseraient alors passivement jusqu'au noyau pour y transloquer. Ces dernières iront ensuite phosphoryler le résidu Ser¹³³ de CREB (Gonzalez, 1989) afin de l'activer. Cette phosphorylation a lieu

environ 15 à 20 minutes après l'initiation de la génération d'AMPc (Hagiwara, 1993). Suite à cette phosphorylation, CREB déclenche la transcription génique via sa liaison à l'ADN et l'assemblage du complexe transcriptionnel.

4.4.2.2 Phase d'atténuation

Malgré la présence continue d'un agoniste engendrant la génération d'AMPc, le degré de phosphorylation de CREB et la transcription génique s'atténuent graduellement sur une période de quatre à six heures (Hagiwara, 1992). Cette atténuation via la déphosphorylation de CREB serait effectuée par la protéine phosphatase-1 (PP-1) (Hagiwara, 1992). PP-1 déphosphoryle le résidu Ser¹³³ de CREB, entraînant sa désactivation. L'inhibition de PP-1 par l'acide okadaïque (inhibiteur de phosphatase) bloque cette déphosphorylation et prévient l'atténuation de transcription génique (Hagiwara, 1992), démontrant l'implication de la phosphatase dans la phase d'atténuation.

4.4.2.3 Phase réfractaire

Lorsque l'exposition à l'AMPc est prolongée (plus de six à huit heures), les cellules ne répondent plus à la stimulation. Cette période, appelée phase réfractaire, fait en sorte que malgré la présence d'AMPc, la phosphorylation et l'activation de la transcription génique subséquente n'ont pas lieu (Armstrong, 1995). Étant le médiateur du phénomène d'atténuation, PP-1 a été suspectée de jouer un rôle dans cette phase. L'inhibition de PP-1 n'entraîne pas de changement dans la phosphorylation de CREB au niveau de la phase réfractaire, excluant ainsi son implication (Armstrong, 1995). La régulation négative de la sous-unité catalytique de PKA semble plutôt expliquer cette phase. En effet, Armstrong et coll. (Armstrong, 1995) ont observé une diminution de cinq à six fois de son contenu intracellulaire. Par ailleurs, la surexpression ou la microinjection nucléaire de la sous-unité catalytique de PKA renverse ce phénomène d'atténuation. Ces observations démontrent que la sous-unité catalytique de PKA est le principal médiateur de la phase réfractaire et ce, étant donné la régulation négative suite à une stimulation prolongée.

4.4.3 Transcription génique

Il existe une corrélation directe entre la stochiométrie de phosphorylation de CREB et son niveau d'activation de transcription génique (Hagiwara, 1993). La capacité d'augmenter la transcription génique lors de l'augmentation de l'AMPc intracellulaire s'effectue via la liaison à l'élément de réponse à l'AMPc, le CRE (cAMP Response Element). Cet élément consiste en un palindrome de huit paires de nucléotides avec une séquence TGACGTCA se retrouvant généralement de façon proximale à une boîte TATA (<100 paires de bases) (Comb, 1986; Montminy, 1986). Par ailleurs, si le promoteur est en position distale (>500 paires de bases) par rapport à l'élément de réponse, la transcription génique est beaucoup moins efficace. Ces caractéristiques permettent d'agir en coopération et d'augmenter la réponse à la stimulation par l'AMPc (Jameson, 1986; Delegeane, 1987). Le CRE peut aussi être séparé en un ou deux motifs incomplets CGTCA sur le même ou sur différents brins d'ADN. Cette séparation rend l'élément moins actif qu'avec le palindrome complet (Fink, 1988; Yamamoto, 1988). L'efficacité de liaison de CREB à son élément est très élevée, possédant un K_d d'environ 1 nM pour le palindrome complet et de 5 nM pour un motif incomplet. En contraste, la concentration nucléaire de CREB est d'environ 100 nM (Hagiwara, 1993). Ceci suggère qu'avec une telle concentration de la protéine, peu importe si le palindrome est complet ou non, l'efficacité de liaison est malgré tout très élevée.

La liaison à l'ADN d'un monomère de CREB activée se produit initialement et s'en suit une dimérisation du facteur de transcription. Similairement à d'autres facteurs, le domaine bZIP de chacun des monomères permet la constitution d'une hélice continue. Des ponts hydrogènes et salins se forment et renforcent la structure en dimère (Schumacher, 2000). Les résidus Asn²⁹³, Arg³⁰¹ et Lys³⁰⁵ sont essentiels à la reconnaissance du CRE. De plus, un ion magnésium interagit avec la Lys³⁰⁵ et stabilise sélectivement le complexe ADN-CREB.

Suite à cette liaison, CREB interagit avec la machinerie transcriptionnelle, en particulier TFIID. Celui-ci est constitué de TBP (TATA-binding protein), la protéine liant la boîte TATA, et de TAF (TBP-activating factor), une protéine activant TBP. CREB, via son domaine Q2 interagit spécialement avec TAF (Ferreri, 1994). La délétion du domaine Q2 prévient cette liaison ainsi que la transcription génique. Par ailleurs, le résidu Ser¹³³ phosphorylé du domaine KID avec l'aide du domaine Q1 provoquent concurremment le recrutement des protéines CBP et p300 au promoteur du gène. CBP engendre par la suite l'assemblage du complexe d'ARN polymérase II ainsi que l'acétylation des histones. La transcription du gène débute par la suite.

4.4.4 Protéines similaires à CREB

4.4.4.1 *CREM*

CREM (cAMP Response Element Modulator) est une protéine (figure 4.4) dont le gène possède des séquences identiques à celui de CREB. Trois isoformes (α , β et γ) existent et inhibent la transcription génique par CREB (Foulkes, 1991). L'épissage alternatif donne aussi naissance à une isoforme (CREM τ) qui, similairement à CREB, active la transcription suite à une augmentation de l'AMPc (Delmas, 1992; Molina, 1993). L'expression de CREM n'est pas ubiquitaire mais se retrouve principalement au niveau des testicules et du cerveau (Foulkes, 1992; Laoide, 1993). CREM possède également une structure avec un domaine bZIP lui donnant des caractéristiques similaires à CREB en ce qui a trait à la liaison à l'ADN.

4.4.4.2 *ATF-1*

ATF-1 (Activating transcription factor 1) est aussi une protéine possédant une très haute homologie génique avec CREB et sa structure primaire y est homologue à plus de 60 % (Hai, 1989) (figure 4.4). Son ARNm est retrouvé dans plusieurs lignées cellulaires

provenant d'une variété de tissus (Rehfuss, 1991). Cette protéine possède également une structure comprenant un domaine bZIP permettant la dimérisation et la liaison à l'ADN. CREB et ATF-1 sont identiques à 91 % à ce niveau (Hai, 1989; Rehfuss, 1991). ATF-1 est donc un facteur de transcription répondant à l'augmentation de l'AMPc, similairement à CREB.

Chapitre 5

Protection pharmacologique

Ce chapitre porte sur la protection pharmacologique du myocarde et du cerveau. Le tissu cardiaque peut être protégé par différents procédés et différentes molécules dans le cadre de l'infarctus du myocarde. Par ailleurs, le cerveau peut également être protégé pharmacologiquement au niveau de la dépression post-infarctus du myocarde. Ces processus sont décrits dans cette section.

5.1 Protection pharmacologique cardiaque

« I believe that we now stand at the threshold of a new era in the treatment of acute myocardial infarction. Although an enormous amount remains to be learned about the salvage of ischemic cardiac muscle, it is now fair to accept the position that just because myocardial tissue lies within the distribution of a recently occluded coronary artery does not mean that it is necessarily condemned to death »

Eugene Braunwald (Braunwald, 1974)

La cardioprotection consiste en une réduction de la taille de l'infarctus par application d'une intervention résultant en un volume plus petit d'infarctus du myocarde que si cette intervention n'avait pas été utilisée (Hearse, 1984). L'intervention en elle-même peut être mécanique (brèves ischémie-reperfusion volontaires) ou pharmacologique (administration d'un composé).

5.1.1 Processus cardioprotectifs

5.1.1.1 *Préconditionnement*

Le preconditionnement ischémique se définit par une diminution de la taille de l'infarctus lorsque l'ischémie principale est précédée d'un ou de plusieurs brefs épisodes

d'ischémie transitoire (figure 5.1). Le préconditionnement a été décrit pour la première fois par Murry et coll. (Murry, 1986) dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion. Ce groupe a observé que quatre épisodes d'ischémie de cinq minutes séparés par cinq minutes de reperfusion *préalablement* à une ischémie soutenue de 40 minutes entraînaient une diminution de la taille des dommages au myocarde de chien, la taille de l'infarctus passant de 30 % à 7 %. Par ailleurs, ils ont observé un retard dans le manque d'ATP, une consommation en oxygène réduite et une préservation des structures intracellulaires. Ce protocole expérimental n'engendrant pas d'amélioration du débit collatéral, la protection a donc été attribuée à la tolérance du myocarde à supporter l'ischémie soutenue suivant les brèves occlusions.



Figure 5.1 Représentation schématique du préconditionnement. La période d'ischémie soutenue est précédée d'un ou plusieurs brefs cycles d'ischémie (I) et de reperfusion (R).

Il a été déterminé par la suite que ce préconditionnement ischémique pouvait être induit par de brèves périodes d'ischémie de trois à cinq minutes suivies de cinq minutes de reperfusion (Kuzuya, 1993) ou même un seul épisode d'ischémie transitoire (Miura, 1991; Jennings, 2001). Ce type de protection du tissu cardiaque a aussi été observé chez d'autres espèces comme le porc (Schott, 1990), le lapin (Cohen, 1991) et le rat (Li, 1992).

Le préconditionnement provoqué par ces brèves périodes d'ischémie protège le cœur de façon transitoire. Suite aux cycles d'occlusion-reperfusion, la protection s'estompe en l'espace d'une à trois heures. Au-delà de ce délai, l'occlusion coronarienne soutenue subséquente aux cycles occlusion-reperfusion entraînera la génération de dommages similaires à une occlusion sans préconditionnement (Kuzuya, 1993). Cependant, 24 à 96 heures après un préconditionnement, la protection réapparaît (Kuzuya, 1993; Marber, 1993), phénomène appelé préconditionnement tardif (revue par le Dr Bolli (Bolli, 2000)).

Le préconditionnement est accompagné d'une diminution de l'œdème tissulaire (Zhao, 2003), de l'accumulation de neutrophiles (Zhao, 2003; Kin, 2004), de la génération de radicaux libres (Zhao, 2003; Kin, 2004) ainsi que d'une préservation des fonctions endothéliales (Zhao, 2003; Kin, 2004).

Certaines isoformes de la PKC et le canal K_{ATP} ont été identifiés comme étant les deux principaux médiateurs du préconditionnement. La PKC, une sérine/thréonine kinase (au moins 12 différentes isoformes), serait déterminante dans le préconditionnement en exerçant son rôle protecteur via phosphorylation de protéines à l'intérieur de la cellule. Le canal K_{ATP} quant à lui est un canal potassique hyperpolarisant s'ouvrant lorsque les niveaux d'ATP à l'intérieur de la cellule sont bas, comme par exemple ceux atteints par de brèves ischémies de cinq minutes lors du préconditionnement. La densité du canal K_{ATP} est élevée dans le sarcolemme ainsi que dans la mitochondrie et son blocage pharmacologique avec le glibenclamide ou le 5-hydroxydécanoate entraîne une perte de l'effet cardioprotecteur induit par le préconditionnement (Auchampach, 1992; Yao, 1993). De plus, la protection induite par le phorbol-12-myristate-13-acétate, un activateur de la PKC, est abolie lors d'un traitement au 5-hydroxydécanoate dans un modèle de préconditionnement (Van Winkle, 1995). Liu et coll. (Liu, 1997) ont aussi déterminé par des expériences de « patch-clamp » que la stimulation de la PKC permettait de réduire le délai d'activation des canaux K_{ATP} durant des épisodes d'ischémie tandis que Wang et coll. (Wang, 1999) ont déterminé que l'activation des canaux K_{ATP} était dépendante de la PKC lors de l'ischémie. Ces résultats démontrent non seulement l'implication de la PKC et des canaux K_{ATP} dans le préconditionnement mais que la PKC aurait un rôle à jouer dans l'activation de ces mêmes canaux, permettant ainsi une cardioprotection

5.1.1.2 Postconditionnement

Décrit par Zhao et coll. en 2003 (Zhao, 2003), ce type de cardioprotection est obtenu suivant de brèves périodes d'ischémie et de reperfusion *après* la période d'ischémie

soutenue (figure 5.2). Ce groupe a démontré dans un modèle d'ischémie-reperfusion canin que trois brefs cycles de cinq minutes d'ischémie suivis de cinq minutes de reperfusion postérieurement à une ischémie continue de 60 minutes permettaient de réduire la taille de l'infarctus de 45 %. Il a ensuite été démontré que trois brefs cycles d'ischémie de dix secondes suivant une ischémie continue de 30 minutes réduisaient la taille de l'infarctus de 33 % chez le rat (Kin, 2004).



Figure 5.2 Représentation schématique du postconditionnement. La période d'ischémie soutenue est suivie d'un ou plusieurs brefs cycles d'ischémie (I) et de reperfusion (R).

Des résultats similaires ont été observés chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande suite à une ischémie soutenue de 30 minutes et quatre à six brefs cycles de 10 à 30 secondes d'ischémie et 10 à 30 secondes de reperfusion (Tsang, 2004; Yang, 2004; Yang, 2005a). Ce procédé protecteur a également été observé *in vitro*. En effet, Sun et coll. (Sun, 2005) ont démontré que le postconditionnement hypoxique des cardiomyocytes isolés engendrait une protection contre le stress oxydatif (génération de radicaux libres et peroxydation des lipides), la surcharge calcique ainsi que la mort cellulaire. Le postconditionnement est donc une forme de conditionnement du myocarde contre les dommages liés à l'ischémie-reperfusion *in vivo* ou *in vitro* mais ayant lieu suite à une ischémie suffisamment longue pour induire des dommages irréversibles.

Afin d'être efficace, le processus de postconditionnement doit avoir lieu rapidement lors de la reperfusion. Un retard dans la génération des brefs cycles ischémie-reperfusion entraîne une perte de l'effet protecteur de ce procédé. Yang et coll. (Yang, 2004) ont démontré qu'un délai de dix minutes entre la fin de l'ischémie létale soutenue et les brefs cycles d'ischémie-reperfusion faisait en sorte que le postconditionnement n'était plus efficace à réduire la taille de l'infarctus, cette dernière étant comparable au groupe témoin. Le groupe du Dr Vinten-Johansen (Kin, 2004) a même observé qu'un délai aussi court

qu'une minute entraînait la même perte de l'effet cardioprotecteur. Selon ces résultats, l'application du protocole de postconditionnement doit s'effectuer rapidement lors de la reperfusion afin d'être efficace à réduire la taille de l'infarctus. Il demeure cependant inconnu si cette diminution de la taille de l'infarctus est le résultat de l'inhibition des phénomènes délétères ou de l'activation de processus protecteurs lors du début de la reperfusion. D'autres études permettront de répondre à cette question.

Le postconditionnement étant une forme de cardioprotection « dérivée » du préconditionnement, plusieurs groupes se sont penchés sur l'hypothèse que la juxtaposition des deux procédés protecteurs pourrait engendrer une réduction supplémentaire des dommages. Halkos et coll. (Halkos, 2004) ont démontré dans un modèle canin d'infarctus du myocarde avec occlusion coronarienne de 60 minutes et trois heures de reperfusion que le postconditionnement utilisé concurremment au préconditionnement n'engendrait malheureusement pas de protection supplémentaire. La taille de l'infarctus est demeurée similaire entre les groupes témoin (environ 24 %), avec préconditionnement (environ 13 %), avec postconditionnement (environ 10 %) et avec simultanément le pré- et le postconditionnement (environ 12 %). Au contraire, le groupe Yang et coll. (Yang, 2004) ont quant à eux démontré un effet protecteur encore plus efficace lors de cette juxtaposition des deux procédés dans un modèle de lapin d'occlusion coronarienne de 45 minutes. Ainsi, la taille de l'infarctus est passée d'environ 62 % pour un groupe témoin à environ 35 % pour un groupe avec préconditionnement, à environ 40 % pour un autre avec postconditionnement et à environ 23 % pour un groupe avec pré- et postconditionnement. Les protocoles de pré- et postconditionnement étant similaires, la différence ne semble pas s'expliquer par ceux-ci mais résiderait plutôt dans l'espèce animale et dans les valeurs des tailles des infarctus eux-mêmes. En effet, le groupe de Halkos et coll. (Halkos, 2004) utilise un modèle canin et engendre des dommages ne représentant que 25 % de la zone à risque. En contraste, le groupe de Yang et coll. (Yang, 2004) quant à lui utilise le lapin comme modèle animal et génère un infarctus d'une taille de 60 à 65 % de la zone à risque et la réduit à environ 35 à 40 % avec le pré- et postconditionnement. La taille de l'infarctus

au niveau du groupe de Halkos et coll. (Halkos, 2004) semble être trop petite (< 20 %), une taille difficile à réduire de façon supplémentaire. Cependant, le groupe de Yang et coll. (Yang, 2004) est capable de réduire l'infarctus étant donné que celui-ci est d'une envergure suffisante (plus de 40 % de la zone à risque). Ces résultats suggèrent que la juxtaposition pourrait permettre d'engendrer une protection supplémentaire. Cependant, si l'infarctus est déjà d'une taille relativement petite, il sera impossible d'enrayer les dommages de manière additionnelle. Davantages d'études permettront de corroborer cette hypothèse.

Le postconditionnement, similairement au preconditionnement, est également accompagné d'une réduction de l'accumulation de neutrophiles (Zhao, 2003; Kin, 2004), de la génération de radicaux libres (Zhao, 2003; Kin, 2004) et d'une préservation de la fonction endothéliale (Zhao, 2003).

5.1.1.3 Interventions post-ischémiques

Le principe même des interventions post-ischémiques réside dans l'administration de molécules ou composés pharmacologiques juste avant ou lors de l'initiation de la reperfusion du myocarde (figure 5.3). Cette cardioprotection permet de protéger le tissu myocardique et de réduire les phénomènes délétères (lésions de reperfusion) ayant lieu lors de cette reperfusion.



Figure 5.3 Représentation schématique d'une intervention post-ischémique. Le composé pharmacologique est administré (↓) juste avant, au moment ou juste après l'initiation de la reperfusion.

Les interventions post-ischémiques pourraient être une sous-catégorie de postconditionnement. En effet, similairement au preconditionnement pharmacologique, l'administration de composés lors de la reperfusion pourrait être une forme dérivée du

postconditionnement « pharmacologique » (Vinten-Johansen, 2005). Il demeure cependant encore inconnu si le postconditionnement « mécanique » (par brèves occlusion-reperfusion) résulterait en une protection similaire à un postconditionnement « pharmacologique ». La différence entre ces processus résiderait en de multiples périodes de lavages des métabolites lors de la réintroduction du sang dans l'artère, phénomènes absents du postconditionnement « pharmacologique » où le tissu est reperfusé normalement de façon continue. D'autres travaux sont nécessaires afin d'établir s'il y a différence entre postconditionnement traditionnel et postconditionnement pharmacologique ou interventions post-ischémiques. Les interventions post-ischémiques seront donc considérées comme une classe à part entière des processus cardioprotectifs.

La possibilité d'observer ce type de protection est fonction de plusieurs facteurs capitaux (section 5.1.2.1). Par ailleurs, même si la protection est présente avec une courte période de reperfusion (\leq six heures), il est possible qu'elle ne persiste pas au-delà de la durée. La cardioprotection peut donc être aiguë et/ou soutenue (section 5.1.2.2).

5.1.2 Possibilité de thérapie cardioprotectrice post-ischémique

« Myocardial protection at a crossroads: The need for translation into clinical therapy »

Bolli et collaborateurs (Bolli, 2004)

5.1.2.1 Facteurs pour une cardioprotection post-ischémique

Une cardioprotection post-ischémique peut s'observer si l'on tient compte des facteurs suivants :

- Propriétés pharmacologiques de la molécule;
- Moment d'administration;

- Durée de l'administration;
- Dose utilisée.

Le premier facteur important est fonction de la molécule utilisée pour la cardioprotection : ses propriétés pharmacologiques intrinsèques. Le temps de demi-vie est une caractéristique inhérente d'une molécule et est extrêmement important à considérer afin d'observer une cardioprotection. Par exemple, une molécule rapidement éliminée de la circulation sanguine lors de la période de reperfusion représente une limitation à la génération d'une telle protection. Les modèles pharmacocinétiques suggèrent qu'il ne reste pas suffisamment de composé dans un système *in vivo* pour exercer un effet pharmacologique après quatre à cinq demi-vies. À ce moment, le composé est biotransformé et éliminé (Hardman, 1996; Katzung, 2001). La molécule doit en conséquence être présente en quantité suffisante lors de la reperfusion pour réduire efficacement la taille de l'infarctus. Le moment d'administration est aussi crucial à cette réduction des dommages. Si la molécule est administrée trop rapidement avant ou trop tard suivant le début de la reperfusion, aucune protection ne sera observée. Une « fenêtre thérapeutique » unique à chacune des molécules doit être respectée afin de générer une cardioprotection significative. Par exemple, l'administration d'AMP579, un agoniste A_1/A_{2A} , peut réduire la taille de l'infarctus seulement s'il est donné au moment de la reperfusion (Xu, 2003) (section 5.1.3.2). S'il est administré trop tard suivant l'initiation de la reperfusion (début minutes), aucune protection n'est observée.

La dose utilisée est également un facteur important. La demi-vie de la molécule étant une propriété intrinsèque de la molécule, la dose est quant à elle une propriété extrinsèque pouvant être modifiée en théorie aisément. Afin de palier à une faible demi-vie, une dose plus élevée peut être utilisée. L'administration par bolus est une solution. La présence d'effets secondaires importants avec des doses élevées par bolus peut cependant constituer une limitation à ce genre d'administration. À ce titre, une infusion plus lente en

continu peut constituer une autre issue. La durée d'administration est donc un autre facteur à surveiller. Celle-ci doit être suffisamment longue pour réduire ou inhiber les phénomènes délétères ayant lieu en début de reperfusion. Xu et coll. (Xu, 2003) ont démontré que l'administration d'AMP579 durant les 70 premières minutes de reperfusion génère une protection tandis que si cette infusion se faisait seulement durant les 20 à 30 premières minutes, la cardioprotection était absente. Ceci démontre donc l'importance de la durée de l'administration du composé pharmacologique.

Évidemment, la dose utilisée et la durée de l'administration pourraient être fonction des propriétés pharmacologiques de la molécule. Par exemple, une molécule possédant une très courte demi-vie plasmatique comme l'adénosine doit être administrée sur une période assez longue en comparaison avec un agoniste comme l'AMP579 qui possède une demi-vie d'environ une heure (Meng, 2000). L'utilisation de doses multiples, comme présenté par Budde et coll. (Budde, 2004), peut être une solution pour maintenir des niveaux plasmatiques adéquats et réduire la taille de l'infarctus du myocarde. Par ailleurs, la dose d'adénosine ne doit pas être trop élevée car elle pourrait engendrer des effets secondaires comme une hypotension ou des douleurs thoraciques, phénomènes retrouvés au niveau de l'étude ATTACC (Quintana, 2003) (section 5.1.3.4.2).

5.1.2.2 *Cardioprotection aiguë et soutenue*

Comme mentionné précédemment, la cardioprotection consiste en une réduction de la taille de l'infarctus par application d'une intervention résultant en un volume plus petit d'infarctus du myocarde que si cette intervention n'avait pas été utilisée (Hearse, 1984). La protection peut être présente pour une période limitée de reperfusion. Cette dernière, appelée aiguë (sur une courte période de temps), est observée suivant une période de reperfusion de 30 minutes à quelques heures (\leq qu'environ six heures). Chambers et coll. (Chambers, 1983) ont démontré, en utilisant un anti-inflammatoire non-stéroïdien, le flubiprophène, que la taille de l'infarctus pouvait être réduite significativement lors de

l'occlusion coronarienne chez le chien. Un autre groupe (Simpson, 1988) a quant à lui administré un analogue de la prostacycline, l'iloprost, dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion (90 minutes d'occlusion de l'artère circonflexe et six heures de reperfusion) et a réduit également la taille de l'infarctus. Rousseau et coll. (Rousseau, 1993b) ont démontré que l'administration de clentiazem, un bloqueur des canaux calciques, cinq minutes avant le début de la reperfusion permettait de diminuer la taille de l'infarctus à six heures de reperfusion. Récemment, utilisant un agoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine (CGS21680), Zhao et coll. (Zhao, 2001a) observent une réduction de l'étendue de l'infarctus à cinq heures de reperfusion dans un modèle canin d'occlusion coronarienne.

Cependant, une condition *sine qua none* à la cardioprotection veut que celle-ci soit soutenue, permettant donc une réduction permanente des dommages suite à l'occlusion coronarienne (Hearse, 1984). Ce concept est basé sur le fait que certaines interventions protectrices réduisent la taille de l'infarctus suite à une reperfusion limitée (\leq six heures) mais sont incapables de le faire suite à une reperfusion plus longue. Ces types d'interventions ne font qu'entraîner un délai dans l'apparition des dommages et en retardent l'évolution. La « permanence » de cette protection peut s'observer en allongeant la période de reperfusion au-delà de 24 à 48 heures.

Étant donné le phénomène du front de vague (chapitre 1, section 1.1.3.2.1), un agent protecteur doit atténuer de façon soutenue la migration de ce front de vague vers l'épicarde afin de réduire efficacement la taille de l'infarctus. Plusieurs études démontrent une protection aiguë mais ne réussissent pas à l'observer de façon soutenue. Par exemple, les études de Chambers et coll. (Chambers, 1983) et Simpson et coll. (Simpson, 1988) précédemment décrites n'observent pas de protection avec une reperfusion de 24 à 72 heures respectivement. Leur intervention thérapeutique ne fait que retarder l'apparition des dommages myocardiques. Rousseau et coll. (Rousseau, 1993b) ont démontré que le clentiazem entraîne une protection toujours présente à 72 heures de reperfusion, démontrant que celle-ci est soutenue. Aucune étude n'est disponible en ce qui a trait à la

« permanence » de la protection engendrée par le CGS21680 via les récepteurs A_{2A} de l'adénosine.

D'un point de vue clinique, cette protection n'est pas banale étant donné qu'un traitement tangible contre l'infarctus du myocarde requiert des interventions où l'administration de composés pharmacologiques s'effectue en situations post-ischémiques et en début de reperfusion. Le respect de la fenêtre thérapeutique et de ces différents facteurs est d'une importance capitale dans l'effort de réduction de la taille d'un infarctus du myocarde. Par ailleurs, il est crucial que cette protection soit soutenue. La taille de l'infarctus doit donc être réduite de façon « permanente » chez un patient, l'intervention étant inutile si l'infarctus progresse avec une plus longue période de reperfusion.

5.1.3 Propriétés cardioprotectrices de l'adénosine et de ses récepteurs

Plusieurs agents pharmacologiques peuvent engendrer une cardioprotection post-ischémique. En effet, des molécules comme entre autres l'IGF-1, le TGF- β 1, la bradykinine, la cardiotrophine-1 (CT-1), l'urocortine, certaines statines, les opioïdes, les bloqueurs de canaux calciques et l'adénosine engendrent une réduction. Notre attention s'est portée sur l'adénosine, une molécule synthétisée de façon endogène qui induit une cardioprotection. Par ailleurs, l'implication des différents récepteurs de l'adénosine sera aussi décrite.

L'administration d'adénosine au moment de la reperfusion dans des modèles animaux permet de réduire la taille de l'infarctus. Olafsson et coll. (Olafsson, 1987) ont observé une diminution de la taille de l'infarctus après 90 minutes d'occlusion et 24 heures de reperfusion suite à l'administration d'adénosine au moment de la reperfusion et se poursuivant durant la première heure de celle-ci. Également, dans un modèle canin (90 minutes d'ischémie et 72 heures de reperfusion), Pitarys II et coll. (Pitarys II, 1991) ont montré que l'administration d'adénosine cinq minutes avant le début et se poursuivant durant les 150 premières minutes de la reperfusion permettait de réduire significativement

la taille de l'infarctus. Zhao et coll. (Zhao, 2001a) ont aussi démontré dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion (ischémie de 60 minutes et reperfusion de six heures) que l'administration d'adénosine, débutant cinq minutes avant le début de la reperfusion et se poursuivant durant les deux premières heures de celle-ci, réduisait significativement la taille de l'infarctus. Dans un autre modèle (lapin), Zhao et coll. (Zhao, 1993) ont prouvé que l'administration d'adénosine au moment de la reperfusion permettait de réduire la taille de l'infarctus et que cet effet protecteur était perdu lors de l'administration conjointe d'adénosine et de 8-*p*-sulfophénylthéophylline, un antagoniste non-sélectif des récepteurs de l'adénosine. Todd et coll. (Todd, 1996) ont quant à eux démontré dans un modèle de lapin que la taille de l'infarctus et l'accumulation de neutrophiles à l'endothélium vasculaire coronarien étaient significativement diminuées lors de l'administration d'acide polyadénylique, un analogue de l'adénosine. Récemment, Peart et Gross (Peart, 2005) ont démontré que l'inhibition de l'adénosine kinase avant l'ischémie augmentait les taux d'adénosine et engendrait une cardioprotection, la taille de l'infarctus étant réduite de plus de 35 %. Ces résultats démontrent donc que l'adénosine, via l'augmentation de ses taux endogènes ou par son administration exogène, permet de moduler l'étendue des dommages lors d'un infarctus du myocarde.

5.1.3.1 Récepteur A_1 de l'adénosine

Les récepteurs A_1 de l'adénosine ont démontré un potentiel cardioprotecteur pré-ischémique. Dans des modèles de lapin, l'administration d'un agoniste sélectif des récepteurs A_1 de l'adénosine mime les effets du préconditionnement (une brève ischémie de cinq minutes suivie de cinq minutes de reperfusion) et réduit la taille de l'infarctus (Thornton, 1992; Baxter, 2000). Son administration conjointe avec un antagoniste n'engendre cependant pas de réduction de la taille de l'infarctus (Auchampach, 1993), suggérant une implication des récepteurs A_1 de l'adénosine dans les phénomènes de protection myocardique pré-ischémique. Lasley et Mentzer (Lasley, 1992, 1993) observent également une protection myocardique lors de l'administration du N^6 -cyclohexyladénosine,

un agoniste des récepteurs A_1 de l'adénosine. En effet, en utilisant un modèle de cœur de rat isolé, la stimulation de ces récepteurs dix minutes avant l'ischémie entraîne une amélioration des fonctions cardiaques post-ischémiques en comparaison à un groupe sans traitement. Ces résultats représentent un indice de réduction des dommages. Par ailleurs, le groupe de Reichelt et coll. (Reichelt, 2005) ont récemment observé que la délétion du gène des récepteurs A_1 de l'adénosine (KO) provoquait une augmentation des dommages liés à l'ischémie-reperfusion.

En contraste, Peart et coll. (Peart, 2002) ont observé que l'activation des récepteurs A_1 de l'adénosine avant l'ischémie et durant la reperfusion ne crée pas de protection cardiaque. Ces résultats ne corroborent pas ceux précédemment décrit par Lasley et Mentzer (Lasley, 1992, 1993) en raison de l'espèce animale et des doses choisies. Peart et coll. (Peart, 2002) utilisent le cœur de souris et des doses d'agoniste (CPA) de l'ordre du 50 nM. Lasley et Mentzer (Lasley, 1992, 1993) utilisent quant à eux des doses d'agoniste plus élevées de l'ordre de 250 nM.

En somme, ces résultats montrent donc l'implication des récepteurs A_1 de l'adénosine dans la protection cardiaque. En fonction de la dose utilisée et du moment de l'administration du composé pharmacologique, il est possible d'observer une cardioprotection.

5.1.3.2 Récepteur A_{2A} de l'adénosine

La stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine provoque une cardioprotection post-ischémique lors de la reperfusion myocardique. Le groupe de Schlack et coll. (Schlack, 1993) ont démontré ce potentiel dans un modèle canin d'infarctus du myocarde consistant en 60 minutes d'occlusion coronarienne (artère antérieure descendante gauche) et six heures de reperfusion. Le CGS21680 (dose, calculée *a posteriori* par l'auteur de cette thèse, d'environ 0,02 à 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$) a été administré dans l'artère antérieure descendante gauche (intra-coronarien) juste avant le début (cinq minutes) et durant les 55

premières minutes de la période de reperfusion. La taille de l'infarctus est passée d'environ 29 % de la zone à risque pour un groupe témoin à environ 12 % pour le groupe traité avec le CGS21680. Jordan et coll. (Jordan, 1997) ont quant à eux également observé, avec un protocole expérimental similaire (60 minutes d'ischémie suivies de trois heures de reperfusion), mais en utilisant une dose 10 fois plus élevée (0,2 µg/kg/minute), que la taille de l'infarctus était aussi réduite grâce à cet agoniste. En effet, l'administration intracoronarienne du CGS21680 a réduit significativement la taille de l'infarctus de 45 % (groupe témoin : environ 28 %; groupe traité : environ 16 %). De plus, cette administration provoquait une réduction de l'activité de la myéloperoxydase (indice de l'accumulation de neutrophiles) dans la zone ischémique et réduisait également l'accumulation de neutrophiles et la génération de radicaux libres dans l'endothélium coronarien. Zhao et coll. (Zhao, 1996) ont également démontré que l'activation des récepteurs A_{2A} par le CGS21680 diminuait l'adhérence de neutrophiles isolés à la surface endothéliale (par rapport à des neutrophiles dont les récepteurs A_{2A} de l'adénosine ne sont pas stimulés). Par ailleurs, ils ont observé une réduction de la quantité de radicaux libres produits par ces neutrophiles lors de l'ajout du CGS21680.

Le groupe de Vinten-Johansen (Zhao, 2001a) a quant à lui démontré dans un modèle canin (60 minutes d'occlusion et six heures de reperfusion) une réduction significative de la taille de l'infarctus du myocarde et de l'accumulation de neutrophiles lors de l'activation des récepteurs A_{2A} par le CGS21680 (dose de 0,2 µg/kg/minute, débutant cinq minutes avant le début de la reperfusion et ce, pendant deux heures) ou par administration d'adénosine (dose de 140 µg/kg/minute selon le même régime d'administration). Ces traitements diminuaient significativement le nombre de cellules positives à la coloration TUNEL, la fragmentation de l'ADN au niveau de la zone péri-nécrotique ischémique et, donc, de l'apoptose. De plus, le même groupe a montré que l'expression de Bax (pro-apoptotique) était réduite mais qu'au contraire, celle de la protéine Bcl-2 (protéine anti-apoptotique) était significativement augmentée. Cette étude est la

première à démontrer la modulation, par les récepteurs A_{2A} de l'adénosine, de l'expression de protéines impliquées dans l'apoptose et de ces phénomènes apoptotiques lors d'une ischémie-reperfusion concurremment à une cardioprotection.

Lasley et coll. (Lasley, 2001a) ont obtenu des résultats cardioprotecteurs semblables lors de l'administration du CGS21680 dans un modèle porcin d'infarctus du myocarde (60 minutes d'occlusion et trois heures de reperfusion). Ce groupe utilisa la même dose de l'agoniste (0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ débutant au moment de la reperfusion) pour les deux premières heures de reperfusion et une dose inférieure (0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$) pour la dernière heure. Ils ont observé une réduction de la taille de l'infarctus, passant d'environ 62 % pour un groupe témoin, à environ 36 % pour le groupe traité.

Budde et coll. (Budde, 2000), Xu et coll. (Xu, 2000; Xu, 2001, 2003) et Kis et coll. (Kis, 2003) ont démontré dans des modèles de chien et de lapin que l'AMP579, un agoniste mixte des récepteur A_{2A} et A_1 de l'adénosine, réduisait significativement la taille de l'infarctus suite à l'ischémie-reperfusion lorsque l'administration débutait juste avant l'initiation de la reperfusion. Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine semblent être les médiateurs de cette cardioprotection malgré la présence d'une composante A_1 (Xu, 2001; Kis, 2003). Cette protection était par ailleurs dépendante de la dose utilisée ainsi que du moment et de la durée d'administration. Si la dose était inférieure à 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$, aucune protection n'était observée. De plus, si l'administration était débutée trop tard dans la période de reperfusion (dix minutes après son initiation), aucune protection n'était observée tandis que si l'administration était initiée au moment même de la reperfusion, la cardioprotection était présente (Xu, 2003). La durée d'administration était aussi critique (Budde, 2000; Xu, 2003) : le temps d'administration du composé devait être supérieur à une heure sinon aucune protection n'était observée (Xu, 2003). La présence ou non d'un bolus (30 à 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ne provoquait pas de modification de cette protection (Budde, 2000).

Récemment, le groupe de Reid et coll. (Reid, 2005) ont démontré l'effet protecteur de l'agoniste AMP579 dans un protocole de préconditionnement. Étonnement, cette protection est abrogée par un antagoniste spécifique aux récepteurs A_{2A} de l'adénosine. Ceci constitue un paradoxe étant donné qu'aucune étude n'a démontré auparavant de protection pré-ischémique (préconditionnement) avec un agoniste spécifique à ces récepteurs, comme le CGS21680 (Cohen, 2000; Lasley, 2001b; Mubagwa, 2001). L'AMP579 étant un agoniste mixte A_1/A_2 (K_i de 5 et 56 nM, respectivement pour les sous-types A_1 et A_2 , (Merkel, 1998a; Merkel, 1998b; McVey, 1999)), il active les deux sous-types, leur attribuant des propriétés cardioprotectrices. De plus, il a été proposé que les récepteurs A_1 et A_{2A} pouvaient interagir afin de provoquer la cardioprotection en situation pré-ischémique (Lopes, 1999; Lopes, 2002). Ce profil unique d'activité agonistique représente donc un nouveau mécanisme de cardioprotection. D'autres travaux sont nécessaires afin de mieux comprendre le potentiel d'interactions entre les différents récepteurs de l'adénosine dans des modèles d'ischémie-reperfusion.

Un autre agoniste spécifique aux récepteurs A_{2A} de l'adénosine, l'ATL146e (chapitre 3, section 3.2.2), possède des propriétés cardioprotectrices lors de l'ischémie-reperfusion. En effet, l'ATL146e réduit significativement la taille de l'infarctus (Glover, 2005; Yang, 2005b). Par ailleurs, ce groupe a démontré un puissant effet anti-inflammatoire de ce composé en diminuant l'activation des neutrophiles et leur accumulation au niveau du myocarde ischémique.

Ces résultats suggèrent que la stimulation spécifique des récepteurs A_{2A} de l'adénosine lors de la reperfusion réduit les lésions de reperfusion et limite la progression de l'infarctus en provoquant possiblement une vasodilatation coronarienne via des mécanismes dépendants et indépendants de l'endothélium et par la relâche d'oxyde nitrique (Smits, 1995; Ikeda, 1997; Karliner, 2005; Xu, 2005), en inhibant l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium vasculaire (Zhao, 1996; Jordan, 1997; Budde, 2000; Zhao, 2001a), en réduisant la génération de radicaux libres (Cronstein, 1990; Mubagwa, 1996;

Zhao, 1996; Jordan, 1997; Budde, 2000) ou en inhibant de l'apoptose des cellules cardiaques (Zhao, 2001a). La réduction de l'inflammation semble aussi un mécanisme potentiel important dans la réduction de ces dommages.

5.1.3.3 Récepteur A_3 de l'adénosine

Il a été démontré que la stimulation des récepteurs A_3 de l'adénosine mimait également les effets du préconditionnement. De façon similaire aux récepteurs A_1 de l'adénosine, l'administration d'un agoniste A_3 réduit la taille de l'infarctus et l'administration d'un antagoniste en atténue les effets (Liu, 1994; Auchampach, 1997b).

La stimulation de ces récepteurs au moment de la reperfusion myocardique s'avère également une stratégie efficace pour réduire les lésions de reperfusion. En effet, Maddock et coll. (Maddock, 2002) ont montré que la stimulation des récepteurs A_3 de l'adénosine avec le 2-Cl-IB-MECA durant la période de reperfusion réduisait la taille de l'infarctus dans un modèle de cœur isolé. Le groupe de Auchampach et coll. (Auchampach, 2003) a également démontré un effet similaire en utilisant l'IB-MECA dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion *in vivo*. L'agoniste était administré cinq minutes avant l'initiation de la reperfusion (bolus) et réduisait significativement la taille de l'infarctus, passant d'environ 25 % pour un groupe témoin à environ 13 % pour un groupe traité. Le groupe de Tracey et coll. (Tracey, 2003) a quant à lui utilisé un nouvel agent pharmacologique spécifique aux récepteurs A_3 de l'adénosine. Cette molécule, l'acide (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3-amino-5-[6-(2,5-dichlorobenzylamino)purin-9-yl]-4-hydroxy tétrahydrofuran-2-carboxylic méthylamide (CP-532,903), est 210 fois plus sélective pour le sous-type A_3 en comparaison au sous-type A_1 chez l'homme et 90 fois chez le lapin. Son administration au moment de la reperfusion dans un modèle de cœur isolé de lapin réduit significativement de 64 % la taille de l'infarctus (environ 51 % pour le groupe témoin et environ 18 % pour le groupe traité). Ces résultats démontrent donc l'implication de ces récepteurs A_3 de l'adénosine. Ils

constituent une cible pharmacologique pour réduire l'étendue des dommages liés à l'ischémie-reperfusion.

5.1.3.4 Études cliniques : adénosine et agonistes spécifiques

5.1.3.4.1 AMISTAD & AMISTAD II

En 1999, l'étude AMISTAD (Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine) a démontré l'effet protecteur de l'adénosine lors de son administration à la reperfusion (Mahaffey, 1999). Cette étude multicentrique contrôlée par placebo a déterminé que l'administration d'adénosine conjointement à l'agent thrombolytique réduit la taille de l'infarctus. Malgré le faible nombre de patients (236 au total dont 197 ont fait l'objet d'une quantification de la taille de l'infarctus), les investigateurs ont montré une réduction significative de 67 % de la taille de l'infarctus lorsque celui-ci était antérieur (causé par l'occlusion de l'artère antérieure descendante gauche; infarctus déterminé par coloration au technitium-99 sestamibi via tomographie par émission d'un photon ou SPECT). De plus, La même taille n'a pu être réduite lorsque l'infarctus était non-antérieur. Les auteurs ne peuvent expliquer cette différence dans l'effet de l'adénosine selon la région touchée par l'occlusion coronarienne mais ont émis l'hypothèse que la présence davantage d'effets secondaires dans ce type d'infarctus (comme légère hypotension, la bradycardie, les arythmies ventriculaires; présence plus élevée dans ce groupe de patient mais malgré tout relativement faible généralement) pouvait entraîner une réduction de l'efficacité de la thrombolyse ou de la diminution de la taille de l'infarctus par l'adénosine. Les auteurs émettent une autre hypothèse expliquant cette différence : l'effet de l'adénosine sur la circulation collatérale et la microcirculation. Tel que discuté, l'impact de cette circulation est plus importante au niveau des infarctus antérieurs (Cheirif, 1991; Martin, 1992). En parallèle, l'adénosine semble engendrer une protection myocardique via la microcirculation (Pitaris II, 1991), en particulier la circulation collatérale. Mahaffey et coll. (Mahaffey, 1999) stipulent donc qu'étant donné que la circulation collatérale et la microcirculation

semble être moins importante au niveau d'un infarctus non-antérieur, l'adénosine serait moins efficace à réduire la taille de l'infarctus en comparaison à un infarctus antérieur. L'absence de cardioprotection chez les patients souffrant d'infarctus non-antérieur pourrait donc s'expliquer par ces faits. Il est à noter que cette différence pourrait aussi être due au faible nombre de patients dans cette étude.

La dose utilisée afin d'observer cette protection pharmacologique était de 70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ (i.v.) en continu sur trois heures. L'utilisation d'une dose plus faible (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ i.v. selon le même protocole d'administration) n'a pas réduit la taille de l'infarctus (résultats préliminaires par Ross et coll. (Ross, 2002) de l'étude AMISTAD II). De plus, ces mêmes résultats préliminaires semblent démontrer une réduction de la mortalité et l'apparition d'insuffisance cardiaque à six mois suivant l'infarctus. La publication de l'étude AMISTAD II permettra de corroborer les résultats de la première phase de cette étude clinique avec un nombre plus important de patients. Ceci validera l'utilisation de l'adénosine conjointement à la reperfusion.

5.1.3.4.2 *ATTACC*

L'étude ATTACC (ATTenuation by Adenosine of Cardiac Complications) (Quintana, 2003) a évalué les fonctions ventriculaires et les événements cardiovasculaires suite à l'administration d'adénosine conjointement à la thrombolyse. Aucune amélioration des fonctions ventriculaires n'a été notée mais une tendance vers une réduction de la mortalité par des événements cardiovasculaires a été observée. La raison de l'observation d'une tendance serait peut-être due au faible nombre de patients dans cette étude (≤ 160). L'augmentation du nombre de patients pourrait permettre de démontrer une différence. Par ailleurs, la dose utilisée était de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ i.v. en continu sur six heures. Une dose plus élevée aurait peut-être permis d'engendrer des effets positifs. Les auteurs ont cependant observé qu'une dose plus élevée (40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$) engendrait des effets secondaires (douleurs thoraciques et morts). Il est à noter que la dose utilisée dans cette

étude avait pour but d'induire un effet anti-inflammatoire afin d'inhiber les neutrophiles et plaquettes circulantes et de réduire leur recrutement en situation post-ischémique mais sans engendrer de changements hémodynamiques. Cette étude n'a donc malheureusement pas observé d'effets bénéfiques de l'adénosine en reperfusion myocardique.

5.1.3.4.3 *ADMIRE*

L'étude ADMIRE (AMP579 Delivery for Myocardial Infarction REduction) (Kopecky, 2003) a quant à elle utilisé l'AMP579, un agoniste mixte spécifique aux récepteurs A₁ et A_{2A} de l'adénosine. De façon similaire à ATTACC, ADMIRE n'a pas réussi à démontrer une réduction de la taille de l'infarctus chez les patients recevant l'agoniste conjointement à la reperfusion par angioplastie. Les doses utilisées étaient de 15, 30 ou 60 µg/kg/minute i.v. en continu sur six heures et celles-ci s'avéraient sans effets secondaires significatifs. L'absence de cardioprotection serait principalement due à ces doses qui semblent suboptimales. En effet, les auteurs stipulent que la tendance observée vers cette protection démontre bien l'utilisation de doses inadéquatement basses. D'autres études utilisant des doses supérieures administrées aux patients pourraient permettre de démontrer l'effet bénéfique de l'AMP579 en reperfusion.

5.1.3.4.4 *Consensus des études*

Un consensus peut donc être tiré de ces études cliniques : la dose administrée doit être suffisamment élevée afin d'engendrer une cardioprotection. Si les niveaux plasmatiques des molécules n'atteignent pas un certain seuil lors de la reperfusion, aucune protection ne sera observée. L'étude AMISTAD semble avoir atteint ce seuil en contraste avec l'étude ATTACC. Ce seuil est unique pour chacune des molécules étudiées et est fonction de ses propriétés pharmacologiques. L'étude ADMIRE démontre ce fait. La dose suboptimale utilisée n'a pas provoquée de protection. Davantage d'études cliniques utilisant l'adénosine ou d'autres agonistes permettront de résoudre cette problématique

capitale et permettront l'utilisation future de ces molécules comme thérapie conjointe à la reperfusion.

5.1.4 Cardioprotection post-ischémique et protéines

Plusieurs voies de signalisation sont ciblées pour l'observation d'une cardioprotection post-ischémique. Les principales voies étudiées dans cette thèse sont celles impliquant 1) la PI3K et Akt, 2) l'apoptose, principalement les caspases, 3) les protéines Hsp et 4) le facteur de transcription CREB. Toutes ces protéines possèdent le potentiel d'être engagées dans la cardioprotection post-ischémique. Par ailleurs, leurs rôles au niveau de cette réduction de la taille de l'infarctus par un agoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine sont inconnus. Ainsi, l'implication de la PI3K, d'Akt, des Hsp et de CREB sera décrite dans les phénomènes de cardioprotection au niveau de cette partie de la thèse.

5.1.4.1 *PI3K et Akt*

Possédant des propriétés anti-apoptotiques, le rôle de la PI3K et d'Akt au niveau de l'infarctus du myocarde a été investigué. Le mécanisme par lequel ces protéines sont activées demeure incertain mais celles-ci sont nécessaires à l'observation d'une protection cardiaque lors de la reperfusion myocardique.

Baines et coll. (Baines, 1999) ont démontré que l'insuline diminuait l'étendue des dommages induits au myocarde. En effet, dans un système de cœur isolé, l'administration d'insuline débutant cinq minutes avant le début de la période de reperfusion et se poursuivant durant toute sa période réduisait significativement la taille de l'infarctus. Les récepteurs de l'insuline et du facteur de croissance de l'insuline (IGF) possèdent comme effecteur cellulaire la PI3K et la stimulation de ces récepteurs active l'enzyme, réduit la mort cellulaire par nécrose et par apoptose ainsi que l'accumulation de neutrophiles (Buerke, 1995). Il a également été démontré qu'un des effecteurs directs de la PI3K, la kinase Akt, exerçait un effet cardioprotecteur. Fujio et coll. (Fujio, 2000) ont observé que

Akt permettait la survie des cardiomyocytes *in vitro* et de leur protection contre les lésions de reperfusion. Par des expériences de transfections, ce groupe a démontré une augmentation de la survie de ces cellules lorsque celles-ci surexpriment le gène d'une forme constitutivement active de Akt en présence de IGF-1 (un agoniste des récepteurs à l'IGF-1, eux-mêmes activateurs de la PI3K et d'Akt) ainsi qu'une réduction du nombre de cellules apoptotiques suivant une ischémie-reperfusion. Cette protection était abrogée lors de la présence simultanée d'IGF-1 et d'un inhibiteur de la PI3K (wortmannin). Des résultats semblables ont été observés par Matsui et coll. (Matsui, 2001), ce groupe ayant constaté dans un modèle de rat que la transfection d'une forme constitutivement active de la Akt réduisait la taille de l'infarctus et la quantité de cellules apoptotiques et améliorait les fonctions cardiaques post-ischémiques.

D'autres groupes ont également observé une protection myocardique lors de l'administration d'insuline (Buerke, 1995; Jonassen, 2000a; Jonassen, 2000b; Jonassen, 2001a; Jonassen, 2001b; Yamashita, 2001; Gao, 2002; Sack, 2003; Jonassen, 2004). L'administration de cette hormone doit se faire rapidement lors de la reperfusion, sans quoi aucune protection n'est observée. En effet, Jonassen et coll. (Jonassen, 2001a) ont montré qu'un retard d'administration (15 minutes après le début de la reperfusion) provoquait une perte de la cardioprotection. Par ailleurs, tous ces groupes stipulent que l'activation de la voie impliquant la PI3K et Akt est nécessaire pour observer cette limitation de la taille de l'infarctus. Ces deux protéines sont donc des facteurs de survie cellulaire d'une importance capitale afin d'observer une cardioprotection.

En contraste, Young et coll. (Young, 2000) ont quant à eux montré que le blocage pharmacologique de la PI3K avec l'aide d'un inhibiteur spécifique (wortmannin) réduisait les dysfonctions cardiaques induites par les polymorphonucléaires. Dans un modèle d'ischémie-reperfusion de cœur isolé, ce groupe a observé que, simultanément à la perfusion de polymorphonucléaires isolés, l'administration de wortmannin engendrait une diminution de l'infiltration de ces cellules, améliorant par le fait même les fonctions

cardiaques. De plus, ce même groupe a constaté une réduction de la génération de radicaux libres par les polymorphonucléaires lors du blocage de la PI3K. Il est à noter que la différence avec ce modèle est l'utilisation d'un modèle de cœur isolé et que les polymorphonucléaires sont administrés de façon exogène. La présence anormalement élevée (en comparaison du milieu *in vivo*) pourrait expliquer cette observation. L'inhibition d'une isoforme spécifique de la PI3K par la wortmannin au niveau de ces polymorphonucléaires pourrait aussi expliquer ces résultats.

D'autres molécules comme la bradykinine, la CT-1, l'urocortine, et certaines statines (ou inhibiteur de l'hydroxyl-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase) possèdent des propriétés cardioprotectrices via l'activation de la PI3K et d'Akt. En effet, la bradykinine engendre une protection cardiaque contre l'ischémie-reperfusion en activant la voie de la PI3K et d'Akt (Bell, 2003b). L'administration de CT-1, un membre de la famille des cytokines de type interleukine-6 (IL-6), provoque aussi une protection (Brar, 2001a; Brar, 2001b; Liao, 2002) en activant la PI3K et Akt (Brar, 2001b). L'urocortine quant à elle appartient à la famille des facteurs de relâche de corticotrophine hypothalamique. Elle permet également une cardioprotection (Brar, 2000; Brar, 2002; Schulman, 2002) et ce, en activant la voie PI3K-Akt (Brar, 2002). Par ailleurs, certaines molécules membres de la famille des statines engendrent une diminution similaire de la taille de l'infarctus. En effet, la simvastatine (Wolfrum, 2004) et l'atorvastatine (Bell, 2003a; Efthymiou, 2005) sont capables de protéger le myocarde en activant la PI3K et Akt.

Ces résultats suggèrent donc que la PI3K et Akt pourraient être impliquées dans les phénomènes de cardioprotection. Ces lipides et protéines kinases ont récemment été dénommées « Reperfusion Injury Salvage Kinase » (RISK) (Hausenloy, 2004), démontrant leur potentiel protecteur afin de limiter l'infarctus lors de la reperfusion. Les travaux de cette thèse démontreront ce potentiel lors de la stimulation des récepteur A_{2A} de l'adénosine.

5.1.4.2 Apoptose

La reperfusion entraîne une activation des processus apoptotiques déclenchés lors de l'ischémie (Gottlieb, 1994; Fliss, 1996; Freude, 2000). Plusieurs études démontrent la participation des caspases et par le fait même de l'apoptose dans l'évolution des lésions d'ischémie-reperfusion. La colocalisation des caspases avec les myocytes apoptotiques (Black, 1998) suggèrent que celles-ci sont des protéines médiatrices des dommages myocardiques. Yaoita et coll. (Yaoita, 1998) ont quant à eux observé que l'inhibition de ces enzymes pro-apoptotiques par un inhibiteur non-sélectif (ZVAD-fmk) réduisait la taille de l'infarctus chez le rat lors d'une occlusion coronarienne de 30 minutes suivie d'une reperfusion de 24 heures. Un autre groupe (Holly, 1999) a obtenu des résultats similaires avec un autre inhibiteur non spécifique (YVAD-cmk) dans un modèle de lapin consistant en 30 minutes d'occlusion suivies par trois heures de reperfusion. Le désavantage de ces deux études est que le composé pharmacologique est administré avant l'ischémie, une situation difficilement reproductible cliniquement et ne représentant pas une intervention post-ischémique. Le groupe de Mocanu et coll. (Mocanu, 2000) a donc effectué une étude où le composé était administré à la fin de la période d'ischémie et en début de reperfusion. Utilisant un modèle de cœur isolé, ils ont observé que l'inhibition sélective des caspases-3, -8 et -9 ainsi que l'inhibition non-sélective de toutes les caspases engendraient une réduction significative de l'étendue de l'infarctus. Malgré le modèle de cœur isolé, ce groupe était le premier à utiliser cette intervention post-ischémique par des inhibiteurs des caspases, démontrant la possibilité de cette thérapie lors d'un infarctus du myocarde. Simultanément, un autre groupe (Huang, 2000) a également démontré l'effet bénéfique d'un inhibiteur non-spécifique des caspases (ZVAD-fmk) administré juste avant (cinq minutes) l'initiation de la reperfusion. En utilisant un modèle *in vivo* d'occlusion coronarienne, ce groupe a observé une diminution significative de la taille de l'infarctus. Récemment, le groupe de Regan et coll. (Regan, 2003) a observé que la surexpression des récepteurs A₁ de l'adénosine spécifiquement au niveau cardiaque permettait non seulement

de réduire la taille de l'infarctus mais permettait également de diminuer l'activité de la caspase-3. Ces observations permettent donc de démontrer que la réduction de l'activation des caspases engendre une protection myocardique.

5.1.4.3 *Hsp*

L'implication des Hsp dans la protection cardiaque a été décrite pour la première fois en 1986 par le groupe de Dillman et coll. (Dillmann, 1986). Ces derniers ont observé que suite à une occlusion coronarienne, la protéine Hsp70 était induite. D'autres groupes ont corroboré ces résultats et ont démontré que les Hsp étaient d'importants médiateurs de la protection des cellules cardiaques contre les dommages liés à l'ischémie-reperfusion.

Les deux principales Hsp étudiées sont les protéines des familles Hsp27 et Hsp70. L'ischémie peut elle-même modifier l'expression de ces protéines. En effet, Knowlton et coll. (Knowlton, 1991) et Kingma (Kingma, 1999) ont observé que de brèves périodes d'ischémie (deux à quatre cycles de cinq minutes) entraînaient un accroissement de l'expression de Hsp70. Marber et coll. (Marber, 1993) ont par la suite observé que l'expression de Hsp72, une protéine membre de la famille Hsp70, était aussi augmentée suite à ces brèves ischémies. Ce groupe a également démontré que cette expression engendrait une protection contre les dommages liés à une ischémie prolongée (60 minutes), la taille de l'infarctus étant réduite. La reperfusion est aussi responsable de l'augmentation d'expression des Hsp. Nishizawa et coll. (Nishizawa, 1996) ont montré que la reperfusion augmentait l'expression de Hsp70, via des mesures d'ARNm. Ces résultats établissent donc l'effet de l'ischémie-reperfusion sur la modification de l'expression des Hsp, démontrant leur capacité cardioprotectrice.

La surexpression des Hsp confère une protection accrue contre l'ischémie-reperfusion. En effet, un utilisant des cardiomyocytes isolés de rats, la surexpression de la protéine Hsp27, par un adénovirus encodant pour cette dernière, protège contre une ischémie simulée (Martin, 1997b). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des

myocytes canins isolés dont Hsp27 a été surexprimée via infection par un adénovirus (Vander Heide, 2002). Ces myocytes sont plus résistants à l'ischémie que des myocytes non-infectés. Au niveau du cœur, la surexpression de Hsp27 engendre aussi une protection. Hollander et coll (Hollander, 2004) ont constaté que, dans un modèle de cœur de souris isolé, la surexpression de cette protéine réduit la relâche de créatine kinase, un indice de dommages. Récemment, Fan et coll. (Fan, 2005) ont montré l'effet protecteur d'un autre membre de la famille des petites Hsp, Hsp20. La surexpression de cette protéine entraîne une protection du cœur isolé en améliorant les fonctions ventriculaires, une diminution de relâche de lactate déshydrogénase et des processus apoptotiques suite à l'ischémie. Par ailleurs, une cardioprotection est également observée *in vivo* alors que la taille de l'infarctus est significativement diminuée dans les animaux présentant une surexpression de Hsp20 en comparaison au groupe témoin. De façon similaire, la surexpression de Hsp70 accorde au myocarde une résistance à l'ischémie-reperfusion (Marber, 1995). En effet, dans un système de cœur isolé, une meilleure récupération fonctionnelle ainsi qu'une diminution de la relâche de créatine kinase et de la taille d'infarctus sont observées dans les cœurs où Hsp70 est surexprimée. Ces résultats démontrent donc le potentiel cardioprotecteur de ces protéines dans le cœur complet.

5.1.4.4 CREB

Le rôle de CREB au niveau de la cardioprotection est encore mal défini. Il est connu que ce facteur de transcription est un médiateur de survie cellulaire au niveau du cerveau (Tanaka, 2001) et dans d'autres systèmes. En effet, la surexpression d'un dominant négatif de CREB (S119A) chez la souris engendre l'apoptose des cellules T ainsi qu'une réduction marquée de production d'interleukine-2 (Barton, 1996). Par ailleurs, Du et Montminy (Du, 1998) ont démontré l'implication de CREB dans les phénomènes de survie cellulaire. Ce groupe a observé que suite à une stimulation de cellules en culture de type HEK293T par du sérum contenant des facteurs de croissance, CREB était activé par la protéine kinase de survie cellulaire Akt et que cette activation était bloquée par un

inhibiteur spécifique d'Akt. De plus, l'expression d'un dominant négatif de CREB (S133A) engendrait aussi une réduction d'activation par Akt et la surexpression d'un mutant inactif d'Akt réduisait l'activation de CREB. L'étude de Bonni et coll. (Bonni, 1999) accorde également à CREB un rôle protecteur. Ce groupe a démontré que l'expression d'un mutant constitutivement actif de cette protéine provoquait une protection. En effet, en absence de BDNF (facteur de survie appelé facteur neurotrophique dérivé du cerveau), ce mutant conférait aux neurones en culture une résistance à la mort cellulaire. Ces résultats démontrent donc l'implication de CREB dans les phénomènes de survie cellulaire, faisant de ce facteur de transcription un candidat potentiel pour moduler la cardioprotection.

Lochner et coll. (Lochner, 2004) ont démontré que CREB pouvait permettre un effet protecteur dans le préconditionnement ischémique. En effet, plusieurs brefs cycles d'ischémie-reperfusion activaient CREB et étaient accompagnés d'une amélioration fonctionnelle suite à l'ischémie soutenue. Plus récemment, Das et coll. (Das, 2005a; Das, 2005b) ont démontré la nécessité de CREB et Akt dans le préconditionnement par le resvératrol, un polyphénol du vin rouge. Dans un modèle de cœur isolé, ce groupe a observé que CREB était essentiel pour engendrer un effet protecteur avant l'ischémie par le resvératrol. Ils ont également montré l'importance de Bcl-2, Bad et des récepteurs A₁ et A₃ de l'adénosine dans ce type de protection cardiaque. Via l'activation du récepteur A₃, CREB engendrerait la phosphorylation de Bcl-2, augmentant ainsi son activité anti-apoptotique. Par ailleurs, via l'activation des récepteurs A₁ et/ou A₃, Akt serait capable de phosphoryler, d'une part, CREB pour produire la même phosphorylation de Bcl-2 et, d'autre part, Bad pour en réduire ses propriétés pro-apoptotiques. L'effet net de ces différentes phosphorylations et activation/inhibition de protéines est de réduire ultimement l'apoptose et d'engendrer la protection myocardique via un signal anti-apoptotique.

5.2 Protection pharmacologique du cerveau : nouveau concept

5.2.1 Inflammation, cytokines et dépression post-infarctus

La protection pharmacologique du cerveau pour réduire les symptômes de dépression post-infarctus du myocarde est un tout nouveau concept. Aucune étude n'est actuellement disponible afin de bien cerner cette problématique. Le groupe de Wann et coll. (Wann, 2005a) est le seul à avoir développé un tel modèle. Ce groupe a ciblé l'inflammation post-infarctus et les cytokines pro-inflammatoires.

La synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'interleukine-1 β (IL-1 β) et l'IL-6 est induite lors d'un infarctus du myocarde (Herskowitz, 1995; Ono, 1998; Yue, 1998; Grosjean, 1999; Irwin, 1999; Pudil, 1999; Prabhu, 2000; Deten, 2002). Le groupe de Wann et coll. (Wann, 2005a) a porté son attention sur le TNF α , étant donné la possibilité de le moduler pharmacologiquement. Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire qui se retrouve dans la plupart des cellules suite à un dommage (Beutler, 1989; Tracey, 1993). L'infarctus du myocarde augmente sa synthèse et sa relâche dans la circulation sanguine (Latini, 1994). Le tissu myocardique peut produire cette cytokine (Herskowitz, 1995; Kapadia, 1995; Kitakaze, 1995; Massey, 1995; Torre-Amione, 1995; Gurevitch, 1996; Kumar, 1996; Torre-Amione, 1996a; Torre-Amione, 1996b). Les cardiomyocytes en sont une source (Kapadia, 1995) au même titre que les macrophages résidents du myocarde (Kapadia, 1995; Meng, 1996). Le TNF α y affecte ensuite les fonctions cardiaques (Meldrum, 1998). Cette cytokine peut être aussi produite dans le cerveau par les principaux constituants cellulaires, soit les neurones, la glie et les astrocytes (Blikstad, 1978; Tracey, 1987; Cannon, 1990). Il y entraîne la mort neuronale et gliale (Goldblum, 1993). Le TNF α constitue donc une cible prometteuse pouvant être modulée pharmacologiquement.

Wann et coll. (Wann, 2005a) ont administré la pentoxifylline et en ont étudié l'effet sur la mort cellulaire au niveau de l'amygdale suite à l'infarctus du myocarde. La pentoxifylline est un inhibiteur de synthèse des cytokines pro-inflammatoires, principalement de TNF α (D'Hellencourt, 1996; Marcinkiewicz, 2000; Silva, 2000; Weber, 2001; Colson, 2003). La pentoxifylline a entraîné une régression des processus apoptotiques observés dans l'amygdale. En effet, la coloration TUNEL démontre un nombre de cellules positives (apoptotiques) significativement réduit en comparaison au groupe avec infarctus du myocarde (n'ayant pas reçu de pentoxifylline) mais similaire au groupe témoin (chirurgie « Sham »). De plus, cet inhibiteur normalise les activités de la PI3K et de la caspase-3 (respectivement anti- et pro-apoptotique) à des valeurs similaires au groupe témoin. Ces activités sont donc similaires au groupe témoin. Le ratio Bax/Bcl-2 est quant à lui également normalisé à des valeurs semblables au groupe témoin. Ces résultats démontrent donc la possibilité de moduler l'apoptose au niveau de l'amygdale suite à un infarctus du myocarde par un agent pharmacologique. Par ailleurs, le TNF α semble être responsable de cette mort cellulaire dans l'amygdale puisque son inhibition de synthèse réduit les phénomènes apoptotiques. Ces mêmes résultats ne permettent cependant pas de déterminer la source de cette cytokine.

Le mécanisme exact de réduction de l'apoptose n'est pas encore bien défini. La mort cellulaire déclenchée par le TNF α , une cytokine pro-inflammatoire et pro-apoptotique, pourrait constituer un mécanisme. Comme mentionné précédemment, les niveaux plasmatiques de TNF α augmentent suite à l'infarctus du myocarde. La cytokine semble pouvoir être transportée du sang vers le cerveau au travers de la barrière hémato-encéphalique (Goldblum, 1990), probablement pour signaler l'existence de processus inflammatoires périphériques au cerveau. Malgré que Goldblum et Sun (Goldblum, 1990) aient observé que le TNF α semble pouvoir provoquer le passage de macromolécule comme l'albumine de sérum bovin (BSA) au travers d'une barrière endothéliale, ces observations ont été effectuées *in vitro*. Le TNF α est un polypeptide de 233 acides aminés et, de par sa

structure primaire et son poids moléculaire, il est peu probable que cette cytokine puisse diffuser passivement au travers de l'endothélium vasculaire constituant la barrière hémato-encéphalique (Nguyen, 2002; Francis, 2004b). L'existence d'un système de transport actif pourrait expliquer ce passage du milieu vasculaire vers le cerveau au travers de la barrière (Gutierrez, 1993). Comme revu par Banks et coll. (Banks, 1995), ces transporteurs sont saturables et possèdent une vitesse lente de transport (comparables aux transporteurs pour des composés hydrosolubles comme la morphine). Néanmoins, les quantités importées du sang vers le système nerveux central semble être efficaces, en prenant pour exemple encore une fois la morphine. À la lumière de ces observations, il est possible qu'une partie des cytokines retrouvées à l'intérieur de la barrière hémato-encéphalique soit due à l'importation de ces dernières par des transporteurs. L'effet pro-apoptotique observé par Wann et coll. (Wann, 2005a) pourrait donc être dû en partie à ce transport.

La synthèse de TNF α à l'intérieur de la barrière hémato-encéphalique pourrait également expliquer sa présence au niveau du système nerveux central. Par des mécanismes encore peu caractérisés, les dommages ou l'inflammation du tissu périphérique entraînent une augmentation de la synthèse de cytokines dans le cerveau (Pan, 1997; Turnbull, 1998; Tilders, 1999). Francis et coll. (Francis, 2004a) ont observé la synthèse de TNF α à l'intérieur du cerveau (hypothalamus) suite à un infarctus du myocarde, un exemple de dommage périphérique. Ils proposent un mécanisme neuronal régulant cette synthèse et stimulé par l'infarctus lui-même. Dans une étude subséquente, le même groupe (Francis, 2004b) a observé une dissociation entre les niveaux circulants de TNF α et ceux retrouvés dans le cerveau. Ils démontrent cependant que les nerfs afférents sympathiques cardiaques sont critiques pour altérer la synthèse de cytokine. En effet, la destruction de ces nerfs par l'application de phénol à la surface myocardique réduit la synthèse de TNF α dans l'hypothalamus suite à un infarctus du myocarde (cette méthode a été validée par d'autres groupes auparavant (Mann, 1996; Bozkurt, 1998; Longhurst, 2001)). De plus, ils observent une diminution de synthèse de la cytokine suite à une vagotomie bilatérale. Ce

résultat contraste avec le fait que la stimulation du nerf vague par des cytokines périphériques (sans dommages périphériques comme l'infarctus du myocarde) permet la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau (Francis, 2001). Le mécanisme d'action de cette modulation pourrait donc être différent lors d'un dommage tissulaire cardiaque (infarctus) d'un endommagement périphérique. Il impliquerait les nerfs afférents sympathiques cardiaques de concert avec le nerf vague. Cette synthèse sous contrôle neuronal pourrait expliquer les résultats obtenus par Wann et coll. (Wann, 2005a). Évidemment, d'autres travaux sont nécessaires afin de valider cette hypothèse.

Finalement, un dernier mécanisme expliquant la présence d'apoptose dans les structures cérébrales à l'intérieur de la barrière hémato-encéphalique pourrait engager la cyclooxygénase de type 2 (COX-2) et la synthèse de prostaglandines E₂ (PGE₂). Il a été démontré que les cytokines circulantes comme le TNF α liaient leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Nadeau, 1999). Cette liaison entraîne par la suite la synthèse de la protéine COX-2 à l'intérieur des cellules endothéliales (Cao, 1995; Lacroix, 1998; Quan, 1998; Laflamme, 1999; Nadeau, 1999) et ce, via le facteur nucléaire κ B (NF- κ B). Ce facteur de transcription est capable de lier le promoteur du gène de COX-2 et d'en induire sa transcription génique (Crofford, 1997; Sorli, 1998). COX-2 provoque ultérieurement la génération de PGE₂, substance qui diffusera librement vers l'intérieur de la barrière hémato-encéphalique (Zhang, 2003) et entraînera l'apoptose de certaines structures cérébrales. Supportant cette hypothèse, l'inhibition de COX-2 ou son inactivation génique s'est avérée efficace à réduire ces dommages apoptotiques dans l'hippocampe via la réduction de PGE₂ (Li, 2003; Sasaki, 2004). L'effet anti-inflammatoire du pentoxifylline dans le modèle de Wann et coll. (Wann, 2005a) pourrait donc s'expliquer par la réduction de l'activation de COX-2, diminuant par le fait même la synthèse de PGE₂ et l'apoptose au niveau de l'amygdale. D'autres travaux sont nécessaires afin de valider cette hypothèse.

En somme, l'effet pro-inflammatoire du $\text{TNF}\alpha$ semble expliquer les phénomènes apoptotiques observés au niveau de l'amygdale lors d'une dépression post-infarctus puisque l'inhibition de sa synthèse entraîne une régression de l'apoptose. Les mécanismes expliquant cette mort cellulaire sont encore inconnus dans ce modèle de dépression post-infarctus mais pourraient inclure la signalisation cellulaire pro-inflammatoire induite par le $\text{TNF}\alpha$, qu'elle soit initiée à l'extérieur ou à l'intérieur de la barrière hémato-encéphalique. Une thérapie anti-inflammatoire semble donc une cible efficace pour réduire les processus apoptotiques au niveau de l'amygdale et pourraient provoquer une réduction de la dépression post-infarctus.

Chapitre 6

Hypothèses

6.1 Hypothèse 1 : Cardioprotection aiguë dépendante de la PI3K

La reperfusion des tissus ischémiques limite les dommages induits par l'occlusion d'une artère coronarienne. Cependant des événements délétères, appelés lésions de reperfusion, survenant durant cette période, diminuent son efficacité à limiter l'étendue des lésions irréversibles. Elles incluent l'accumulation de neutrophiles et de plaquettes, la génération massive de radicaux libres, la surcharge calcique et l'apoptose des cellules cardiaques. En inhibant ces lésions de reperfusion avec des agents pharmacologiques, il est possible de réduire la taille de l'infarctus.

Plusieurs agents pharmacologiques ont démontré leur efficacité à réduire la taille de l'infarctus du myocarde même si leur administration était limitée à la période de reperfusion. La stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine par des agonistes est parmi les différentes interventions pharmacologiques efficaces à prévenir les lésions de reperfusion. Toutefois les mécanismes intracellulaires responsables de cette cardioprotection ne sont pas encore identifiés. Par ailleurs, les récepteurs A_{2A} de l'adénosine engendrent une réduction de la mort cellulaire par apoptose lors d'un infarctus du myocarde. Nous avons donc choisi de porter notre attention sur deux voies de signalisation qui pourraient être modulées par les récepteurs A_{2A} de l'adénosine tout en étant impliquées dans cette cardioprotection, soient les voies engageant la PI3K et la caspase-3.

Il a été démontré que l'activation de la PI3K permet la génération d'un signal de survie cellulaire et permet la réduction des processus apoptotiques (Datta, 1997; Cardone, 1998; Datta, 1999; Kuwahara, 2000) (revue par Hausenloy et Yellon (Hausenloy, 2004)). L'inhibition des caspases, comme la caspase-3, engendre aussi un signal de survie ou réduit

celui de mort cellulaire (Black, 1998; Yaoita, 1998; Holly, 1999; Huang, 2000; Mocanu, 2000; Regan, 2003). Toutefois, aucune étude n'a déterminé si l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine peut moduler l'activité de ces enzymes dans un modèle de cardioprotection post-ischémique.

Les travaux présentés dans la première partie de cette thèse consistaient donc à établir si la stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine pouvait réduire la taille de l'infarctus du myocarde dans un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion (cinq heures de reperfusion) et si cette stimulation modulait l'activité de la PI3K et de la caspase-3.

6.2 Hypothèse 2 : Cardioprotection soutenue

Malgré le potentiel cardioprotecteur de plusieurs molécules, certaines d'entre elles ne font que retarder l'apparition des dommages myocardiques suite à une ischémie-reperfusion. Une protection peut être présente avec de courtes périodes de reperfusion (en général, plus courte durée que cinq à six heures) mais en prolongeant la période de reperfusion au-delà de cette période, la protection est perdue et la taille de l'infarctus est similaire à un groupe témoin sans cardioprotection (absence de traitement). Les études de Chambers et coll. (Chambers, 1983) et Simpson et coll. (Simpson, 1988) en sont de bons exemples.

La protéine Akt est reconnue comme possédant un effet cardioprotecteur lors de son activation en reperfusion (revue par Hausenloy et Yellon (Hausenloy, 2004)). De façon similaire, les protéines Hsp sont également reconnues comme pouvant jouer un rôle dans la cardioprotection par diverses molécules ou procédés (revue par Latchman (Latchman, 2001) ou Snoeckx et coll. (Snoeckx, 2001)). CREB pourrait aussi être un modulateur de la cardioprotection post-ischémique. Il demeure cependant inconnu si une stimulation post-ischémique des récepteurs A_{2A} de l'adénosine peut engendrer leur modulation simultanément à une réduction de la taille de l'infarctus du myocarde.

Les travaux présentés dans la deuxième partie de cette thèse consistaient donc à établir si la stimulation post-ischémique des récepteurs A_{2A} de l'adénosine pouvait engendrer une cardioprotection soutenue (« permanente ») dans un modèle d'ischémie-reperfusion (72 heures de reperfusion) et si cette stimulation modulait l'activation d'Akt et de CREB ainsi que l'expression de Hsp27 et Hsp70.

6.3 Hypothèse 3 : Régression de l'apoptose post-infarctus

L'apoptose à l'intérieur de certaines structures cérébrales pourrait constituer un mécanisme expliquant les symptômes de dépression post-infarctus. En effet, Wann et coll. (Wann, 2005a) ont démontré que l'apoptose avait lieu au niveau de l'amygdale suite à un infarctus du myocarde, phénomène caractérisé par une augmentation des processus pro-apoptotiques et une réduction de ceux anti-apoptotiques. L'amygdale étant une structure clef du système limbique associée aux composantes émotionnelles, motivationnelles et homéostatiques des troubles dépressifs (Nieuwenhuys, 1996), ces observations pourraient démontrer son implication dans la dépression post-infarctus.

Wann et coll. (Wann, 2005a) ont administré le pentoxifylline et ont observé une régression de ces processus apoptotiques. Cette molécule est un inhibiteur de synthèse de cytokine, en particulier du $TNF\alpha$. L'effet anti-inflammatoire d'inhibition de $TNF\alpha$ rend possible la modulation de l'apoptose au niveau de l'amygdale suite à un infarctus du myocarde.

Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine possèdent également un effet anti-inflammatoire. Ils engendrent une réduction de la taille de l'infarctus du myocarde lorsque stimulés lors de la reperfusion et possèdent la caractéristique de réduire la synthèse de $TNF\alpha$. Cependant, il demeure inconnu si cette même stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine peut simultanément conduire à une cardioprotection et à une régression des processus apoptotiques post-infarctus au niveau de l'amygdale.

Les travaux présentés dans la troisième partie de cette thèse consistaient donc à établir si la stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine pouvait engendrer une régression des processus apoptotiques observés au niveau l'amygdale dans un modèle d'ischémie-reperfusion (72 heures de reperfusion) et de dépression post-infarctus et ce, via un effet anti-inflammatoire par réduction du $TNF\alpha$.

Chapitre 7

Méthodologie

Afin d'alléger la lecture de cette thèse, la méthodologie n'a pas été détaillée dans cette section. Cette partie de la thèse est présentée dans chacun des articles figurant dans cette thèse au niveau de la section « Methods » de ceux-ci. Il est possible d'y trouver tous les détails en rapport aux procédures chirurgicales quant à la génération de l'infarctus du myocarde. Par ailleurs, les différentes méthodes utilisées afin de déterminer l'activation des voies de signalisation ainsi que l'expression des différentes protéines exposées dans l'introduction de cette thèse y sont décrites.

Chapitre 8

Journal of Cardiovascular Pharmacology (2004)

Boucher M, Pesant S, Falcao S, de Montigny, Schampaert É, Cardinal R, Rousseau G

Publié dans *Journal of Cardiovascular Pharmacology*

2004

Post-ischemic cardioprotection by A_{2A} adenosine receptors: Dependent of
phosphatidylinositol 3-kinase pathway

Volume 43, Volume 3, Pages 416-422

Matthieu Boucher est le principal auteur de cet article (contribution la plus importante :
élaboration du projet, réalisation des expériences, analyse des résultats et écriture du
manuscrit)

(L'article sous sa forme publiée est en annexe)

ABSTRACT

Activation of myocardial A_{2A} adenosine receptors during reperfusion has been shown to be cardioprotective. The intracellular mechanisms underlying this protection remain unknown. In order to understand the beneficial effects of activated A_{2A} adenosine receptors in such a state, we investigated whether the enzymes phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and caspase-3 can account for this post-ischemic cardioprotective effect in an anaesthetised rabbit model of myocardial infarction (30 min ischemia; 5 hours reperfusion). Administration of the A_{2A} agonist CGS21680 (0.2 µg/kg/min) five min before reperfusion began (Early) reduced infarct size expressed as a percentage of the area at risk (25.7 ± 5.3 % vs. 46.5 ± 5.3 % for the control group; *p<0.05). Treatment with the A_{2A} agonist five minutes after the onset of reperfusion (Late) had no effect on infarct size (38.2 ± 6.2 %). In presence of a selective inhibitor of PI3K (LY294002), the beneficial effects of CGS21680 on infarct size was no longer observed (43.9 ± 7.9 %). After 5 hours of reperfusion, higher PI3K activity in the ischemic region was observed in the Early group compared to the other experimental groups. Caspase-3 activity was not observed in these different groups. In another set of experiments, PI3K activity was significantly higher during the first 15 minutes of reperfusion in the Early group as compared to the Control group. Caspase-3 activity increased rapidly during the first 15 min. of reperfusion in the Control group, remaining stable in the Early group. These results indicated that post-ischemic cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation is PI3K-dependent and modulate rapidly other signaling pathways such as caspase-3.

KEYWORDS

A_{2A} adenosine receptors, cardioprotection, reperfusion injury, myocardial infarction, phosphatidylinositol 3-kinase

INTRODUCTION

Cardioprotection can be afforded before or after ischemia by adenosine receptors activation. Activation of A_1 or A_3 adenosine receptor subtypes before the onset of sustained ischemia reduces infarct size significantly (1, 2). Intracellular signaling pathways involved in these beneficial effects have been identified to involve kinases followed by phosphorylation and activation of membrane end-effectors possibly via K_{ATP} channels (3). Activation of A_{2A} adenosine receptors is effective at doing so during reperfusion (4). A_{2A} adenosine receptor activation post-ischemia may exert beneficial effects by interfering with the deleterious events associated with neutrophil accumulation (5, 6), oxygen free radical production (6, 7) or apoptosis (4). The molecular signaling pathways involved in any post-ischemic cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation remain unknown.

Experimental evidence suggests that cell death occurring during reperfusion is due to apoptosis (8, 9). Early after the onset of reperfusion (10), apoptotic stimuli activate the caspase cascade that involves caspase-3, which cleaves substrates important to the maintenance of cellular integrity (11). Post-ischemic pharmacological interventions that reduce infarct size may thus interfere with apoptosis (4, 12). In order to determine the intracellular signaling pathways involved in the cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation, we studied two enzymes that can be modulated by stimulation of G protein-coupled receptors and involved in cell survival.

PI3K is a key signaling enzyme that modifies downstream effectors such as kinases that are involved in cell growth and protein synthesis, thus cell survival (13). Among the different downstream effectors, PKB/Akt can inhibit caspase-9, a protease crucial in the initiation of apoptosis. PKB/Akt can also phosphorylate Bad which can no longer, as a consequence, interact with Bcl-2 or Bcl-x1 allowing them to inhibit apoptosis.

The second enzyme, caspase-3, is rapidly activated during the early phase of apoptosis thereby contributing to cell death. Inhibition of caspase-3 during reperfusion

induces a significant reduction of infarct size. This suggests an important role for this enzyme in reperfusion injury (12, 14). Interestingly, it has been reported that activation of PI3K reduces caspase-3 activity (15-17). According to these findings, PI3K seems to be upstream of caspase-3 and thus may act as an important enzyme in post-ischemic cardioprotection.

The present study was conducted to determine the role of A_{2A} adenosine receptors in modulating PI3K and caspase-3 activities and thus the role of the former in cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation.

METHODS

Materials

All chemicals were obtained from Sigma (St-Louis, MO) unless specified. 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) was from Calbiochem (La Jolla, CA). Leupeptin and Microcystin LR were from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Anti-phospho-tyrosine (PY99) and secondary antibodies were from Santa-Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA). Tween 20 and [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, Canada). Dimethylsulfoxide (DMSO), Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris), sodium chloride and sodium dodecyl sulfate (SDS) were from Laboratoire MAT (Beauport, Canada). Ac-DEVD-AMC is from BD Biosciences (Toronto, Canada) Lowry protein assay reagents were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Enhanced Chemiluminescence Reagents was from Perkin Elmer (Markham, Ontario).

Experimental groups

Protocol A: New-Zealand white rabbits (Charles River Canada, Saint-Constant, Québec) weighting between 2.3 and 3.1 kg were randomly assigned to one of the four following groups (8-10 animals/group): 1) Control group receiving vehicle (DMSO), 2) Early-treated group (Early) where 2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine hydrochloride (CGS21680; A_{2A} adenosine receptor agonist) was administered five minutes before the beginning of reperfusion (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) into the marginal ear vein, 3) Late-treated group (Late) where the same agonist was administered five minutes after the beginning of reperfusion (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), and 4) Early-treated group with the A_{2A} agonist and selective PI3K inhibitor (Early + LY) where CGS21680 (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) and LY294002 (selective PI3K inhibitor; 1.66 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) were

administered simultaneously five minutes before the beginning of reperfusion. CGS21680 and LY294002 were solubilised in DMSO. Treatments were administered for 120 minutes in all groups. Dosage of the LY294002 used in the present study was determined from results obtained in a previous pilot study. Dosage of CGS21680 was chosen in accord to the protocol used by Zhao et al. (4).

Protocol B: Three groups were constituted: 1) Control group receiving vehicle (DMSO), 2) Early-treated group (Early) where CGS21680 was administered five minutes before the onset of reperfusion (0.2 µg/kg/min), 3) Late-treated group (Late) where CGS21680 was administered 5 minutes after the onset of reperfusion.

Surgery

Rabbits were handled in compliance with procedures of the Animal Care Local Committee. Ketamine/xylazine (35-50 mg/kg and 5 mg/kg i.m. respectively) was used to induce anaesthesia which was maintained with isoflurane (1.5 %). Rabbits were intubated and placed on an artificial respirator to maintain physiologic levels of blood gases. Catheters were inserted into the carotid and femoral arteries to collect blood and monitor arterial pressure. Electrodes were placed on front paws to record ECG and heart rate. A left thoracotomy was performed at the fifth intercostal space and the left anterior descending coronary artery was occluded with a silk suture. Ischemia was confirmed by ST segment alterations and cyanosis on the myocardial surface. After 30 minutes of occlusion (ischemia), the ligature was loosened and the myocardial tissue was reperfused. Reperfusion was confirmed by the disappearance of cyanosis. The suture used to occlude the artery was left in place to localize the site of occlusion and to assess infarct size later. In protocol A, the reperfusion period lasted 5 hours. In protocol B, the reperfusion period was limited to 0, 5 or 15 minutes.

Measurement of area at risk and infarct size

At the end of the reperfusion period, the heart was removed and the left anterior descending coronary artery was occluded at the same site in order to determine the area at risk (AR) with infusion of Evans Blue (0.5 %) by retrograde perfusion into aorta (protocol A and B). The heart was then placed at -70°C for five minutes and sliced in 4-5 transverse sections of two mm. Each section was incubated five minutes at 37°C in a triphenyltetrazolium chloride solution (TTC 1 %, pH 7.4) to determine the area of necrosis (protocol A only). Myocardial infarction was expressed as a percentage of necrosis (I) of the AR. Moreover, AR was expressed as a percentage of left ventricle (LV) area. Ischemic central left ventricle sections from slices 2 to 4 were dissected into two equal endocardial and epicardial portions regardless of the localization of the myocardial infarction (protocol A and B). The non-ischemic portions of the left ventricle were dissected to serve as internal control. Cardiac tissue was then subjected to snap freezing in liquid nitrogen and stored at -80°C until used.

PI3K activity

Frozen cardiac tissue samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 5 mM DTT, 1 μM microcystin LR, and 1 % Triton X-100) with a polytron homogenizer (10 second bursts at maximum speed). The homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 minutes at 4°C . The supernatant was removed, incubated for 30 minutes at 4°C , and centrifuged for 15 minutes at $10,000 \times g$ at 4°C . The protein content was then assessed using the Lowry method (Bio-Rad). Protein extracts were precipitated with anti-phosphotyrosine antibody conjugated to biotin (1:50) overnight at 4°C . The immune complex was pelleted and washed three times with lysis buffer and twice with phosphate-buffered saline buffer containing 0.1 M Na_3VO_4 . The immune pellet was then suspended in activation buffer (35 mM ATP, 0.2 mM

adenosine, 30 mM MgCl₂, 10 mg/mL L- α -phosphatidylinositol and 20 μ Ci [γ ³²P]-ATP) and incubated at room temperature for 20 minutes. The reaction was stopped with the addition of 100 μ L hydrogen chloride 1M and 200 μ L of Chloroform:Methanol (1:1). The aqueous phase was then discarded. Eighty μ L of hydrogen chloride:Methanol (1:1) were then added before discarding the aqueous phase. Twenty μ L of the organic phase containing ³²P-Phosphatidylinositol were resolved by thin layer chromatography on K6 Silica Gel plates (Whatman, Clifton, NJ) in a solvent system containing Chloroform:Methanol:ammonium hydroxide (45:35:10). Plates were exposed to film for three to five days (-80°C) prior to revelation.

Caspase-3 activity

Frozen cardiac tissue samples were lyophilised and cytosolic proteins were extracted in lysis buffer (1 % Triton X-100, 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1mM PMSF, 10 μ g/mL Leupeptin, 10 μ g/mL Pepstatin A, 10 g/mL Aprotinin). Enzymatic reactions were performed in reaction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 % CHAPS, 1 mM DTT) with 25 μ g of proteins and fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AMC (40 μ M). Reactions were incubated at 37°C for 3 hours and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M Glycine buffer. Fluorescence was quantified with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 465 nm.

Statistics

Results are expressed as mean (\pm standard error of the mean) and were evaluated using analysis of variance and covariance adapted for factorial experimental design (18). $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Hematological and hemodynamic data

All groups were similar in terms of weight, hematocrit, hemoglobin, leukocyte, and platelet number at occlusion time (Table 1). Heart rate and systolic pressure were similar between groups throughout experiments (Fig. 1A, B). These results indicated that neither CGS21680 dosage nor LY294002 exerted any significant effect on monitored hemodynamic parameters.

Infarct size

Area at risk (AR), expressed as a percentage of the total left ventricle (LV) area, was similar for all groups, representing more than 45 % of the LV area (Fig. 2B). Infarct size, expressed as a percentage of the AR (I/AR), was significantly smaller in the Early group (25.7 ± 5.3 %) when compared to Control (46.5 ± 5.3 %) and Late (38.2 ± 6.2 %) groups (Fig. 2A; $*p < 0.05$). In presence of LY294002, cardioprotection observed with the early administration of CGS21680 (Early + LY) was no longer present (43.9 ± 7.9 %). These results suggest that PI3K is involved in infarct size modulation during A_{2A} adenosine receptor activation.

Protocol A

PI3K activity

To determine A_{2A} adenosine receptor activation effects in the signaling pathways involved during post-ischemic cardioprotection, we measured PI3K activity by *in vitro* phosphorylation of L- α -phosphatidylinositol. PI3K activity was enhanced significantly within the Early group with CGS21680 (Fig. 3) when compared to Control and Late groups. Indeed, PI3K was 64.2 ± 8.3 % and 64.5 ± 10.1 % for endocardial and epicardial ischemic regions respectively (Control group values being 46.5 ± 5.3 % and 26.0 ± 5.0 %

and Late values being $38.2 \pm 6.2\%$ and $17.0 \pm 3.1\%$ for endocardial and epicardial ischemic regions respectively). In the presence of LY294002 along with CGS21680 (Early + LY), no PI3K activity was detected in ischemic or non-ischemic regions.

Caspase-3 activity

As a potential key participant in the reperfusion injury, we measured caspase-3 activity in our experimental model. After 5 hours of reperfusion, we were unable to detect any significant activity in tissues derived from the different experimental groups (data not shown).

Protocol B

Kinetics of activation of PI3K and caspase-3 early after the onset of reperfusion

To estimate the effect of CGS21680 on the different enzyme activities during the early phase of reperfusion, we sacrificed the animals after 30 minutes of ischemia followed by 0, 5 or 15 minutes of reperfusion. At the end of the ischemia period (0 minutes of reperfusion), PI3K activity measured in the area at risk was similar between Control and Early groups. However, after 5 minutes of reperfusion, ischemic regions from the Control group demonstrated a significant reduction in PI3K activity (Fig. 4). This activity remained constant in the Early group. This reduction was greater after 15 minutes mainly in the ischemic endocardium. In the Late group, PI3K activity was not significantly different from that observed in the Control group at 15 minutes of reperfusion.

At the end of the period of ischemia, caspase-3 activity was similar among groups (Fig. 5). However, 5 minutes after the onset of reperfusion, caspase-3 activity was significantly increased in ischemic regions of the Control group as compared to the Early group. This effect was maintained during the first 15 minutes of reperfusion in the endocardial ischemic region. In the epicardial ischemic region, no statistical difference was

detected. Activity observed in the Late group indicated that treatment was ineffective to reduce caspase-3 activation.

DISCUSSION

The present study demonstrates that the beneficial effects exerted by A_{2A} adenosine receptor activation on the post-ischemic myocardium are PI3K-dependent. Furthermore, in the presence of a selective PI3K inhibitor (LY294002), A_{2A} adenosine receptor activation imparted no further cardioprotection. We also observed that cardioprotective therapy via A_{2A} adenosine receptor activation inversely modulates the PI3K and caspase-3 activities. CGS21680 therapy, instituted 5 minutes after the onset of reperfusion, did not affect the PI3K and caspase-3 activities as compared to Control group, thus was unable to impart any cardioprotection. These results indicate the potential significance of these enzymes in the cardioprotective effects of A_{2A} adenosine receptor activation. The reduction of infarct size by post-ischemic A_{2A} adenosine receptor stimulation that we observed has been demonstrated by other groups in different experimental models, including pigs (19), rabbits (20-22), and dogs (4, 6, 23). We also observed that the same regimen starting 5 minutes after the onset of reperfusion is ineffective in reducing infarct size. As proposed by Horwitz et al. (24), these data indicate that the optimal timing of therapy administration depends of the pharmacokinetics, diffusibility and mechanism of action of these selective pharmacological agents.

The present study is, to our knowledge, the first to identify the PI3K signaling pathway as a key target for post-ischemic cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptors. These receptors are not unique with respect to dependence on PI3K signaling for post-ischemic cardioprotection. Indeed, it has been shown that the beneficial effect of post-infarction insulin can also be blocked via a PI3K inhibitor (25, 26), as can the effects of bradykinin (27). PI3K is involved in cell survival and limits apoptosis by modulation of

downstream target effectors such as PKB/Akt and p70^{S6} kinase. Both enzymes can phosphorylate Bad, maintaining cytosolic sequestration of this protein in its inactive form. When Bad is activated and translocated to mitochondria, it forms a heterodimer with Bcl-2 or Bcl-x1 to promote apoptosis (28). It has also been suggested that PI3K activation is beneficial to the post-ischemic myocardium by decreasing caspase-3 activity (16). Data obtained from protocol B demonstrate that caspase-3 activity in the Early group is similar to that observed in non-ischemic regions whereas caspases-3 activity in the Control group increases. Stable caspase-3 activation in Early-treated animals during early reperfusion parallels PI3K activity. In contrast, activity of both enzymes diverged in the Control group, presumably acting to promote cell death by apoptosis. Overall, the present data support a previous study indicating that A_{2A} adenosine receptor activation reduces apoptosis as evaluated by TUNEL staining and DNA fragmentation (4).

Interestingly, results obtained in the Late group indicated PI3K and caspase-3 activities are similar to Control group, in contrast to the Early group. These results suggest that coupling between A_{2A} adenosine receptors and these enzymes is not direct and involves other proteins. If indeed direct coupling occurred between receptors and these enzymes, the activity measured in both treated group (Early and Late) would have been more similar than that which we observed. Although second messenger(s) involved in modulating PI3K and caspase-3 activities remains unknown, recent studies indicate that cAMP may modulate PI3K activity (29, 30). These findings are interesting since A_{2A} adenosine receptors are positively coupled to adenylyl cyclase and thus cAMP production. Further studies are needed to confirm the role of cAMP in this beneficial effect.

Myocardial tissue was separated in two regions (endocardial and epicardial ischemic regions) because of observations demonstrating that endocardium is more sensitive to ischemia than epicardium (31). Therefore, enzyme activity differences may be more prominent in the former region when comparing treated groups to control. Our results confirm that differences occur in both regions, reflecting the relative extent of damage in

each area. However analysis of covariance did not indicate any relation between infarct size and PI3K or caspase-3 activities after 5 hours of reperfusion. In addition, we observed a significant difference in PI3K and caspase-3 activities after 5 minutes of reperfusion. According to Ganz et al. (32), 5 minutes of reperfusion are not sufficient to detect any significant progression of infarct size. These results suggest that the extent of damage plays a minor role in the PI3K and caspase-3 activities observed and that other factors, including A_{2A} adenosine receptors activation, are involved.

In the present study isoflurane was used as the anesthetic agent. It has been shown that isoflurane can reduce infarct size with a mechanism similar to preconditioning (33, 34). In our study, however, isoflurane did not reduce infarct size. This discrepancy can be explained by the fact that preconditioning induction can be achieved by stopping administration of isoflurane a few minutes before the ischemic period beginning, thereby achieving maximum cardioprotective effect; this was not the case in our study.

A_{2A} adenosine receptors are mediators of vasodilation processes and may induce hypotension. In the present study, mean arterial pressure did not differ throughout the experiment among groups. This suggests that the CGS21680 dosage used had no hypotensive effect. Similar results were also obtained by Zhao et al. (4) using the same regimen of CGS21680 treatment. On the other hand, Jordan et al. (6) observed a reduction in left ventricular peak systolic pressure with this agent. One possibility may be that isoflurane, which possess cardiopressant effects, may mask any vasodilator effects of CGS21680. It is also possible that CGS21680 may induce vasodilation when infused directly into the coronary artery (6) versus infusion into the marginal ear vein (our study) or the left atrium (4). Another possibility is that A_{2A} agonist concentration are not high enough to induce any vasodilation. Cardioprotection afforded by the A_{2A} agonist might also be due to an indirect mechanism involving circulating cells such as neutrophils as observed by others (4,6). Further *in vivo* studies are needed to determine if CGS21680, when so administered, acts directly on cardiomyocytes.

One limitation of our study is that PI3K activities were determined in tissue that has been incubated in TTC (protocol A). Results obtained from pilot studies indicate that these activities were reduced by 25 to 30 % when tissues samples were incubated in TTC. Since all ventricular tissue samples (including areas at risk) were in contact with TTC, we expressed our results in percentage terms, comparing data from ischemic to non-ischemic tissue. This provides a way to correct enzyme activity levels and thus eliminate inter-animal variability. Moreover, in protocol B different activities were measured in tissues that were not incubated in TTC. The differences observed between these groups were found to be similar to those derived in protocol A, indicating that the methods of evaluating enzyme activity in protocol A was reliable.

CONCLUSION

Our results indicated that post-ischemic cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation is PI3K-dependent and may rapidly modulate other signaling pathways such as caspase-3.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Dr Robert Élie for statistical analysis, Dr Andrew Armour, Dr Terrence Hebert, Diane Boucher and Alexandro Zarruk for critical reading of the manuscript as well as Dr Denis DeBlois and Dr Eve-Lyne Marchand for caspase-3 assay.

REFERENCES

1. Liang B. Direct preconditioning of cardiac ventricular myocytes via adenosine A₁ receptor and KATP channel. *Am J Physiol* 1996;271:H1769-77.
2. Takano H, Bolli R, Black RG, et al. A₁ or A₃ adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circ Res* 2001;88:520-8.
3. Kloner RA, Speakman MT, Przyklenk K. Ischemic preconditioning: a plea for rationally target clinical trials. *Cardiovasc Res* 2002;55:526-33.
4. Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, et al. Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:57-68.
5. Cronstein BN, Rosenstein ED, Kramer SB, et al. Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts as an A₂ receptor on human neutrophils. *J Immunol* 1985;135:1366-71.
6. Jordan J, Zhao Z, Sato H, et al. Adenosine A₂ receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:301-9.
7. Zhao ZQ, Sato H, Williams MW, et al. Adenosine A₂-receptor activation inhibits neutrophil-mediated injury to coronary endothelium. *Am J Physiol* 1996;271:H1456-64.

8. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996;79:949-56.
9. Gottlieb R, Burleson K, Kloner R, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-8.
10. Freude B, Masters TN, Robicsek F, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:197-208.
11. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
12. Huang JQ, Radinovic S, Rezaiefar P, et al. In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor after the onset of ischemia. *Eur J Pharmacol* 2000;402:139-42.
13. Toker A. Protein kinase as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharm* 2000;57:652-8.
14. Holly TA, Drincic A., Byun Y, et al. Caspase Inhibition Reduces Myocyte Cell Death Induced by Myocardial Ischemia and Reperfusion In Vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1709-15.
15. Laprise P, Chailier P, Houde M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 2002;277:8226-34.

16. Wu W, Lee WL, Wu YY, et al. Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 2000;275:40113-9.
17. Yamamori T, Inanami O, Sumimoto H, et al. Relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and small GTPase Rac for the activation of NADPH oxidase in bovine neutrophils. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;293:1571-8.
18. Winer BJ. *Statistical principles in experimental design*. New-York: McGraw-Hill, 1971.
19. Vähäsilta T, Virtanen J, Saraste A, et al. Adenosine in myocardial protection given through three windows of opportunity. An experimental study in pigs. *Scand Cardiovasc J* 2001;35:409-14.
20. Todd J, Zhao ZQ, Williams MW, et al. Intravascular adenosine at reperfusion reduces infarct size and neutrophil adherence. *Ann Thorac. Surg* 1996;62:1364-72.
21. Xu Z, Downey JM, Cohen MV. AMP579 reduces contracture and limits infarction in rabbit heart by activating adenosine A₂ receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:474-81.
22. Zhao ZQ, McGee S, Nakanishi K, et al. Receptor-mediated cardioprotective effects of endogenous adenosine are exerted primarily during reperfusion after coronary occlusion in the rabbit. *Circulation* 1993;88:709-19.

23. Budde JM, Velez DA, Zhao ZQ, et al. Comparative study of AMP579 and adenosine in inhibition of neutrophil-mediated vascular and myocardial injury during 24 h of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2000;47:294-305.
24. Horwitz LD, Kong Y, Robertson AD. Timing of treatment for myocardial reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:19-29.
25. Baines CP, Wang L, Cohen MV, et al. Myocardial protection by insulin is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase C or K_{ATP} channels in the isolated rabbit heart. *Basic Res Cardiol* 1999;94:188-98.
26. Jonassen AK, Sack MN, Mjøs OD, 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;89:1191-8.
27. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol* 2002;35:185-93.
28. Datta K, Bellacosa A, Chan TO, et al. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1996;271:30835-9.
29. Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, et al. Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol Cell Biol* 1999;19:5882-91.
30. Webster CR, Anwer MS. Role of the PI3-K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am J Physiol* 1999;277:G1165-72.

31. Downey JM. Why the endocardium? In: Hearse DJ, Yellon DM, eds. *Therapeutic approaches to myocardial infarct*. New York: Raven Press, 1984:125-38.
32. Ganz W, Watanabe I, Kanamasa K, et al. Does reperfusion extend necrosis? A study in a single territory of myocardial ischemia-half reperfused and half not reperfused. *Circulation* 1990;82:1020-33.
33. Marano G, Grigiono M, Tiburzi F, et al. Effects of isoflurane on cardiovascular system and sympathovagal balance in New Zealand white rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:513-8.
34. Müllenheim J, Ebel D, Frädord J, et al. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology* 2002;96:934-40.

TABLE

	Control	Early	Late	Early + LY
Number	10	10	10	8
Weight (Kg)	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.0	2.5 ± 0.1
Hemoglobin (g/L)	118 ± 5	119 ± 2	120 ± 2	115 ± 3
Hematocrit (%)	36 ± 1	36 ± 1	36 ± 1	34 ± 1
Leukocytes (10 ⁶ /L)	4.6 ± 0.5	5.5 ± 0.3	4.6 ± 0.4	5.9 ± 0.6
Platelets (10 ⁹ /L)	359 ± 16	356 ± 19	400 ± 26	386 ± 25

Table 1. Hematological and hemodynamic data from rabbits of the different groups

FIGURES

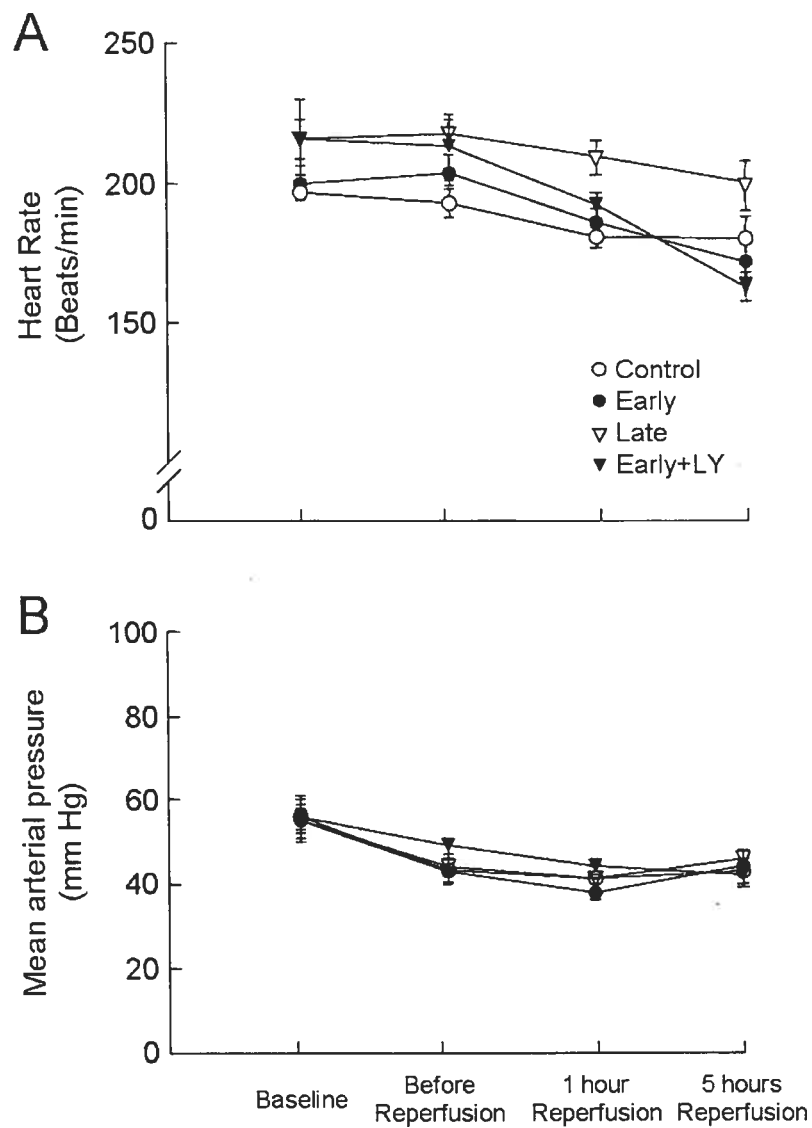


Figure 1. A) Heart rate and B) mean arterial pressure measured in the four different groups. No difference was observed between groups throughout experiments.

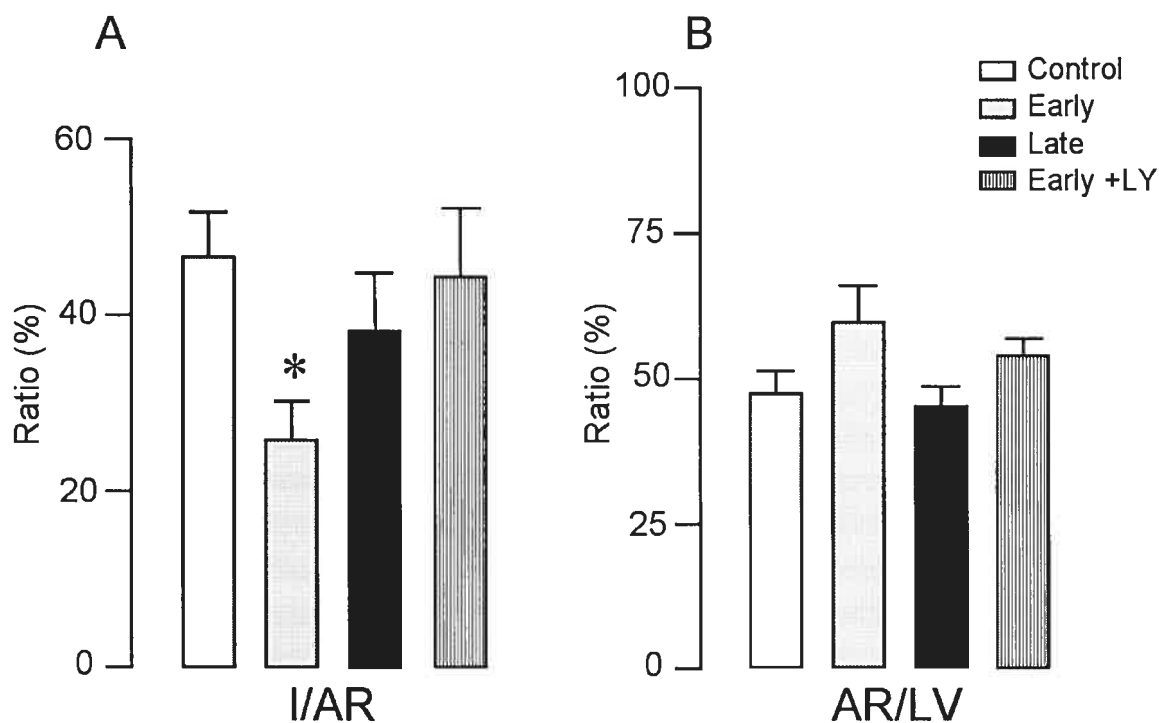


Figure 2. A) Infarct size (I) expressed as a percentage of the area at risk (AR) showed a marked reduction in the Early group as compared to the other groups (* $p < 0.05$). Addition of LY294002 (Early + LY) provokes a loss of the cardioprotective effect induced by CGS21680. B) Area at risk (AR) expressed as a percentage of the left ventricle (LV) was similar between groups.

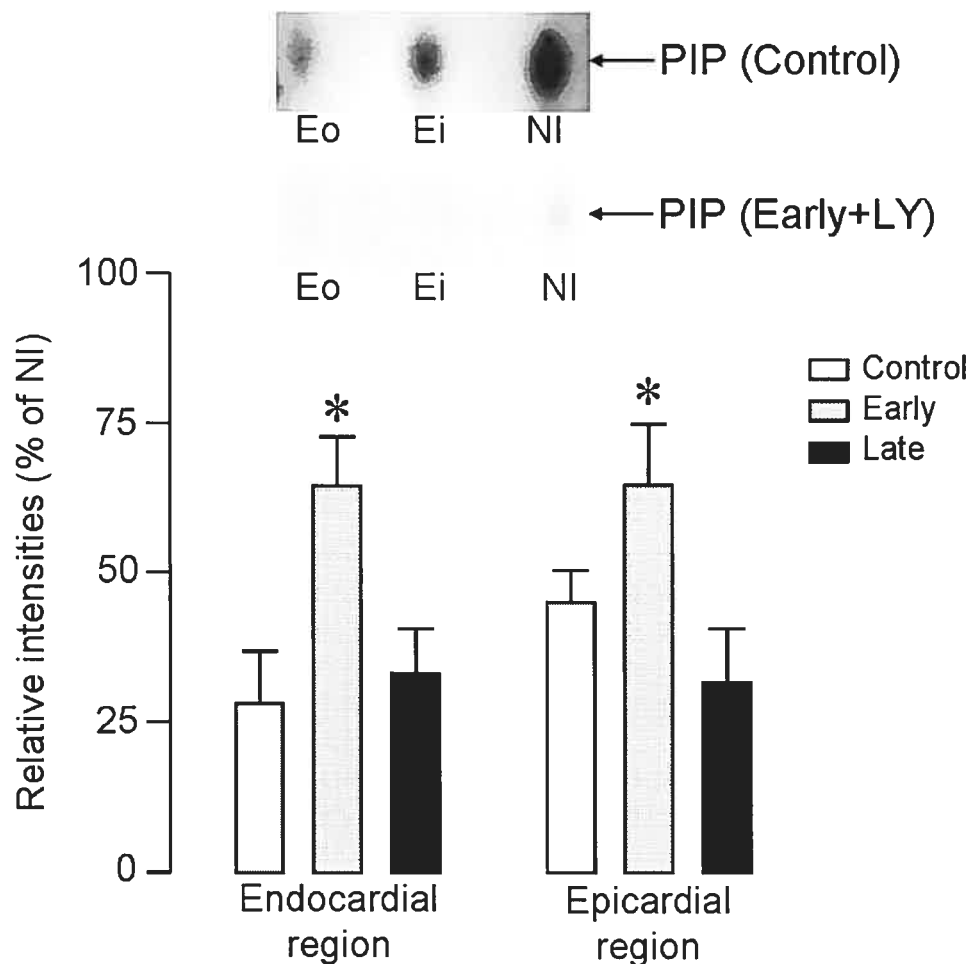


Figure 3 PI3K activity was assessed by *in vitro* phosphorylation of the L- α -phosphatidylinositol. Activity observed in the non-ischemic region was expressed as 100 % and served to normalize the activity found in the ischemic region. Significantly increased PI3K activity in both endocardial and epicardial ischemic regions was observed only in Early group when compared to the Control, Late and Early + LY groups (* $p < 0.05$). No PI3K activity was detected in the ischemic regions in the Early + LY (inset). Inset is showing typical substrate phosphorylation for the Control and Early + LY groups. Eo represents endocardial ischemic region, Ei, epicardial ischemic region and NI, non-ischemic region.

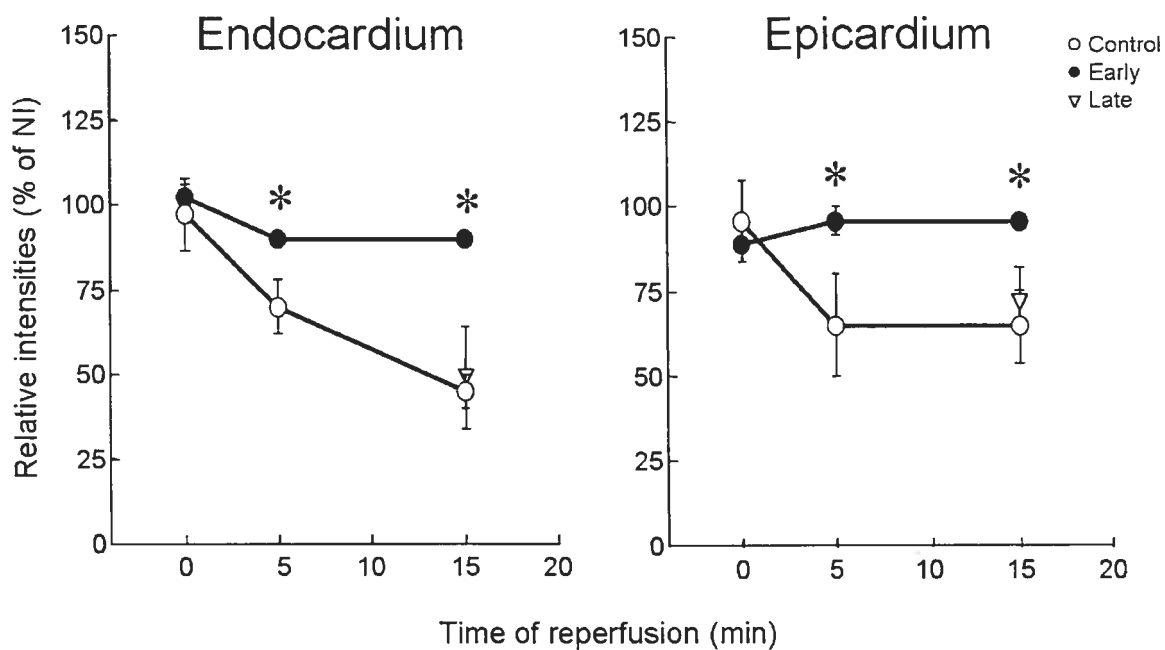


Figure 4 Kinetics of PI3K activation during the early phase of reperfusion in Control, Early and Late groups for endocardial (endocardium) and epicardial (epicardium) ischemic regions. Activity was expressed as a percentage of the activity observed in the non-ischemic (NI) region. At the end of the ischemia period (onset of reperfusion), PI3K activity was similar to the one determined in the non-ischemic region. After 5 minutes, activity was significantly increased in both endocardial and epicardial ischemic regions only in the Early group when compared to the Control group (* $p < 0.05$). No significant difference was observed between Control and the Late groups at 15 minutes of reperfusion.

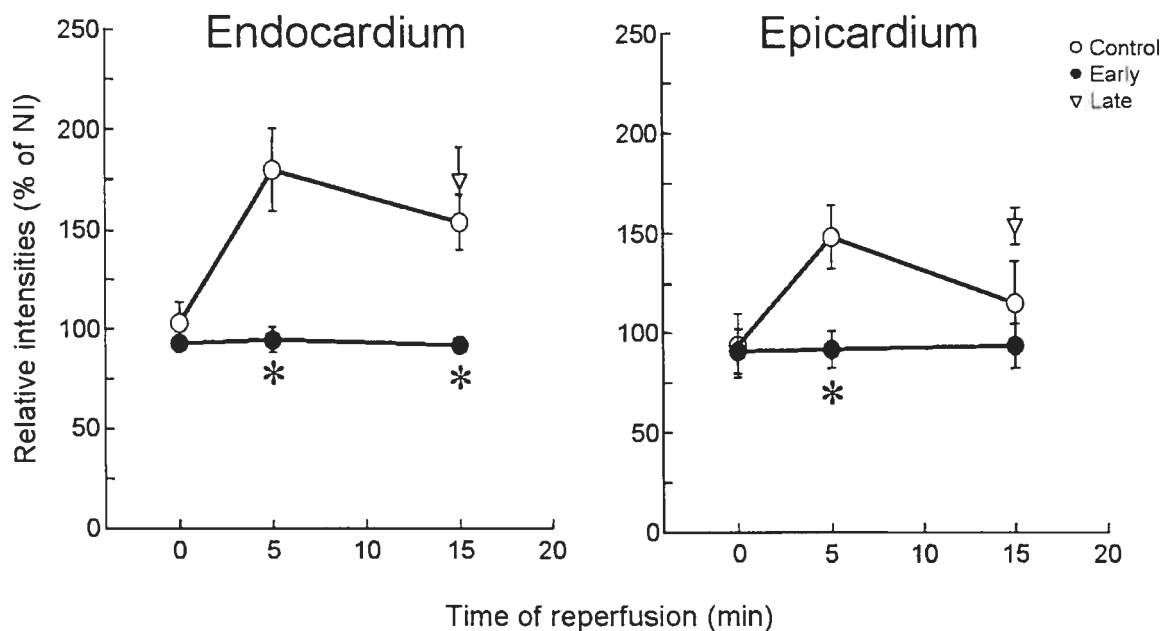


Figure 5 Kinetics of caspases-3 activation during the early phase of reperfusion in Control, Early and Late groups for endocardial (endocardium) and epicardial (epicardium) ischemic regions. Activity was expressed as a percentage of the activity observed in the non-ischemic (NI) region. At the end of the ischemia period (onset of reperfusion), caspases-3 activity was similar to the one determined in the non-ischemic region. After 5 minutes, activity was significantly decreased in both endocardial and epicardial ischemic regions only in the Early group when compared to the Control group (* $p < 0.05$). This difference tends to be limited in the epicardial region at 15 minutes of reperfusion but not in the endocardial region. Activity observed in the Late group was similar to the one observed in the Control group.

Chapitre 9

Journal of Cardiovascular Pharmacology (2005)

Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, Massé R, Schampaert É, Cardinal R, Rousseau G

Publié dans *Journal of Cardiovascular Pharmacology*

2005

Sustained cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor stimulation after 72 hours of myocardial reperfusion

Volume 45, Volume 5, Pages 439-446

Matthieu Boucher est le principal auteur de cet article (contribution la plus importante : élaboration du projet, réalisation des expériences, analyse des résultats et écriture du manuscrit)

(L'article sous sa forme publiée est en annexe)

TITLE PAGE

A) Manuscript title : Sustained cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor stimulation after 72 hours of myocardial reperfusion

B) Author names : Matthieu Boucher M.Sc.^{1,2,3}, Boubacar Pasto Wann M.Sc.^{1,3}, Sevan Kaloustian B.Sc.¹, Rachel Massé¹, Érick Schampaert M.D.¹, René Cardinal Ph.D.^{1,2,3}, Guy Rousseau Ph.D.^{1,2,3}

Affiliation of authors : ¹Centre de Biomédecine, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal; ²Département de Pharmacologie, ³Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada

C) and D) Address for correspondence and reprints : Dr. Guy Rousseau Ph.D., Centre de Biomédecine, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal (Québec), Canada, H4J 1C5, Tel.: +1-514-338-2222 ext. 3421, Fax: +1-514-338-2694

D) Footnotes : -

E) Short running title : Sustained cardioprotection by A_{2A} receptors

F) Source of support : Heart & Stroke Foundation of Québec

G) List of potential reviewers: Dr. J. Vinten-Johansen (Emory University); Dr. B.T. Liang (University of Connecticut); Dr. R. Lasley (University of Kentucky).

ABSTRACT

This study was designed to determine whether cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor stimulation can be sustained and to determine the effect of the A_{2A} adenosine receptor agonist on Akt and cAMP-Response Element Binding Protein (CREB) activation, as well as Hsp27 and Hsp70 protein expression in such events. The left anterior descending coronary artery was occluded for 40 minutes in anesthetized rats followed by 72 hours of reperfusion. A_{2A} agonist (CGS21680 at 0.2 µg/kg/min) was administered for 120 minutes, starting either 5 minutes prior to (Early) or after (Late) the beginning of reperfusion. Infarct size was reduced significantly in the Early compared to the Control group (35.2 ± 1.9% and 52.5 ± 3.4% respectively; p<0.05) whereas no difference was observed with the Late group (44.5 ± 7.1%). After 72 hours of reperfusion, drug administration was accompanied by Akt activation (Early, 121.8 ± 17.6%; Late, 118.1 ± 16.4%; p<0.05), as well as elevated Hsp27 expression (Early, 197.2 ± 27.7%; Late, 203.8 ± 36.8%; p<0.05); CREB activation and Hsp70 expression were not altered. In another set of experiments in which reperfusion was limited to 15 min, Akt was activated only in the Early group (121.8 ± 17.6%; p<0.05). Moreover, CREB was activated in both the Early and Late groups (98.4 ± 8.3% and 107.0 ± 6.5%, respectively; p<0.05) whereas Hsp27 and Hsp70 expression were not altered. These results demonstrate that A_{2A} adenosine receptor activation induces a sustained cardioprotection only if the therapy is instituted prior to reperfusion. This myocardial protection is associated by an early pro-survival Akt activation. CREB activation and Hsp27 content do not seem to be associated with cardioprotection as they are enhanced in both treated groups, suggesting indirect A_{2A} agonist and pathology related effects.

KEYWORDS: A_{2A} adenosine receptors, myocardial infarction, reperfusion, cardioprotection, Akt, CREB, heat shock protein

INTRODUCTION

Salvage of the ischemic myocardium can be achieved by early coronary reperfusion (1). On the other hand, reperfusion initiates a series of deleterious myocardial phenomena called reperfusion injury. Such events involve neutrophil and platelet accumulation (2-4), free radical generation (5), lysosomal enzyme release (6) and apoptosis of myocardial cells (7, 8). All of these factors compromise the survival of jeopardized myocardial tissue to induce cell death.

Adenosine and A_{2A} adenosine receptor agonists exert protective effects against reperfusion injury (9-23) (for reviews see (24, 25)). A_{2A} adenosine receptor stimulation during the first 2 hours of reperfusion reduces both infarct size and apoptosis (18) via mechanisms involving reduction of caspase-3 activity and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activation (22). Whether this beneficial effect is sustained or delays cell death as observed with other therapeutic agents (26, 27) remains unknown.

A_{2A} adenosine receptors are Gs protein-coupled receptors that generate cAMP and activate PKA. The cAMP-response element-binding protein (CREB) is a transcription factor activated by PKA via phosphorylation on serine 133 in response to cAMP generation (for review see (28, 29)), such as occurs during A_{2A} adenosine receptor stimulation. CREB significance in a model of post-ischemic cardioprotection is yet to be resolved but it may reduce apoptosis as observed *in vitro* with PC12 cells.

One possible mechanism explaining A_{2A} mediated myocardial protection would be that CREB activation could lead to increased expression of protective genes and proteins (30) such as Heat shock proteins (Hsp). Hsp are ubiquitously expressed proteins involved in protein chaperoning for adequate folding of other proteins (31, 32). Hsp27 and Hsp70 are two major Hsp involved in cardiac protection. Ischemia (33, 34) and reperfusion (35) can modify Hsp levels. Overexpression of Hsp70 in the intact heart (36) and overexpression of Hsp27 in isolated cardiomyocytes (37, 38) or the heart (39) confer resistance to

ischemia-reperfusion injury, thereby demonstrating a potential role of these Hsp in cardioprotective processes.

Thus, this study was designed to determine 1) if the beneficial effect of A_{2A} adenosine receptors in post-ischemic cardioprotection is sustained, and 2) the relationship between A_{2A} adenosine receptor stimulation, cardioprotection and changes in signal transduction.

METHODS

Materials

All chemicals were obtained from Sigma (St-Louis, MO) unless specified. 2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine hydrochloride (CGS21680) is from Tocris (1063; Bristol, UK). Leupeptin and Microcystin LR were from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Anti-Hsp27 (C-20; sc-1048) was from Santa-Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA). Anti-CREB (06-863) and anti-phospho-CREB (06-519) are from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-Hsp70 (Ab-3; RB-080-A0) is from Neomarkers (Fremont, CA). Anti-phospho-Akt (9271), anti-Akt (9272), and anti-rabbit antibodies (7074) are from Cell Signaling (Beverly, MA). Tween 20 was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, Canada). Dimethylsulfoxide (DMSO), Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and sodium chloride were from Laboratoire MAT (Beauport, Canada). Lowry protein assay reagents were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Enhanced chemiluminescence reagents were from Perkin Elmer (Markham, Ontario).

Experimental groups and protocols

Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, Québec), weighing between 350-450g, were handled in compliance with procedures of the Local Animal Care Committee.

Protocol A: Rats were randomly assigned to the following groups: 1) Control group receiving vehicle (DMSO), 2) Early-treated group (Early) where CGS21680 (A_{2A} adenosine receptor agonist) was administered 5 minutes *before* beginning of reperfusion (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) into the jugular vein, and 3) Late-treated group (Late) where the same treatment was instituted 5 minutes *after* the beginning of reperfusion. Treatments were administered during 120 minutes. The dosage of CGS21680 was chosen in accordance with

pilot study data and those obtained in previous studies (18, 22). Animals were sacrificed after 72 hours of reperfusion. Six to ten hearts/group were used for infarct sizing and area at risk measurements and 4 hearts/groups were rapidly frozen without infarct sizing for western blotting.

Protocol B: Rats were randomly assigned to the following groups: 1) Control group, 2) Early group, and 3) Late group. Animals were sacrificed after 15 minutes of reperfusion and treatments were administered until sacrifice. Four hearts/groups were rapidly frozen for western blotting.

In vivo surgical procedure

Anesthesia was induced with ketamine/xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg i.m., respectively) and maintained with isoflurane (1%). Animals were intubated and placed on a small animal respirator to maintain ventilation. Body temperature was monitored during surgery using rectal probe. A catheter was inserted into the jugular vein for systemic administration of pharmacological agent. A PE-50 tube connected to a pressure transducer was inserted into the right carotid to measure arterial pressure throughout surgery. Electrodes were placed on paws to record ECG and heart rate. A left thoracotomy was performed and the left anterior descending coronary artery was occluded using a 4-0 silk suture with a plastic snare. Ischemia was confirmed by ST segment alterations and ventricular epicardial cyanosis. After 40 minutes of occlusion (ischemia), the ligature was loosened and the myocardial tissue was reperfused. Reperfusion was confirmed by the disappearance of cyanosis. For protocol A, the thorax was closed after 15-30 minutes of reperfusion and, following administration of the pharmacological agent, the animals were returned to their cages. Antibiotic (15,000 IU penicillin G) and analgesic (2 mg/kg of butorphanol) therapies were instituted subsequent to surgery for all animals. For protocol B, the thorax remained open until the end of the reperfusion period (15 minutes).

Following the reperfusion period, the animals were sacrificed and their hearts were rapidly excised. For one set of experiments (protocol A), hearts were used exclusively for infarct sizing and area at risk measurements. For the other set of experiments (Protocol A and B), hearts were used for western blotting without infarct sizing and area at risk measurements.

Infarct sizing and area at risk measurement

Infarct size and area at risk were determined as described previously (22). Briefly, at the end of the reperfusion period, the heart was removed and the left anterior descending coronary artery was occluded at the same site. In order to determine the area at risk (AR), Evans Blue (0.5%) was infused into the aorta by retrograde perfusion. The heart was frozen (-80°C for 5 minutes) and then sliced in 4-5 transverse sections of two mm. Each section was stained at 37°C for 5 minutes in a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (TTC 1%, pH 7.4) to determine the area of necrosis (I). Myocardial infarction was expressed as a percentage of necrosis of the AR (I/AR). Moreover, AR was expressed as a percentage of left ventricle (LV) area (AR/LV).

Western blotting

Protein samples were prepared from snap frozen left ventricular tissue, as described previously (22). Briefly, ischemic and non-ischemic cardiac tissue samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 5 mM DTT, 1 μM microcystin LR, and 1% Triton X-100). The homogenate was incubated for 30 minutes at 4°C , and centrifuged for 15 minutes at $10,000 \times g$ at 4°C . The protein content was then assessed using the Lowry method (Bio-Rad). Aliquots of 50-150 μg of protein were subjected to 10-15% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis on a mini-gel apparatus (Bio-Rad). Transfer was performed with a Trans-

Blot SD Semi-dry transfer cell (Bio-Rad) on Protran nitrocellulose membrane (Mandel, Montréal, Québec). Protein transfer efficiency was assessed using Ponceau red S dye. Non-specific sites were blocked using 5% non-fat dry milk in TBS-T (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) and membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibody (diluted 1:1000-2500 in 5% non-fat dry milk into TBS-T). Subsequently, membranes were washed and incubated for 45 minutes at room temperature with the secondary antibody (diluted 1:5000 in 5% non-fat dry milk into TBS-T) conjugated to horseradish peroxidase. Membranes were washed and exposed on a Scientific Imaging Film (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario) or on a Kodak ImageStation 440CF using Enhanced Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario). Band intensities were analyzed using Kodak 1D v.3.5.5 Scientific Imaging Software. Appropriate controls were evaluated for phosphorylated proteins by reprobing the same membrane with the total protein antibody.

Ischemic region protein phosphorylation and expression results are expressed as a percentage of data derived from the non-ischemic region (NI). This was done in order to normalize and reduce inter-animal variability.

Statistics

Results are expressed as mean (\pm standard error of the mean). Data were evaluated using one-way analysis of variance, followed by a Bonferroni post-hoc test. Mortality rates during reperfusion were evaluated with a χ^2 statistical test. $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Physiologic and hemodynamic parameters

Body and heart weights as well as heart to body weight ratio did not differ between groups (Table 1). Heart rates and mean arterial blood pressures monitored during surgery were similar between groups (Table 2). The A_{2A} agonist did not exert any significant hemodynamic effect as mean arterial pressure and heart rate remaining stable and similar between groups. Rectal temperature was $37 \pm 0^\circ\text{C}$ during the surgical procedures.

Eight rats died during ischemia (2 rats for the Control group, 3 for the Early group, and 3 for the Late group) and ten during reperfusion (2 rats for the Control group, 4 rats for the Early group, and 4 rats for the Late group); they were excluded from this study. Mortality rates during reperfusion were similar in all groups ($\chi^2 = 1.038$; $p=0.595$).

Infarct size and area at risk

Infarct size, expressed as a percentage of the area at risk (I/AR; Fig. 1A), was significantly reduced in the Early ($35.2 \pm 1.9\%$) compared to Control group ($52.5 \pm 3.4\%$) after 72 hours of reperfusion. In the Late group, infarct size was not reduced significantly ($44.5 \pm 7.1\%$). Area at risk (AR), expressed as a percentage of the total left ventricle (LV) area and representing approximately 50% of the LV area (Fig. 1B), was similar between groups. These results demonstrate that sustained myocardial protection by A_{2A} adenosine receptor activation after 72 hours of reperfusion is afforded only if the drug administration is instituted before the beginning of reperfusion.

Protein expression

Akt

Protocol A: Akt activation was assessed by phosphorylation levels via western blotting. Results show a significant Akt phosphorylation augmentation in the presence of the agonist for the Early ($118.4 \pm 20.2\%$) and Late groups ($95.8 \pm 15.8\%$) compared to Control ($32.8 \pm 6.3\%$; Fig. 2A), whereas no differences were identified between the two former groups. Total Akt expression was similar between groups (Fig. 2B). Moreover, a significant increase in Akt activation ratio (phosphorylated levels to total content) was observed in the presence of CGS21680. Indeed, when compared to Control ($40.2 \pm 4.0\%$), this ratio was significantly elevated in Late group ($118.1 \pm 16.4\%$; Fig. 2C). Similarly, the same ratio was enhanced significantly in the Early group ($121.8 \pm 17.6\%$), with no differences compared to the Late group. Hence, Akt was significantly activated after 72 hours of reperfusion in both the Early and Late groups.

Protocol B: Phosphorylation status of Akt was enhanced significantly after 15 minutes of reperfusion in the Early group ($508.6 \pm 143.7\%$), but not in the Late group ($219.9 \pm 65.4\%$) when compared to the Control group ($80.8 \pm 25.8\%$, Fig. 3A). Similarly, phosphorylated to total protein content ratio was enhanced in the Early group ($642.0 \pm 143.8\%$), but not in the Late group ($215.3 \pm 65.5\%$) compared to Control ($112.5 \pm 31.2\%$, Fig. 3C). Total Akt protein content did not differ between groups. Therefore, Akt was significantly activated in the Early group after 15 min of reperfusion.

CREB

Protocol A: CREB activation was measured via its phosphorylation level. Neither the phosphorylation level (Control, $107.0 \pm 5.0\%$; Early, $100.2 \pm 7.7\%$; Late, $104.9 \pm 22.6\%$) nor the total content (Control, $105.1 \pm 10.9\%$; Early, $118.3 \pm 24.2\%$; Late, $109.8 \pm$

29.0%) were altered after 72 hours of reperfusion. Moreover, the ratio of the phosphorylated form on total content (Control, $104.4 \pm 6.7\%$; Early, $97.7 \pm 21.9\%$; Late, $102.4 \pm 21.4\%$) was similar between groups at 72 hours of reperfusion. Thus, CREB activation was similar between groups after 72 hours of reperfusion.

Protocol B: Pharmacological treatment with the A_{2A} agonist significantly enhanced CREB phosphorylation status (Fig. 4A) from $34.5 \pm 7.6\%$ for the Control group to $104.0 \pm 12.6\%$ for the Early and $99.6 \pm 2.8\%$ for the Late group. Total CREB content did not differ among the groups (Fig. 4B). Similarly, phosphorylated to total protein content (Fig. 4C) was significantly enhanced in both Early ($98.4 \pm 8.3\%$) and Late ($107.0 \pm 6.5\%$) groups in contrast to Control group ($38.5 \pm 9.0\%$). Hence, CREB was significantly activated in both the Early and Late groups after 15 minutes of reperfusion.

Hsp27 and Hsp70

Protocol A: Following 72 hours of reperfusion, we observed an enhanced Hsp27 protein content following A_{2A} agonist administration regardless of administration moment. Indeed, when compared to the Control group ($82.1 \pm 8.5\%$), Hsp27 content was significantly elevated in the Early ($197.2 \pm 27.7\%$) and the Late groups ($203.8 \pm 36.8\%$; Fig. 5A). No differences were observed between the latter two groups. On the other hand, the pharmacological intervention did not influence Hsp70 protein content (Fig. 5B), which was found to be similar in the different experimental groups after 72 hours of reperfusion (Control, $70.9 \pm 22.7\%$; Early, $50.4 \pm 9.2\%$; Late, $57.0 \pm 12.5\%$). Thus, Hsp27 content was enhanced in both the Early and Late groups after 72 hours of reperfusion whereas Hsp70 was not affected.

Protocol B: Hsp27 protein expression levels after 15 minutes of reperfusion did not differ between groups (Control, $31.0 \pm 4.2\%$; Early, $70.7 \pm 19.4\%$; Late, $56.4 \pm 22.8\%$). Likewise, Hsp70 protein levels were similar between groups after the same reperfusion

period (Control, $89.7 \pm 12.0\%$; Early, $100.3 \pm 29.0\%$; Late, $90.5 \pm 9.3\%$). Therefore, after 15 min of reperfusion, Hsp27 and Hsp70 protein content is not different between groups.

DISCUSSION

Infarct size reduction

The present study demonstrates that myocardial protection afforded by A_{2A} adenosine receptor stimulation initiated before the beginning of the reperfusion period is sustained after 72 hours of reperfusion. Even though therapeutic interventions can be cardioprotective with 4-6 hours of reperfusion, some of these interventions only delay cell death since infarct size is similar between experimental groups regardless of the treatment with longer periods of reperfusion. Chambers et al. (26) employing a non-steroidal anti-inflammatory flurbiprophen that inhibits cyclooxygenases, and Simpson et al. (27) using the prostacyclin analogue iloprost observed a loss of beneficial effects on infarct size with longer reperfusion periods. Our results indicate that A_{2A} adenosine receptor stimulation prior to the onset of reperfusion affords a sustained cardioprotection, rather than delaying damage emergence.

Pharmacokinetic models suggest that there is not enough compound remaining in the circulation to exert pharmacological effects after 4 to 5 half-lives since the compound is biotransformed and rapidly eliminated (40, 41). To resolve this issue in our model, we administered intravenously CGS21680 continuously over 2 hours. This compound possesses a plasma half-life of approximately 20 minutes (42, 43). The 4-5 half-life period represents approximately 3 to 4 hours of reperfusion in the present protocol. Hence, there would be no more agonist in the circulation 72 hours after the onset of reperfusion. Thus, the reduction of infarct size observed presumably was due to the effect induced by CGS21680 early in reperfusion.

Since A_{2A} adenosine receptor activation can produce vasodilation, it is possible that CGS21680 may have acted by reducing afterload during reperfusion. In the present study, we did not detect any change in hemodynamic parameters between groups. Data suggests that CGS21680 had no significant vasodilation effects in our model. Differences in experimental design for drug administration and in animal species may explain the fact that no vasodilation was observed in our protocol. Furthermore, it is interesting to note that when vasodilation is observed in cardioprotection models involving CGS21680 (19, 44), the drug impart no cardioprotective effects. Hence, the protective effect is abolished in the presence of a hemodynamic effect.

Protein expression and activation

In the present study, rapid Akt activation was only observed in the Early group after 15 minutes of reperfusion with an intermediate value for the Late group. This observation can be explained by the small, non-significant, infarct-limiting effect of A_{2A} agonist therapy instituted just after the beginning of reperfusion. This corroborates the timing hypothesis that in order to induce significant cardioprotection, therapy must be started early in reperfusion. Furthermore, pro-survival kinases have to be rapidly activated to generate such cardioprotection. We previously showed that pro-survival PI3K activation is necessary to induce significant cardioprotection (22). Data reported herein corroborate and validate this hypothesis because Akt is a downstream effector of PI3K. Akt activation leads to infarct size reduction (reviewed in (45)). Surprisingly, Akt can still be activated after 72 hours of reperfusion. Even though infarct size was not reduced in the Late group to the same extent as the Early group, Akt activation might represent the result of less cell death, reduced infarct size and A_{2A} adenosine receptor activation. The exact mechanism whereby that occurs remains unknown. Further studies are needed to resolve this issue.

The present study reports that CREB activation in the Early and Late groups was significantly enhanced after 15 minutes of reperfusion, and returning to control values after

72 hours. CREB is activated by G protein-coupled receptors producing cAMP like A_{2A} adenosine receptors. However, results suggest that CREB activation is not essential to elicit significant cardioprotection since only the Early group showed significant infarct size reduction. Nevertheless, we cannot exclude CREB effect in myocardial protection, even though it may only be minor.

Recent studies suggest that CREB can also regulate Hsp gene transcription (46). Enhanced Hsp27 expression observed in both the Early and the Late groups is in accord with that suggestion and could have played a cardioprotective role in our model as in other models (38, 39). As with CREB, Hsp27 appeared to play a minor cardioprotective role in our model since in the Late group, Hsp27 expression was enhanced without any significant modification of infarct size. In our model, Hsp27 expression increased after a certain period of time following initiation of reperfusion, something that is essential for its transcription. In this context, it is not surprising that the cardioprotective Hsp27 role was minor since it is not overexpressed before the onset of ischemia-reperfusion. Due to the effects of Hsp27 on protein folding, any increase in its expression may be beneficial on a long-term basis.

CONCLUSION

A_{2A} adenosine receptor stimulation following 40 minutes of ischemia and 72 hours of reperfusion results in sustained myocardial protection. This myocardial protection is only observed if the therapy is instituted before the onset of reperfusion. Concomitant with significant infarct size reduction, our results demonstrate that rapid Akt activation occurs after 15 minutes of reperfusion. Moreover, regardless of when the A_{2A} agonist therapy begins, Akt is still activated after 72 hours of reperfusion. On the other hand, CREB transcription factor is rapidly activated and fades after 72 hours of reperfusion. As enhancement of Hsp27 expression was observed in both the Early and Late groups, it appears that some signaling pathways modulated by the pathology and the A_{2A} agonist are

needed to increase its expression. This study demonstrated the sustained cardioprotective effect of A_{2A} adenosine receptor after 72 hours of reperfusion which is accompanied by an early Akt activation, whereas CREB activation and Hsp27 expression seems to have only a minor cardioprotective effect in that model.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Dr. Andrew Armour for critical reading of the manuscript, Diane Boucher for secretarial assistance as well as Pierre Fortier and Caroline Bouchard for their technical expertise and assistance. M.B. is a scholar of the Fond de Recherche en Santé du Québec, Heart and Stroke Foundation of Québec, and Réseau de Santé Cardiovasculaire. G.R. is a scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec. We thank the Heart & Stroke Foundation of Québec for funding.

REFERENCES

1. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, et al. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-94
2. de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, et al. Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *American Journal of Cardiovasc Pathol* 1990;3:143-53
3. Chatelain P, Latour JG, Tran D, et al. Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts : relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation* 1987;75:1083-90
4. Rousseau G, Hébert D, Libersan D, et al. Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J* 1993;125:1553-63
5. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, et al. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res* 1984;54:277-85
6. Wildenthal K. Lysosomal alterations in ischemic myocardium: result or cause of myocellular damage ? *J Mol Cell Cardiol* 1978;10:595-603
7. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-8
8. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996;79:949-56

9. Schlack W, Schäfer M, Uebing A, et al. Adenosine A₂-receptor activation at reperfusion reduces infarct size and improves myocardial wall function in dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22:89-96
10. Forman MB, Jackson EK. Adenosine therapy at reperfusion on myocardial infarct size. *Cardiovasc Res* 1997;33:497-8
11. Lozza G, Conti A, Ongini E, et al. Cardioprotective effects of adenosine A₁ and A_{2A} receptor agonists in the isolated rat heart. *Pharmacol Res* 1997;35:57-64
12. Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, et al. Adenosine A₂ receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:301-9
13. Cargnoni A, Ceconi C, Boraso A, et al. Role of A_{2A} receptor in the modulation of myocardial reperfusion damage. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:883-93
14. Xu Z, Yang XM, Cohen MV, et al. Limitation of infarct size in rabbit hearts by the novel adenosine receptor agonist AMP 579 administered at reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2339-47
15. Lasley RD, Jahania MS, Mentzer Jr. RM. Beneficial effects of adenosine A_{2a} agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium. *Am J Physiol* 2001;280:H1660-6
16. Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata A, et al. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: The Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1711-20

17. Xu Z, Downey JM, Cohen MV. AMP 579 reduces contracture and limits infarction in rabbit heart by activating adenosine A₂ receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:474-81
18. Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, et al. Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:57-68
19. Kis A, Baxter GF, Yellon DM. Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A₁/A₂ receptor agonist: role of A_{2A} receptor and Erk1/2. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003;17:415-25
20. Peart JN, Flood A, Linden J, et al. Adenosine-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;39:117-29
21. Xu Z, Downey JM, Cohen MV. Timing and duration of administration are crucial for antiinfarct effect of AMP 579 infused at reperfusion in rabbit heart. *Heart Dis* 2003;5:368-71
22. Boucher M, Pesant S, Falcao S, et al. Post-ischemic cardioprotection by A_{2A} adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43:416-22
23. Budde JM, Morris CD, Velez DA, et al. Reduction of infarct size and preservation of endothelial function by multidose intravenous adenosine during extended reperfusion. *J Surg Res* 2004;116:104-15
24. Vinten-Johansen J, Thourani VH, Ronson RS, et al. Broad-spectrum cardioprotection with adenosine. *Ann Thor Surg* 1999;68:1942-8
25. Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol* 2003;285:H1797-818

26. Chambers DE, Yellon DM, Hearse DJ, et al. Effects of flubiprofen in altering the size of myocardial infarcts in dogs: reduction or delay ? *Am J Cardiol* 1983;51:884-90
27. Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, et al. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. *Circ Res* 1988;63:1070-9
28. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 1999;68:821-61
29. Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 1997;66:807-22
30. Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in heart. *J Clin Invest* 1998;101:2415-26
31. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Gen* 1988;22:631-77
32. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res* 2001;51:637-46
33. Knowlton AA, Brecher P, Apstein CS. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. *J Clin Invest* 1991;87:139-47
34. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, et al. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:1264-72
35. Nishizawa J, Nakai A, Higashi T, et al. Reperfusion causes significant activation of heat shock transcription factor 1 in ischemic rat heart. *Circulation* 1996;94:2185-92

36. Marber MS, Mestril R, Chi SH, et al. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995;95:1446-56
37. Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, et al. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* 1997;96:4343-8
38. Vander Heide RS. Increased expression of HSP27 protects canine myocytes from simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 2002;282:H935-41
39. Hollander JM, Martin JL, Belke DD, et al. Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and a nonphosphorylatable heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in a transgenic mouse model. *Circulation* 2004;110:3544-52
40. Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology*. New York: McGraw-Hill, 2001
41. Hardman JG, Limbird LE, Molinof PB, et al. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996
42. Chovan JP, Zane PA, Grenberg GE. Automated-extraction, high-performance liquid chromatographic method and pharmacokinetics in rats of a highly A₂-selective adenosine agonist, CGS 21680. *J Chromatogr* 1992;578:77-83
43. Webb RL, Sills MA, Chovan JP, et al. CGS 21680: A potent selective adenosine A₂ receptor agonist. *Cardiovasc Drug Rev* 1992;10:26-53
44. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, et al. Intravenous pretreatment with A₁-selective analogues protects the heart against infarction. *Circulation* 1992;85:659-65
45. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448-60

46. Dawson VL, Dawson TM. Mechanisms of ischemic tolerance. In: Chan PH, (ed) *Cerebrovascular diseases 22ⁿd Princeton Conference*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002:58-71

TABLES

	Basal	At 72 hours of reperfusion
BW (g)		
Control	388.0 ± 10.3	366.4 ± 9.8
Early	384.8 ± 8.1	358.5 ± 9.9
Late	389.5 ± 7.3	367.8 ± 9.8
HW (g)		
Control		1.38 ± 0.06
Early		1.45 ± 0.06
Late		1.34 ± 0.00
HW/BW		
Control		0.0038 ± 0.0001
Early		0.0041 ± 0.0002
Late		0.0037 ± 0.0001

Table 1. Animal body and heart weights before surgery (Basal) and at the end of 72 hours of reperfusion. Parameters are similar between groups (BW, Body Weight; HW, Heart Weight; n = 10-12/group).

	Basal	Ischemia			Reperfusion			
		0 min	20 min	40 min	0 min	20 min	40 min	120 min
HR (bpm)								
Control	249 ± 7	254 ± 10	248 ± 6	234 ± 5	232 ± 4	245 ± 6	235 ± 6	238 ± 8
Early	243 ± 6	248 ± 7	250 ± 9	233 ± 6	231 ± 6	231 ± 6	243 ± 6	236 ± 8
Late	248 ± 6	251 ± 8	245 ± 7	247 ± 5	249 ± 6	248 ± 4	247 ± 3	247 ± 5
MABP (mmHg)								
Control	73.3 ± 6.0	75.0 ± 12.6	70.0 ± 6.0	70.0 ± 2.9	68.3 ± 1.7	69.0 ± 4.6	73.3 ± 4.4	72.3 ± 5.4
Early	73.3 ± 6.0	70.0 ± 7.6	65.0 ± 5.8	66.7 ± 4.4	61.0 ± 2.1	56.7 ± 7.3	53.3 ± 4.4	76.7 ± 9.3
Late	80.0 ± 0.0	81.7 ± 10.1	68.0 ± 3.8	67.3 ± 2.7	68.3 ± 6.0	64.0 ± 3.8	62.3 ± 6.7	75.7 ± 9.9

Table 2. Heart rates and mean arterial blood pressure during surgical procedures. No significant change between groups was observed in either heart rates or mean arterial blood pressures (HR, Heart Rate; MABP, Mean arterial blood pressure; bpm, beat per minute; n = 13-15/group).

FIGURES

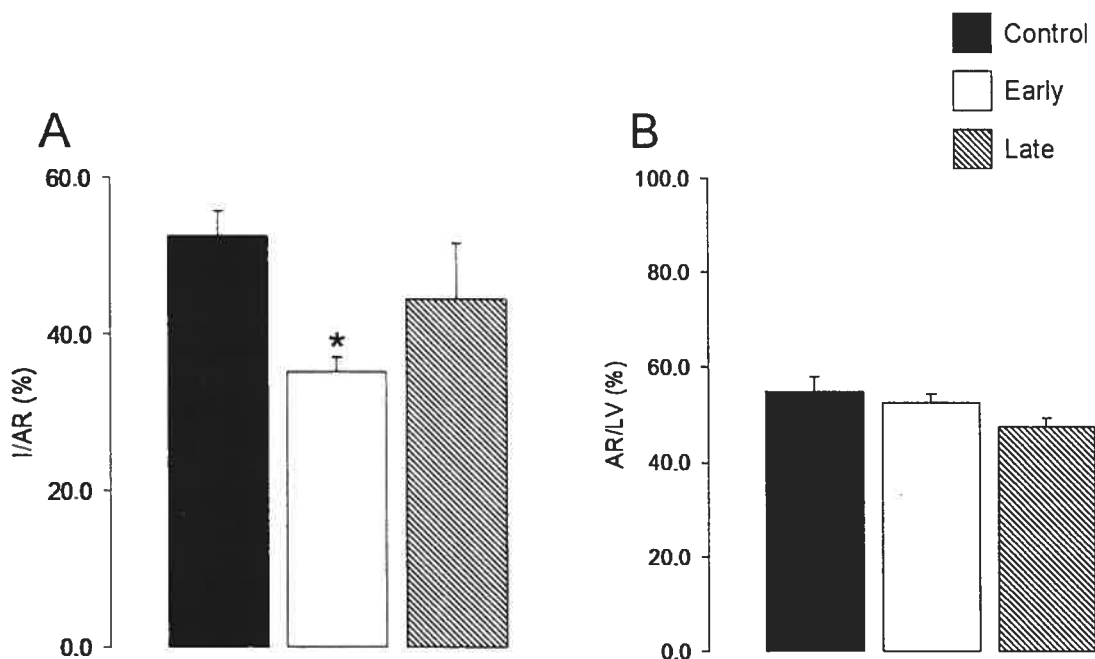


Figure 1. A) Infarct size (I) expressed as a percentage of the area at risk (AR) showed a marked reduction in the Early group as compared to Control group. However, no significant reduction was observed in the Late group. B) Area at risk (AR) expressed as a percentage of the left ventricle (LV) was similar between groups (n=6-10; *p<0.05 vs. Control group).

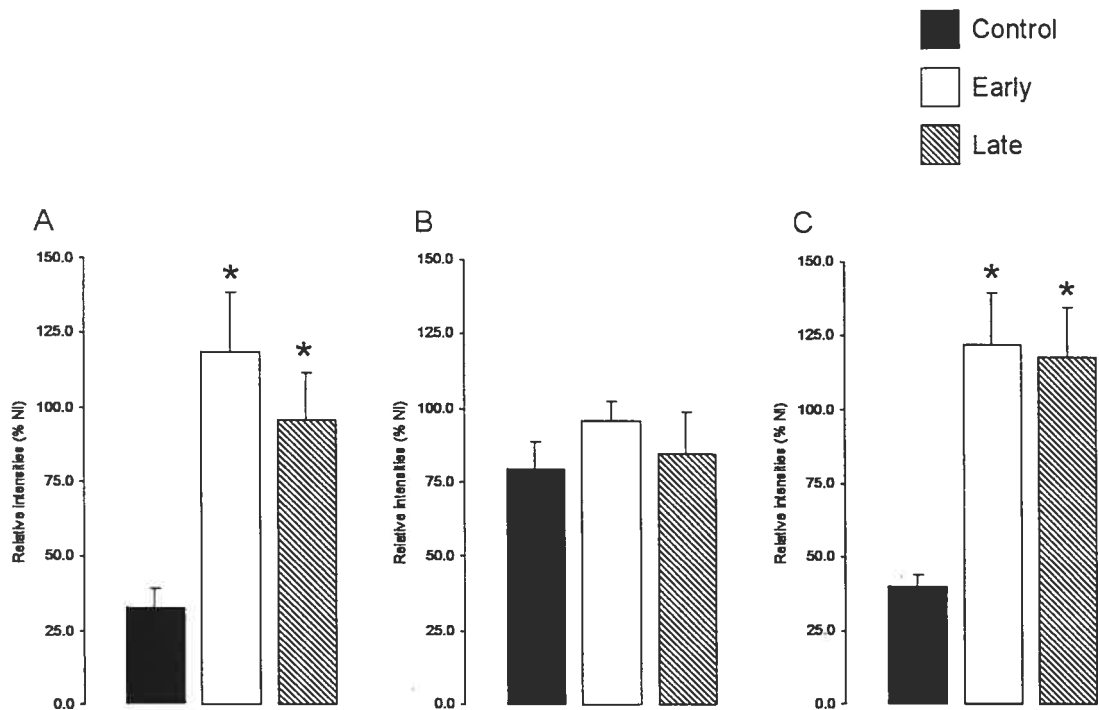


Figure 2. A) Akt phosphorylation assessed by western blotting after 72 hours of reperfusion. Phosphorylation was significantly enhanced in the Early and Late groups. B) Total Akt protein content assessed by western blotting was similar between groups. C) Phosphorylated to total protein content ratio in both Early and Late groups was significantly enhanced after 72 hours of reperfusion (n=4/group; *p<0.05 vs. Control group; NI, non-ischemic region).

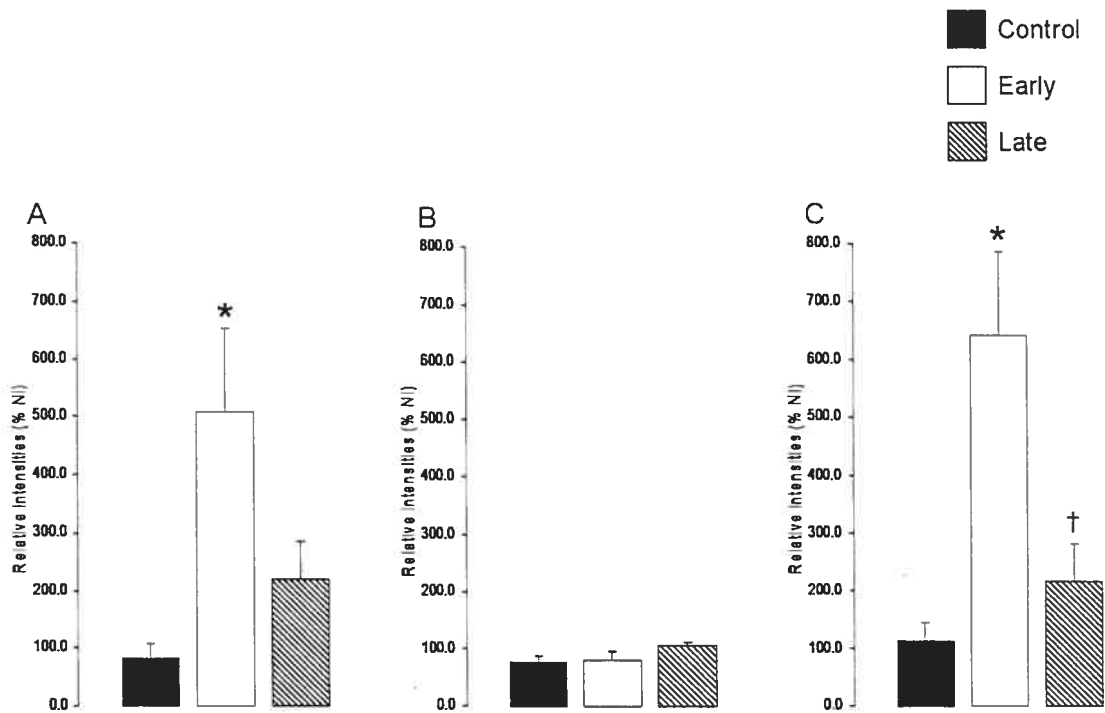


Figure 3. A) Akt phosphorylation assessed by western blotting after 15 minutes of reperfusion. Phosphorylation was significantly enhanced only in the Early group. B) Total Akt protein content assessed by western blotting was similar between groups. C) Phosphorylated to total protein content ratio only in the Early groups was significantly enhanced after 15 minutes of reperfusion (n=4/group; *p<0.05 vs. Control group, †p<0.05 vs. Early group; NI, non-ischemic region).

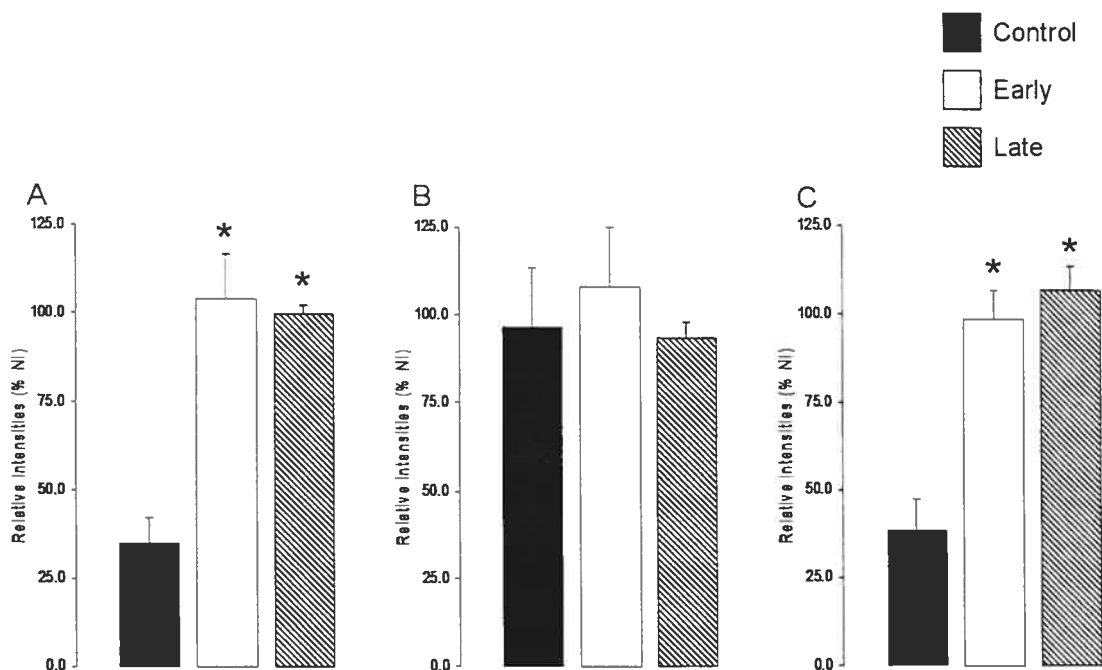


Figure 4. A) CREB phosphorylation assessed by western blotting after 15 minutes of reperfusion. Phosphorylation was significantly enhanced in both Early and Late groups. B) Total CREB content assessed by western blotting was similar between groups. C) Phosphorylated to total protein content ratio was significantly increased in the Early and Late groups (n=4/group; *p<0.05 vs. Control group; NI, non-ischemic region).

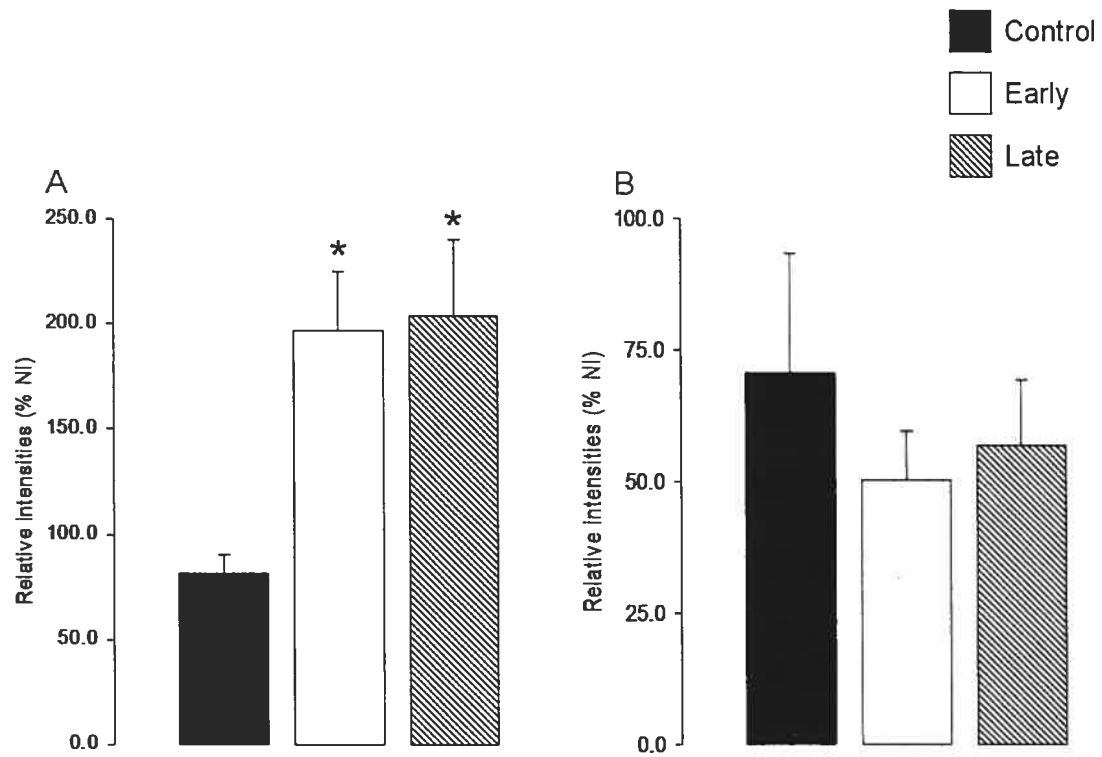


Figure 5. A) Hsp27 protein expression assessed by western blotting after 72 hours of reperfusion. Significantly increased Hsp27 expression was observed in both Early and Late groups. B) Hsp70 protein expression, assessed by western blotting after 72 hours of reperfusion, was not altered between groups (n=4/group; *p<0.05 vs. Control group; NI, non-ischemic region).

Chapitre 10

Apoptosis (2005)

Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, Cardinal R, Godbout R, Rousseau G

Soumis pour publication dans *Apoptosis*

2005

Apoptosis regression in the amygdala following A_{2A} adenosine receptor activation in a model of cardioprotection in rats

Matthieu Boucher est le principal auteur de cet article (contribution la plus importante : élaboration du projet, réalisation des expériences, analyse des résultats et écriture du manuscrit)

ABSTRACT

The presence of apoptosis was previously observed in the rat amygdala following myocardial infarction. It is known that this phenomenon can be reversed by pentoxifylline, a cytokine synthesis inhibitor. This study was designed to investigate whether the cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation during myocardial reperfusion reduces apoptosis in the amygdala. Anaesthetized rats were subjected to left anterior descending coronary artery occlusion for 40 minutes, followed by 72 hours of reperfusion. The A_{2A} agonist CGS21680 (0.2 µg/kg/min i.v.) was administered continuously for 120 minutes, starting 1) five minutes prior to instituting reperfusion (Early) or 2) five minutes after the beginning of reperfusion (Late). Infarct size was reduced significantly in the Early compared to the Control group (34.6 ± 1.8% and 52.3 ± 2.8% respectively; p<0.05); no difference was observed comparing Control and Late (40.1 ± 6.1%) groups. Concurrent to cardioprotection, apoptosis regression in the amygdala was observed in the Early group associated with enhanced phosphatidylinositol 3-kinase activity, Akt activation and Bcl-2 protein expression. There was also a reduction in caspase-3 activity and TUNEL staining. On the other hand, apoptosis was not reduced when significant cardioprotection was absent (Late). TNFα was significantly reduced in the Early group compared to the Control and Late groups. This data is indicating that cardioprotection involving A_{2A} adenosine receptors is associated with regression of apoptosis in the amygdala.

KEYWORDS: A_{2A} adenosine receptors, myocardial infarction, reperfusion, cardioprotection, amygdala, inflammation

INTRODUCTION

Sixty-five percent of patients with myocardial infarction (MI) report symptoms of depression¹ and twenty percent will develop major depressive disorders (MDD) within 18 months². Increasing evidence has established a link between depression, cardiovascular disease and mortality³.

Recent studies demonstrated that depression may result from apoptotic processes in some regions of the brain^{4,5}. Indeed, apoptosis in the amygdala, a limbic system structure member, occurs following MI⁵. Pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α (TNF α), have been demonstrated to be enhanced after MI^{6,7}. Furthermore, inhibiting their synthesis is effective in reducing apoptotic processes in the amygdala⁵.

A_{2A} adenosine receptors are G_s protein-coupled receptors. Their activation reduces myocardial infarct size to thereby impart cardioprotection⁸⁻¹¹. These receptors have been shown to reduce cell death in the infarcted myocardium by enhancing pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase activity¹⁰ and Bcl-2 protein content⁸, while at the same time decreasing pro-apoptotic Bax content⁸ and caspase-3 activity¹⁰. Furthermore, A_{2A} adenosine receptors possess anti-inflammatory properties via inhibition of neutrophil activation^{12,13}, reactive oxygen species generation^{12,13}, and reduction of TNF α synthesis and release¹⁴⁻¹⁶. Although these receptors reduce apoptosis and inflammation, it is still unknown if their activation during myocardial reperfusion reduces apoptotic cell death in the amygdala associated with MI.

Thus, this study was designed to determine whether the beneficial effects of A_{2A} adenosine receptor activation in post-ischemic cardioprotection can influence the apoptotic processes in the amygdala following myocardial ischemia-reperfusion.

MATERIALS & METHODS

Materials

All chemicals were obtained from Sigma (St-Louis, MO) unless specified. 2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine hydrochloride (CGS21680) is from Tocris (1063; Bristol, UK). Leupeptin and Microcystin LR were from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Anti-phospho-tyrosine (PY99; sc-7020), and anti-TNF α (C-20; sc-1048) were from Santa-Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA). Anti-phospho-Akt (9271), anti-Akt (9272), and secondary antibodies are from Cell Signaling (Beverly, MA). Tween 20 and [γ ³²P]-ATP was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, Canada). Dimethylsulfoxide (DMSO), Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and sodium chloride were from Laboratoire MAT (Beauport, Canada). Lowry protein assay reagents were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Enhanced chemiluminescence reagents were from Perkin Elmer (Markham, Ontario). TUNEL assay kit is from Oncogene (La Jolla, CA). Propidium iodide is from Calbiochem (537059; CA).

Experimental groups and protocols

Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, Québec), weighing between 350-450g, were handled in compliance with procedures of the Local Animal Care Committee. Rats were randomly assigned to the following groups (n=11-15/group): 1) Control group receiving vehicle (DMSO), 2) Early-treated group (Early) where CGS21680 (A_{2A} adenosine receptor agonist) was administered five minutes before the beginning of reperfusion (0.2 μ g/kg/min) into the jugular vein, and 3) Late-treated group (Late) where the same treatment was instituted five minutes after the beginning of reperfusion. Treatments were administered continuously during 120 minutes. The dosage of CGS21680 was chosen in accordance with pilot study data and those obtained in previous studies^{8, 10, 11}. Animals were sacrificed after 72 hours of reperfusion.

***In vivo* surgical procedure**

The surgical procedures were performed as described previously^{5, 11}. Anesthesia was induced with ketamine/xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg i.m., respectively) and maintained with isoflurane (1%). Animals were intubated and placed on a small animal respirator to maintain ventilation. Body temperature was monitored during surgery using rectal probe. A catheter was inserted into the jugular vein for systemic administration of pharmacological agent. Electrodes were placed on paws to record ECG and heart rate. A left thoracotomy was performed and the left anterior descending coronary artery was occluded using a 4-0 silk suture via a plastic snare. Ischemia was confirmed by ST segment alterations and ventricular epicardial cyanosis. After 40 minutes of occlusion (ischemia), the ligature was loosened thereby reperfusing myocardial tissue. Reperfusion was confirmed by the disappearance of cyanosis. The thorax was closed after 15-30 minutes of reperfusion and, following administration of the pharmacological agent, the animals were returned to their cages. Antibiotic (15,000 IU penicillin G) and analgesic (2 mg/kg of butorphanol) therapies were instituted subsequent to surgery. Following the reperfusion period, the animals were sacrificed by decapitation and their hearts were rapidly excised for infarct sizing. Brains were rapidly placed on a dish standing on crushed ice to dissect the left and right amygdala as described previously⁵. Tissues were then snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until required.

Infarct sizing and area at risk measurement

Infarct size and area at risk were determined as described previously^{5, 10, 11}. At the end of the reperfusion period, the heart was removed and the left anterior descending coronary artery was occluded at the same site. In order to determine the area at risk (AR), Evans Blue (0.5%) was infused into the aorta by retrograde perfusion. The heart was frozen (-80°C for five minutes) and then sliced in 4-5 transverse sections of two mm. Each section was stained at 37°C for five minutes in a 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride solution

(TTC 1%, pH 7.4) to determine the area of necrosis (I). Myocardial infarction was expressed as a percentage of necrosis of the AR (I/AR). Moreover, AR was expressed as a percentage of left ventricle (LV) area (AR/LV).

Protein extraction

Protein extraction was performed as described previously^{5, 10, 11}. Amygdala tissue samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM benzamide, 0.5 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 5 mM DTT, 1 μM microcystin LR, and 1% Triton X-100). The homogenate was incubated for 30 minutes at 4°C and centrifuged for 15 minutes at 10,000 \times g at 4°C. The protein content was then assessed using the Lowry method (Bio-Rad).

PI3K activity

PI3K activity was determined as described previously¹⁰ with minor modifications. Extracted proteins from amygdala tissue were precipitated with anti-phospho-tyrosine antibody conjugated to biotin (1:50) overnight at 4°C. The immune complex was pelleted and washed three times with lysis buffer and twice with phosphate-buffered saline buffer containing 0.1 M Na_3VO_4 . The immune pellet was then suspended in activation buffer (35 mM ATP, 0.2 mM adenosine, 30 mM MgCl_2 , 10 mg/mL L- α -phosphatidylinositol and 20 μCi [γ ³²P]-ATP) and incubated at room temperature for 20 minutes. The reaction was stopped with the addition of 100 μL hydrogen chloride 1M and 200 μL of chloroform:methanol (1:1). The aqueous phase was then discarded. Eighty μL of hydrogen chloride:methanol (1:1) were then added before discarding the aqueous phase. Twenty μL of the organic phase containing ³²P-Phosphatidylinositol were resolved by thin layer chromatography on K6 Silica Gel plates (Whatman, Clifton, NJ) in a solvent system containing chloroform:methanol:ammonium hydroxide (45:35:10). Plates were exposed to film for three to five days (-80°C) prior to revelation.

Western blotting

Western blotting was done as previously described^{5, 10, 11, 17}. Aliquots of 50-150 μg of extracted amygdala tissue proteins were subjected to 10-15% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis on a mini-gel apparatus (Bio-Rad). Transfer was performed with a Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell (Bio-Rad) on Protran nitrocellulose membrane (Mandel, Montréal, Québec). Protein transfer efficiency was assessed using Ponceau red S dye. Non-specific sites were blocked using 5% non-fat dry milk in TBS-T (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) and membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibody (diluted 1:1000-2500 in 5% non-fat dry milk into TBS-T). Subsequently, membranes were washed and incubated for 45 minutes at room temperature with the secondary antibody (diluted 1:5000 in 5% non-fat dry milk into TBS-T) conjugated to horseradish peroxidase. Membranes were washed and exposed on a Scientific Imaging Film (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario) or on a Kodak ImageStation 440CF using Enhanced Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario). Band intensities were analyzed using Kodak 1D v.3.6 Scientific Imaging Software. Appropriate controls were evaluated for phosphorylated proteins by reprobng the same membrane with the total protein antibody.

Caspase-3 activity

Caspase-3 activity was determined as previously described^{5, 10}. Briefly, cytosolic proteins were extracted in lysis buffer (1 % Triton X-100, 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pepstatin A, 10 g/mL Aprotinin). Enzymatic reactions were performed in reaction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0.1 % CHAPS, 1 mM DTT) with 25 μg of proteins and fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AMC (40 μM). Reactions were incubated at 37°C for 3 hours and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified with a spectrofluorometer (Photon Technology International,

Lawrenceville, NJ, USA) at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 465 nm.

Terminal dUTP Nick-End Labelling (TUNEL) staining

TUNEL staining was done as previously described⁵ in accordance with the protocol provided by the manufacturer. Cryostat sections were fixed in paraformaldehyde (4%) and rinsed. Sections were permeabilised and, after washing, the labeling reaction was performed for one hour at 37°C. The reaction was stopped and all nuclei were stained with propidium iodide (1 µM). The sample was viewed using a Leica epiillumination microscope with a filter for DAPI (330-380 nm). All sections were photographed at the same magnification (400X) using a Nikon Coolpix 995. A total of 20-25 pictures were taken for each sample and positive and total number of cells were quantified.

Statistics

Results are expressed as mean (\pm standard error of the mean). Data were evaluated using one-way analysis of variance followed by a Bonferroni post-hoc test. Mortality rates during reperfusion and TUNEL staining data were evaluated with a χ^2 statistical test. $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

1) Physiologic and hemodynamic parameters

Body and heart weights as well as heart to body weight ratio did not differ between groups throughout the experiment (Table 1). Rectal temperature was $37 \pm 0^\circ\text{C}$ during the surgical procedures.

Eleven rats died during the acute phase of ischemia (3 rats for the Control group, 4 for the Early group, and 4 for the Late group) and eleven during reperfusion (2 rats for the Control group, 5 rats for the Early group, and 4 rats for the Late group); these animals were excluded from this study. Mortality rates during reperfusion were similar in all groups ($\chi^2 = 1.254$; $p=0.534$).

2) Infarct size and area at risk

Infarct size, expressed as a percentage of the area at risk (I/AR; Fig. 1A), was significantly reduced in the Early ($34.6 \pm 1.8\%$) compared to Control group ($52.3 \pm 2.8\%$) after 72 hours of reperfusion. In the Late group, infarct size was not reduced significantly ($40.1 \pm 6.1\%$). Area at risk (AR), expressed as a percentage of the total left ventricle (LV) area, represented approximately 50% of the LV area (Fig. 1B). It was similar between groups.

3) Protein activities and expression

PI3K and Akt

PI3K activity was enhanced significantly in the Early group ($172.5 \pm 10.2\%$; Fig. 2A) compared to Control ($100.0 \pm 6.4\%$) and Late groups ($111.0 \pm 19.2\%$). No difference was observed between the Late and Control group.

Akt activation, as assessed by the ratio of the phosphorylated form compared to the total Akt protein content, was enhanced significantly in the Early group ($161.3 \pm 16.6\%$; Fig. 2B) compared to Control ($100.0 \pm 7.3\%$) and Late groups ($100.8 \pm 16.0\%$). No difference was observed between the Late and Control group. Total Akt protein levels were not different among groups (Control, $100.0 \pm 4.2\%$; Early, $105.6 \pm 9.3\%$; Late, $109.1 \pm 4.3\%$).

Bcl-2 and Bax

Anti-apoptotic Bcl-2 was enhanced significantly following myocardial reperfusion and A_{2A} adenosine receptor therapy, regardless of the moment of drug administration (Fig. 3A). Bcl-2 expression was $151.5 \pm 17.8\%$ and $177.3 \pm 14.6\%$ for the Early and Late groups respectively, while it was $100.0 \pm 9.9\%$ for the Control group. On the other hand, pro-apoptotic Bax expression (Fig. 3B) was similar among groups after 72 hours of reperfusion ($100.0 \pm 11.3\%$, Control; $102.6 \pm 10.8\%$, Early; $104.1 \pm 16.9\%$, Late).

Caspase-3

Caspase-3 activity was reduced significantly following myocardial reperfusion and A_{2A} adenosine receptor therapy, regardless of the time when the drug was administered (Fig. 4). Indeed, this activity was reduced from $100.0 \pm 4.9\%$ for the Control group to $64.2 \pm 2.6\%$ and $71.7 \pm 3.9\%$ for the Early and Late groups respectively.

TUNEL

Total and TUNEL-positive cell quantifications are presented in Table 2. The total number of cells was not statistically different among groups. No difference was observed between Control and Late groups ($\chi^2=0.12$), whereas a significantly reduced number of TUNEL-positive cells was observed in the Early group compared to Control and Late groups ($\chi^2=13.64$; $p<0.05$). A representative example of TUNEL staining in the Control group is presented in Figure 5.

TNF α

Membrane-bound TNF α was significantly lower in the Early group ($42.8 \pm 3.3\%$; Fig. 6A) compared to Control ($100.0 \pm 14.7\%$) and Late groups ($101.4 \pm 10.9\%$). No difference was observed between the Late and Control groups.

DISCUSSION

The present study demonstrates that apoptotic processes that occur in the amygdala as a consequence of MI can be reduced via A_{2A} adenosine receptor stimulation prior to reperfusion. This apoptosis regression is characterized by reduction in caspase-3 activity, TUNEL staining, and TNF α synthesis while at the same time pro-survival PI3K activity, Akt activation, and Bcl-2 protein content become enhanced. Such a reduction in death-to-survival ratio shifts the equilibrium in favor of cell survival and leads to apoptosis regression in such cells.

Stimulation of A_{2A} adenosine receptors has multiple beneficial effects in the course of myocardial infarction, in particular during the reperfusion period^{10,11}. In this study we confirm that the administration of CGS21680 before reperfusion begins can reduce infarct size and apoptosis in the amygdala (Early group). However, similar administration starting after the onset of reperfusion (Late group) induces little effect on infarct size or the presence of apoptosis in the amygdala.

The discrepancy between the Early and Late groups might be explained by the fact that the drug administration was started before the beginning of reperfusion in the former whereas after the beginning of reperfusion in the latter. Myocardial reperfusion induces a massive pro-inflammatory response¹⁸. Since only the Early group demonstrates a significant infarct size reduction, such therapy could reduce this rapid inflammation response. Besides, in the Late group such therapy would decrease infarct size to a minor extent because the therapy was instituted after the initiation of reperfusion.

Adenosine reduces inflammation¹⁹. The A_{2A} adenosine receptor subtype has been demonstrated to mediate these anti-inflammatory properties^{12, 16, 20}. Indeed, receptor activation reduces pro-inflammatory TNF α production in diverse models^{14, 15}. TNF α induces apoptosis via either the TNF α receptor 1 (TNFR1) or the Fas receptor²¹. These receptors are linked to intracellular proteins possessing death domains, TNF receptor-associated death domain (TRADD) and Fas-associated death domain (FADD). TRADD and FADD do not exhibit any kinase activity that could potentially transduce the death signal. They interact with Receptor-Interacting Protein, a protein kinase initiating communication between cytosol and nucleus, thereby activating endonuclease, and destroying DNA integrity. Moreover, TNFR1 leads to caspase (endogenous cysteine-proteases) activation leading to loss of cell integrity via protein cleavage²². Initiator caspases (caspase-8) are stimulated by FADD interactions and lead to effector caspase (caspase-3) activation and apoptosis. Interestingly, although A_{2A} adenosine receptors were activated in the Late group, TNF α content was not reduced in the amygdala, suggesting that the signal is triggered before the action of receptor and may have only little effects on its synthesis. Because we observed a reduction in TNF α production in our model and because TNF α synthesis inhibition limits apoptotic processes in the amygdala⁵, the rapid inflammation reduction at reperfusion initiation could represent a suitable explanation.

In the amygdala, balance between pro- and anti-apoptotic processes is shifted toward cell survival in the Early group. These results confirm previous results obtained in another study⁵. In our study anti-apoptotic Bcl-2 is increased in both treated groups. Bcl-2 interacts with pro-apoptotic counter partners like Bax to inhibit apoptotic processes and cell death²³. Equilibrium shift from Bcl-2 to Bax leads to apoptosis. In a myocardial infarction model, Zhao et al.⁸ have shown that A_{2A} adenosine receptor stimulation during reperfusion results in infarct reduction concurrent with reduced apoptotic cell death and enhanced Bcl-2 expression at the infarct borders. Elevation in Bcl-2 expression via A_{2A} adenosine receptor stimulation could be related to activation of Akt and CREB stimulation as observed by Mehrhof et al.²⁴. CREB transcription factor (reviewed in^{25, 26}) has been demonstrated to be

a regulatory target and a substrate of Akt^{27, 28}. Furthermore, the increased expression of Bcl-2 with Akt stimulation is eliminated in the presence of a CREB dominant-negative mutant expression. A_{2A} adenosine receptor stimulation leads to CREB activation in PC12 cells²⁹ and in the rat heart following MI¹¹. A_{2A} adenosine receptor stimulation could lead to enhanced CREB stimulation and thereby result in Bcl-2 gene transcription and protein expression. Moreover, A_{2A} adenosine receptors can reduce myocardial apoptosis in the infarction border zone alongside enhanced Bcl-2 expression⁸. Since Bcl-2 expression was enhanced in the amygdala in both the Early and Late groups following 72 hours of reperfusion, we hypothesize that Bcl-2 protein expression would be a result of the A_{2A} receptor activation.

The PI3K-Akt signalling pathway has been demonstrated to be anti-apoptotic^{30, 31}. Its activation in the amygdala of the Early group would potentially lead to cell survival and apoptosis regression. On the other hand, caspase-3 activation results in pro-apoptotic processes. A reduction in such activation in the Early and Late groups could be explained by the fact that Bcl-2 protein expression was enhanced in both groups. Still, it is possible that a shift of the death-to-survival ratio towards survival is observed only in the Early group, explaining at least in part the discrepancy between the Early and Late groups.

A_{2A} adenosine receptors are widely expressed in the brain striatum, while limited expression has been demonstrated in the amygdala (reviewed in³²). Whether apoptosis regression is mediated by directly activating A_{2A} adenosine receptors in the amygdala or adjacent cells or is mediated by an indirect effect (inflammation reduction) remains unknown. Further studies are needed to resolve this issue.

CONCLUSION

Concurrently to the cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor stimulation just prior to reperfusion, we observed apoptosis regression in the amygdala. Indeed, we observed enhanced pro-survival PI3K activity and Akt activation as well as Bcl-2 protein expression whereas caspases-3 activity and TUNEL staining were reduced, demonstrating

this apoptosis regression. Simultaneously, we showed that TNF α was reduced. On the other hand, A_{2A} adenosine receptor stimulation just after the beginning of myocardial reperfusion, where no cardioprotection is observed, did not result in apoptosis regression. Apoptosis regression could be the result of reduced inflammation, as observed by TNF α diminution.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Dr. Andrew Armour and Diane Boucher for manuscript assistance, Pierre Fortier and Caroline Bouchard for technical assistance. M.B. is a scholar of the Fond de Recherche en Santé du Québec, Heart and Stroke Foundation of Québec, and Réseau de Santé Cardiovasculaire. G.R. is a scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec. We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for funding.

REFERENCES

1. Guck TP, Kavan MG, Elsasser GN, Barone EJ. Assessment and treatment of depression following myocardial infarction. *Am Fam Physician* 2001; 64: 641-8.
2. Frasure-Smith N, Lespérance F. Depression and other psychological risks following myocardial infarction. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 627-36.
3. Musselman DL, Evans DL, Nemeroff CB. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55: 580-92.
4. Lucassen PJ, Fuchs E, Czéh B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 789-96.
5. Wann BP, Boucher M, Kaloustian S, et al. Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in rats is prevented by pentoxifylline. *Biol Psychiatry* 2005: In Press.
6. Pudil R, Pidrman V, Krejsek J, et al. Cytokines and adhesion molecules in the course of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1999; 280: 127-34.
7. Deten A, Zimmer HG. Heart function and cytokine expression is similar in mice and rats after myocardial infarction but differences occurs in TNF α expression. *Pflugers Arch* 2002; 445: 289-96.
8. Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, et al. Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 57-68.
9. Lasley RD, Jahania MS, Mentzer Jr. RM. Beneficial effects of adenosine A_{2a} agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium. *Am J Physiol* 2001; 280: H1660-H6.
10. Boucher M, Pesant S, Falcao S, et al. Post-ischemic cardioprotection by A_{2A} adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 416-22.

11. Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, et al. Sustained cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor stimulation after 72 hours of myocardial reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 439-46.
12. Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, Taft S, Vinten-Johansen J. Adenosine A₂ receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 301-9.
13. Sullivan GW, Rieger JM, Scheld WM, Macdonald TL, Linden J. Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A_{2A} receptor agonists. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1017-26.
14. Haskó G, Kuhel DG, Chen JF, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A_{2a} receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J* 2000; 14: 2065-74.
15. Mayne M, Fotheringham J, Yan HJ, et al. Adenosine A_{2A} receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol* 2001; 49: 727-35.
16. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414: 916-20.
17. Boucher M, Nim S, de Montigny C, Rousseau G. Alterations of β -adrenoceptor responsiveness in post-ischemic myocardium after 72 hours of reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2004; 495: 185-91.
18. Fox KAA, Saffitz JE, Corr PB. Pathophysiology of myocardial reperfusion. *Cardiol Clin* 1987; 5: 31-48.
19. Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994; 76: 5-13.

20. Schlack W, Schäfer M, Uebing A, et al. Adenosine A₂-receptor activation at reperfusion reduces infarct size and improves myocardial wall function in dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 89-96.
21. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis Signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217-45.
22. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
23. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-6.
24. Mehrhof FB, Müller FU, Bergmann MW, et al. In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation* 2001; 104: 2088-94.
25. Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 807-22.
26. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 821-61.
27. Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 1998; 273: 32377-9.
28. Pugazhenti S, Nesterova A, Sable C, et al. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 2000; 275: 10761-6.
29. Cheng HC, Shih HM, Chern Y. Essential role of cAMP-response element-binding protein activation by A_{2A} adenosine receptors in rescuing the nerve growth factor-induced neurite outgrowth impaired by blockage of the MAPK cascade. *J Biol Chem* 2002; 277: 33930-42.

30. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13: 2905-27.
31. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003; 22: 8983-98.
32. Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. *Prog Neurobiol* 1999; 59: 355-96.

TABLES

	Basal	At 72 hours of reperfusion
BW (g)		
Control	390.7 ± 8.7	366.5 ± 8.2
Early	382.3 ± 7.2	358.0 ± 8.5
Late	383.6 ± 4.8	361.2 ± 7.9
HW (g)		
Control		1.40 ± 0.05
Early		1.43 ± 0.05
Late		1.33 ± 0.03
HW/BW		
Control		0.0038 ± 0.0001
Early		0.0040 ± 0.0001
Late		0.0037 ± 0.0001

Table 1. Animal body and heart weights before surgery (Basal) and at the end of 72 hours of reperfusion. Parameters are similar between groups (BW, Body Weight; HW, Heart Weight; n=11-14/group).

Groups	Total	Positive	%
Control	2510	33	1.31
Early	2152	7*	0.33
Late	2892	35	1.21

Table 2. Total and TUNEL-positive cell quantifications in the amygdala. There is no statistical difference in total number of cells between groups. TUNEL-positive cells are similar between Control and Late groups whereas significantly reduced in the Early group compared to Control and Late groups (n=4/group; *p<0.05 vs. Control group; Total, total number of cells; Positive, TUNEL-positive number of cells; %, percentage of TUNEL-positive to total number of cells).

FIGURES

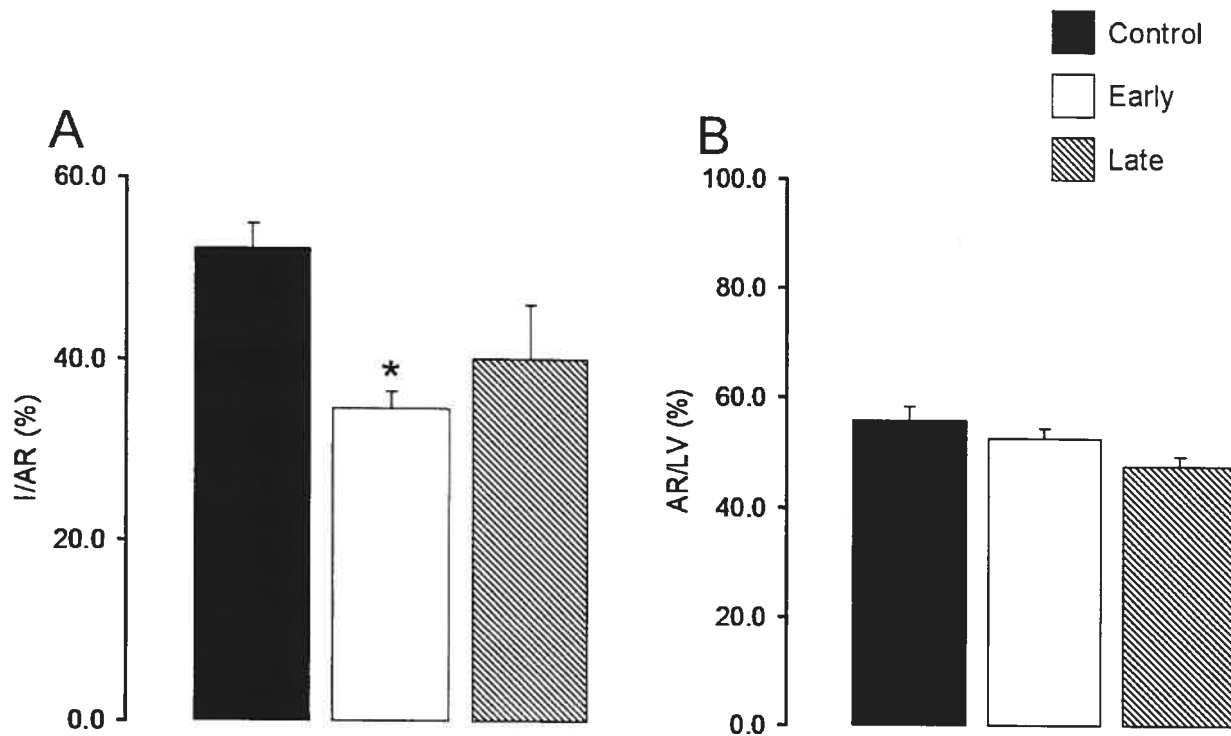


Figure 1. A) Infarct size (I) expressed as a percentage of the area at risk (AR) showed a marked reduction in the Early group as compared to Control group. However, no significant reduction was observed in the Late group. B) Area at risk (AR) expressed as a percentage of the left ventricle (LV) was similar between groups (n=6-10; *p<0.05 vs. Control group).

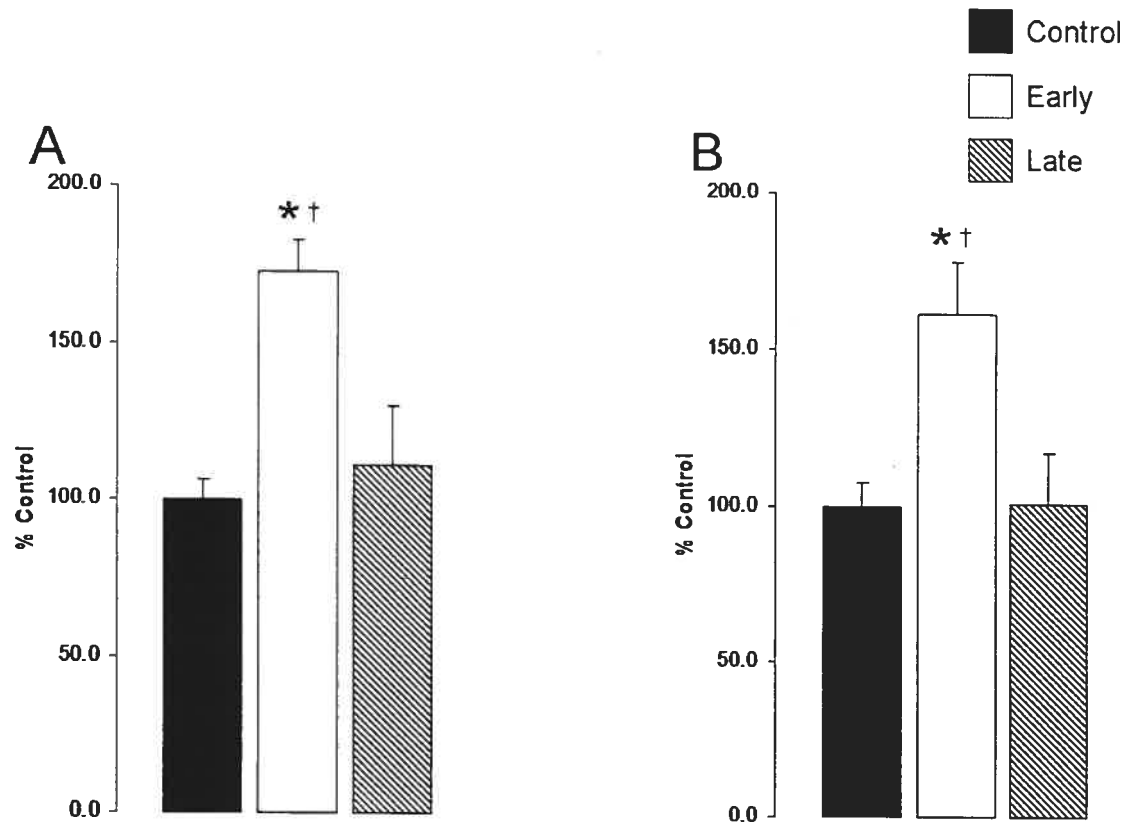


Figure 2. A) PI3K activity in the amygdala assessed by *in vitro* phosphorylation of L- α -phosphatidylinositol. Activity was enhanced significantly in the Early group compared to Control and Late groups, whereas no difference between Late and Control groups was detected. B) Akt activation in the amygdala assessed by western blotting as a ratio of phosphorylated form on total form of the protein. Activation was enhanced significantly in the Early group compared to Control and Late groups, whereas no difference between Late and Control groups was detected (n=7-8/group; *p<0.05 vs. Control group, †p<0.05 vs. Late group).

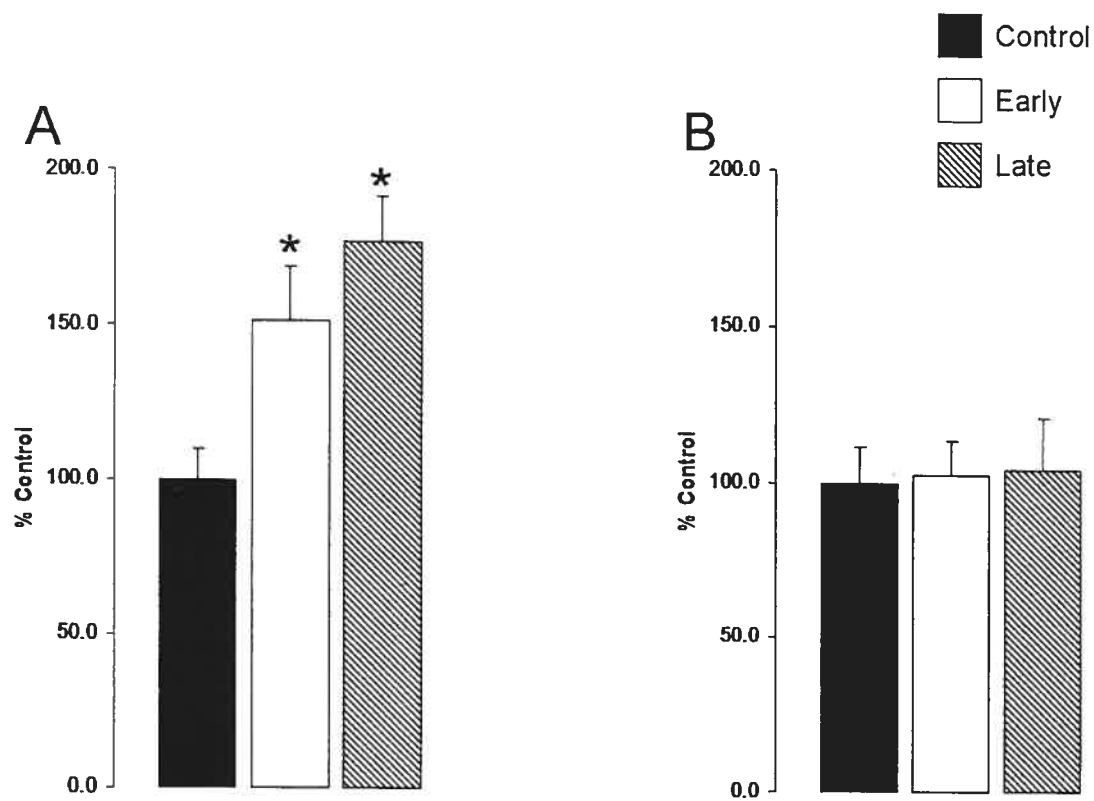


Figure 3. A) Bcl-2 protein expression in the amygdala assessed by western blotting. Expression was enhanced significantly in the Early and Late groups compared to Control. B) Bax protein expression in the amygdala was similar between groups (n=6-12/group; *p<0.05 vs. Control group).

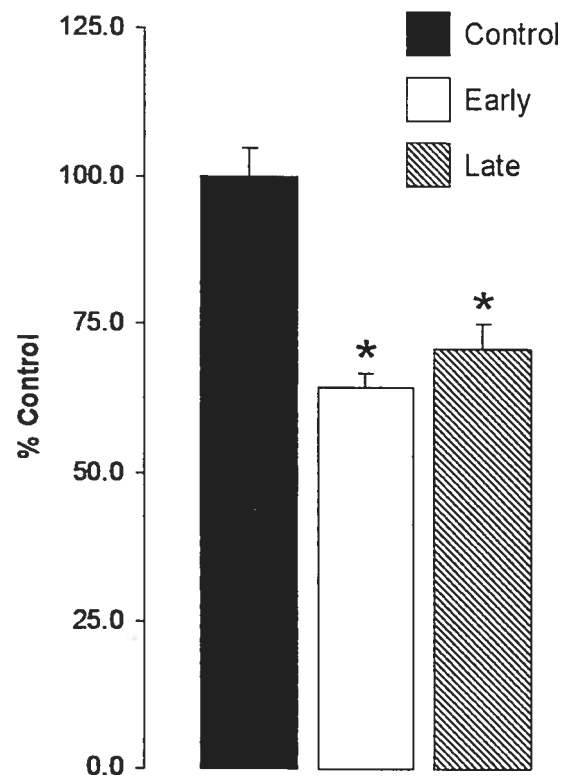


Figure 4. Caspase-3 activity in the amygdala assessed by *in vitro* spectrofluorescence. Activity was reduced significantly in the Early and Late groups compared to Control (n=8/group; *p<0.05 vs. Control group).

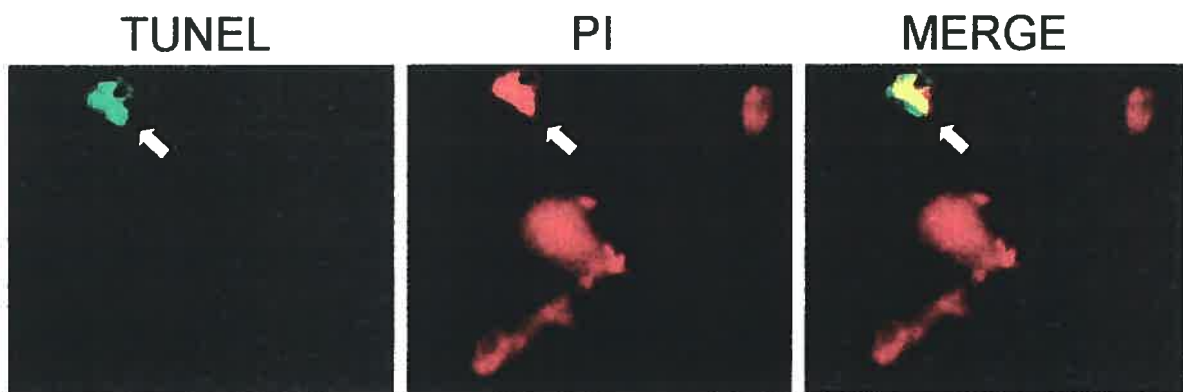


Figure 5. Example of TUNEL staining in the amygdala. TUNEL-positive cells are stained in green (TUNEL) while all nuclei are stained in red with propidium iodide (PI). Image merging (MERGE) shows colocalization of TUNEL-positive cells and nuclei (Yellow) (n=4/group; 20-25 random field photos/animal).

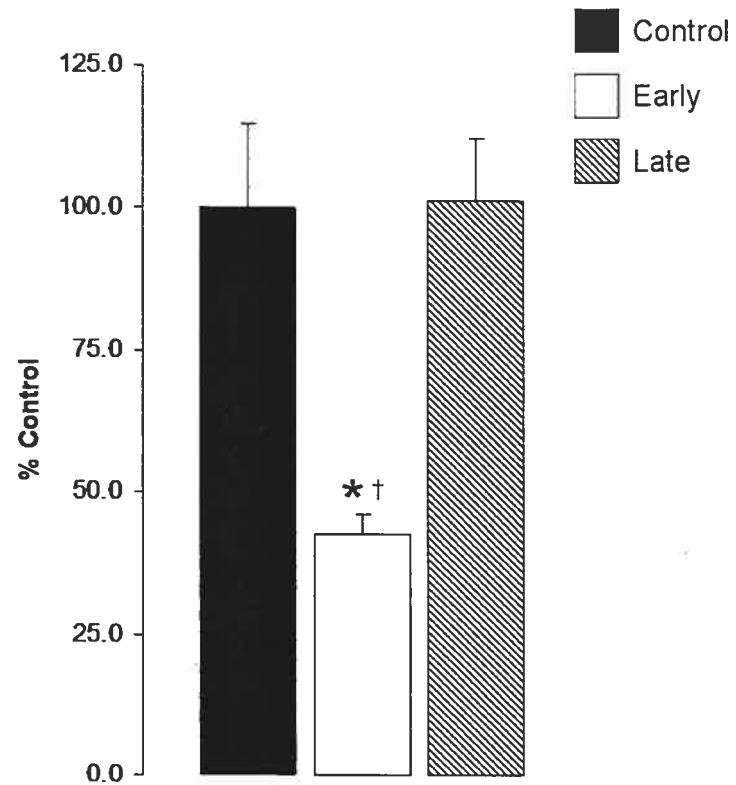


Figure 6. Membrane-bound TNF α expression in the amygdala assessed by western blotting. Expression was reduced significantly in the Early group compared to the Control and Late groups, whereas no difference was observed between Control and Late groups. (n=4-8/group; *p<0.05 vs. Control group, †p<0.05 vs. Late group).

Chapitre 11

Discussion

11.1 Modèles expérimentaux

Le choix du lapin et du rat comme modèles expérimentaux *in vivo* d'infarctus du myocarde reperfusé a été effectué pour les raisons suivantes. La conservation de la composante *in vivo* du modèle était la considération première étant donné les effets cardioprotecteurs via l'inhibition des neutrophiles et des plaquettes sanguines engendrés par l'agoniste A_{2A} . Cette composante *in vivo* n'est pas présente dans des modèles de cellules isolées (*in vitro*) ou de cœurs isolés (*ex vivo*). De plus, les modèles *in vivo* rendent possible l'étude de différents facteurs physiques (fréquence cardiaque, pression artérielle, etc.) ou biologiques (stimulation des nerfs ou des cellules inflammatoires, etc.) ne se retrouvant pas dans un modèle *in vitro*.

Parmi les différentes espèces animales utilisées pour l'étude de l'infarctus du myocarde, le lapin et le rat ont été choisis. Contrairement au chien, la variabilité de la taille de l'infarctus chez ces animaux est beaucoup moins importante et ce, étant donné l'absence de circulation collatérale. Cette dernière est une covariable importante dans l'infarctus du myocarde. De plus, l'infarctus du myocarde provoqué chez le chien ressemble davantage à l'infarctus que l'on retrouve chez l'humain âgé avec maladie coronarienne. Les modèles de porc, de lapin ou de rat représentent quant à eux davantage l'infarctus du myocarde observé chez le jeune humain sans maladie coronarienne. Par ailleurs, comme les rats ou les lapins proviennent de la même lignée, la variation inter-animale est plus faible que chez le porc ou le chien. La quantité de matériel biologique disponible après sacrifice de l'animal a également été considérée dans le choix du modèle. Le cœur de lapin est plus gros que celui de rat. Ainsi, dans la première partie des travaux (Boucher, 2004), l'utilisation du lapin a rendu possible la différenciation de l'endocarde et de l'épicarde de la région ischémique. Cette différenciation aurait été réalisable au niveau du cœur de rat mais des études biochimiques avec ce tissu auraient été plus difficiles. La quantité de tissu aurait été

insuffisante pour effectuer les immunodétections. Ainsi, dans la deuxième partie des travaux avec le cœur de rat (Boucher, 2005b), nous avons choisi de ne pas différencier les régions endocardique et épicaudique pour ainsi pouvoir y déterminer l'expression et l'activation des différentes protéines. Afin de palier à ce problème, il aurait été possible d'augmenter le nombre d'animaux dans chacun des groupes. La différenciation de l'endocarde de l'épicarde ischémique aurait ainsi été possible.

La durée de l'occlusion a été déterminée par des résultats préliminaires obtenus lors d'études pilotes. La durée de l'occlusion devait engendrer un infarctus d'une étendue suffisante pour être significative sans toutefois être transmural. En générant un infarctus transmural, le nombre de cellules pouvant être sauvées par la reperfusion et l'application d'un traitement pharmacologique efficace est trop petit. En contraste, un infarctus d'une étendue très limitée ne permettrait pas de protéger un nombre suffisant de cellules pour induire une diminution significative de sa taille.

La durée de la reperfusion a également été déterminée de la même façon. Il a été observé dans un modèle de lapin, qu'entre la troisième et la sixième heure de reperfusion, l'infarctus progresse. Ainsi, une période de reperfusion trop courte (trois heures ou moins) n'engendre pas l'observation d'un effet significatif lors de l'administration d'un agent pharmacologique, étant donné que celui-ci n'a pas eu suffisamment de temps pour exercer son plein potentiel. La période de reperfusion dans la première partie des travaux (Boucher, 2004) était donc de cinq heures, une période suffisamment longue pour démontrer l'effet cardioprotecteur de l'agent pharmacologique. Par ailleurs, même si certaines interventions peuvent protéger le cœur lors d'une période de reperfusion de quatre à six heures, plusieurs d'entre elles ne font que retarder l'apparition de la mort cellulaire. En allongeant la période de reperfusion (24 à 72 heures), l'infarctus est similaire entre les groupes traités ou non. Nous avons de ce fait choisi une période de reperfusion suffisamment longue pour la deuxième partie des travaux (Boucher, 2005b) afin d'être

certaines que notre intervention pharmacologique engendrait une cardioprotection soutenue (« permanente ») et non pas un retard dans l'apparition des dommages au myocarde.

Le modèle expérimental utilisé pour l'étude de l'infarctus du myocarde a ainsi été choisi compte tenu de toutes ces considérations. Des périodes d'ischémie de trente minutes chez le lapin et quarante minutes chez le rat ont été choisies. De plus, nous avons choisi une période de reperfusion de cinq et 72 heures pour, respectivement, les première (Chapitre 8, (Boucher, 2004)) et deuxième (Chapitre 9, (Boucher, 2005b)) parties des travaux en fonction des arguments énumérés précédemment.

Pour la troisième partie des travaux (Chapitre 10, (Boucher, 2005a)), nous avons utilisé le modèle expérimental de rat utilisé par Wann et coll. (Wann, 2005a) ainsi que lors de la deuxième partie (Chapitre 9, (Boucher, 2005b)). Wann et coll. (Wann, 2005a; Wann, 2005b) ont développé un modèle de dépression post-infarctus et ont démontré la présence d'apoptose dans l'amygdale, une structure impliquée dans ces phénomènes. Nous avons donc utilisé le même modèle expérimental afin de déterminer le potentiel de notre agent pharmacologique à réduire l'apoptose au niveau de l'amygdale en situation post-infarctus du myocarde.

11.2 Protection pharmacologique du coeur : réduction de la taille de l'infarctus

11.2.1 Cardioprotection aiguë

La stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine quelques minutes avant le début de la période de reperfusion réduit l'étendue des dommages induits par une ischémie myocardique. Zhao et coll. (Zhao, 2001a) ont montré dans un modèle canin que l'administration du CGS21680 à 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$, débutant cinq minutes avant l'initiation de la reperfusion et se poursuivant durant 120 minutes, provoquait une diminution significative de la taille de l'infarctus d'environ 40 %. Des résultats similaires ont été

observés dans notre modèle d'infarctus du myocarde reperfusé chez le lapin. En effet, l'administration du CGS21680 cinq minutes avant l'initiation de la période de reperfusion et se poursuivant également pendant 120 minutes (groupe Précoce; Early) a réduit significativement la taille de l'infarctus. Aucune cardioprotection significative n'a cependant été observée lorsque les récepteurs A_{2A} de l'adénosine sont stimulés cinq minutes suivant l'initiation de la reperfusion (groupe Tardif ou Late). Cette administration différentielle dans le temps (la dose et le temps d'administration demeurant les mêmes) a permis de prouver que la cardioprotection n'est pas induite par le simple fait d'administrer l'agoniste. Ces observations stipulent que l'administration de l'agoniste A_{2A} doit s'effectuer avant ou juste au moment de la reperfusion pour engendrer une protection myocardique significative.

La différence au niveau de la cardioprotection engendrée par les deux traitements pourrait être reliée aux concentrations sanguines circulantes. Il est possible que, dans le groupe traité de façon tardive (Late), la concentration d'agoniste circulante n'atteigne pas un niveau seuil critique pour induire une cardioprotection. Au contraire, la concentration seuil étant atteinte dans le groupe traité de façon Précoce (Early), la protection significative du tissu myocardique est présente. Afin de déterminer si une concentration supérieure d'agoniste A_{2A} est nécessaire pour engendrer une protection lorsque la reperfusion est déjà débutée, une nouvelle série d'expériences au cours de laquelle un groupe expérimental recevrait l'agoniste en bolus (contenant une plus grande quantité de CGS21680) devrait être effectuée. Ces expériences augmenteraient les taux circulants de l'agoniste plus rapidement lors de l'administration suivant l'initiation de la reperfusion et pourrait provoquer une protection du myocarde.

En parallèle, l'administration simultanée d'un antagoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine et du CGS21680 (agoniste A_{2A}) a permis de démontrer l'effet cardioprotecteur de ces récepteurs dans notre modèle d'ischémie-reperfusion (Boucher et coll., communications personnelles). Le ZM241385, un antagoniste sélectif des récepteurs A_{2A}

de l'adénosine (chapitre 3, section 3.2.2), a engendré une perte de l'effet cardioprotecteur du CGS21680 lorsque ces deux composés sont administrés simultanément cinq minutes avant l'initiation de la période de reperfusion. La taille de l'infarctus était similaire entre le groupe témoin et le groupe avec administration simultanée du CGS21680 et du ZM241385. Ces résultats démontrent donc l'effet cardioprotecteur des récepteurs A_{2A} de l'adénosine.

11.2.2 Cardioprotection soutenue

La première partie des travaux (Boucher, 2004) ne permettait pas de déterminer si la cardioprotection observée à cinq heures de reperfusion était soutenue (« permanente »). L'administration de certains agents pharmacologiques quelques minutes avant la reperfusion peut entraîner une protection myocardique soutenue. En effet, Rousseau et coll. (Rousseau, 1993b) ont démontré que l'administration du clentiazem (bloqueur des canaux calciques) cinq minutes avant l'initiation de la reperfusion protège le tissu myocardique (diminution de la taille de l'infarctus) à six heures de reperfusion chez tous les chiens des groupes traités. De plus, le même groupe a observé que cette protection était présente à 72 heures de reperfusion si les animaux possédaient une circulation collatérale au-dessus de 0,02 ml/min/g. Des résultats similaires ont été observés avec l'énoxaparine, une héparine à faible poids moléculaire (Rousseau et coll., communications personnelles). En contraste, Chambers et coll. (Chambers, 1983) en utilisant un anti-inflammatoire non-stéroïdien, le flubiprophène, et Simpson et coll. (Simpson, 1988) en utilisant un analogue de la prostacycline, l'iloprost, ont démontré une perte de l'effet cardioprotecteur à 24 heures malgré sa présence à six heures de reperfusion. Certains agents pharmacologiques peuvent donc diminuer la taille de l'infarctus de façon soutenue et d'autres ne font que retarder l'apparition des dommages.

Le prolongement de la période de reperfusion a démontré l'effet protecteur soutenu induit par les récepteur A_{2A} de l'adénosine lors de la reperfusion myocardique (Boucher, 2005b). L'infarctus du myocarde est donc passé de 52.5 ± 3.4 % au niveau du groupe

témoin à 35.2 ± 1.9 % lors de l'administration du CGS21680 de façon Précoce (Early). Similairement à la première partie des travaux (Boucher, 2004), la taille de l'infarctus du groupe traité tardivement (Late) n'est pas significativement réduite ($44.5 \pm 7.1\%$). Ainsi, l'administration de l'agoniste A_{2A} doit s'effectuer juste avant ou lors de la reperfusion myocardique afin d'exercer un effet protecteur soutenue (« permanent »).

Nos résultats contrastent avec ceux de Budde et coll. (Budde, 2004) qui rapportent une réduction de la taille de l'infarctus avec une seule administration d'adénosine après six heures mais dénotent une perte de cet effet à 24 heures de reperfusion. La différence entre notre modèle et le leur est principalement due à la demi-vie extrêmement limitée de l'adénosine dans le plasma sanguin (<10-60 secondes). L'adénosine est donc rapidement éliminée de la circulation sanguine. Les modèles pharmacocinétiques suggèrent qu'il ne reste pas suffisamment de composé dans un système *in vivo* pour y exercer un effet pharmacologique suivant quatre à cinq demi-vies, le composé étant biotransformé et éliminé (Hardman, 1996; Katzung, 2001). L'adénosine doit donc être présente en quantité suffisante lors de la reperfusion pour réduire efficacement la taille de l'infarctus. D'ailleurs, le même groupe a démontré, avec administration de multiples doses d'adénosine (Budde, 2004) ou d'un agoniste A_1/A_{2A} , l'AMP579 (Budde, 2000), qu'il est possible de réduire l'étendue de l'infarctus de façon soutenue à 24 heures de reperfusion. Dans notre modèle, nous avons choisi une molécule possédant une demi-vie plasmatique plus longue afin de ne pas administrer plusieurs doses. En effet, le CGS21680 possède une demi-vie plasmatique d'environ 20 minutes (Chovan, 1992; Webb, 1992). De plus, nous administrons le composé de façon continue sur deux heures. La période de quatre à cinq demi-vies correspond donc à plus de trois à cinq heures de reperfusion. En regard à ceci, le composé pharmacologique est complètement éliminé de la circulation sanguine à la fin de la période de reperfusion et la réduction de la taille de l'infarctus observé à 72 heures de reperfusion est, en conséquence, le résultat de l'effet du CGS21680 en début de reperfusion.

11.2.3 Dosage pharmacologique et fenêtre thérapeutique

Aucune dose de charge (« loading dose ») n'a été utilisée. Même si la concentration maximale plasmatique de CGS21680 n'est pas atteinte lors de l'initiation de la période de reperfusion, la taille de l'infarctus est malgré tout réduite en fin de cette reperfusion. Ces observations suggèrent que l'agoniste A_{2A} module certains phénomènes au tout début de la reperfusion, entraînant une cardioprotection et ultimement une réduction de la taille de l'infarctus. Nous n'excluons cependant pas le fait qu'administrer une dose de charge par bolus au niveau du groupe tardif (Late) aurait pu engendrer une cardioprotection significative. D'autres travaux permettront d'en apprendre davantage sur ce point.

Xu et coll. (Xu, 2001) n'observent pas de cardioprotection avec le CGS21680. La différence de modèle et de dose utilisés pourrait expliquer cette observation. Ce groupe utilise un modèle d'ischémie-reperfusion dans un système de cœur isolé (Langendorff) n'incluant pas les composantes sanguines circulantes importantes dans la progression d'un infarctus du myocarde. De plus, la concentration de CGS21680 utilisée (50 nM) était insuffisante pour générer une protection. D'autres groupes comme Lozza et coll. (Lozza, 1997) et Cargnoni et coll. (Cargnoni, 1999) ont démontré en utilisant un modèle similaire qu'il était nécessaire d'utiliser une concentration au moins dix fois supérieure à celle utilisée par Xu et coll. (Xu, 2001) pour provoquer une cardioprotection significative. Ces résultats indiquent qu'une quantité (ou concentration) minimale est nécessaire lors de l'initiation de la reperfusion pour observer une protection myocardique.

En plus de la dose, le moment et la durée d'administration lors de la reperfusion sont deux variables très importantes, comme montré pour d'autres composés pharmacologiques (Xu, 2003; Lipšic, 2004). L'administration de l'agoniste A_{2A} avant l'initiation de la période de reperfusion (Early) génère une cardioprotection significative (Boucher, 2004; Boucher, 2005b). En contraste, si la même administration débute après l'initiation de la reperfusion, aucune protection myocardique significative n'est observée

(malgré une diminution de la taille de l'infarctus plus modique; Late). Le moment de l'administration est donc d'une importance capitale dans la génération de la cardioprotection. Il est important de respecter une « fenêtre thérapeutique » limitée dans le temps à la fin de l'ischémie et au tout début de la reperfusion (chapitre 5, section 5.1.2). Si l'administration du composé est effectuée à l'intérieur de cette fenêtre, la cardioprotection sera observée.

11.2.4 Autres effets

Il est intéressant de noter que la présence d'une vasodilatation dans des modèles d'ischémie-reperfusion et administration d'un composé pharmacologique avec propriétés cardioprotectrices semble provoquer la perte de cet effet protecteur. Par exemple, il a été démontré que la stimulation des récepteurs de l'adénosine n'engendrait aucune protection myocardique lorsque la pression artérielle était réduite (Thornton, 1992; Kis, 2003). La cardioprotection semble être abolie en présence d'un effet hémodynamique.

En parallèle, la réduction de la charge cardiaque durant la reperfusion s'avère sans effet sur le myocarde (aucune cardioprotection) (Van Winkle, 1990). De plus, il a été clairement démontré que la réduction du travail cardiaque et de la demande métabolique ne sont pas les principales variables responsables de la réduction de la taille d'un infarctus (Reimer, 1985). Étant donné que l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine peut produire une vasodilatation, il serait possible de postuler que le CGS21680 puisse réduire la post-charge durant la reperfusion. Dans notre modèle, aucune différence dans les paramètres hémodynamiques n'a été détectée entre les groupes expérimentaux tout au long de la chirurgie, suggérant que le CGS2180 n'a pas produit de vasodilatation. Les différences dans le design expérimental, dans la méthode utilisée, dans l'administration du composé et dans l'espèce animale pourraient expliquer qu'aucune vasodilatation n'est observée en comparaison à d'autres (Thornton, 1992; Kis, 2003). Nos observations laissent croire qu'il est peu probable que l'effet cardioprotecteur du CGS21680 soit dû

principalement à la réduction de la post-charge cardiaque par une vasodilatation et une hypotension artérielle ainsi que par la diminution de la demande cardiaque.

11.2.5 Possibilité d'une cardioprotection post-ischémique clinique

D'un point de vue clinique, cette protection n'est pas banale étant donné qu'un traitement tangible contre l'infarctus du myocarde requiert des interventions où l'administration de composés pharmacologiques s'effectue en situations post-ischémiques et en début de reperfusion (interventions post-ischémiques). Le respect de la fenêtre thérapeutique et des différents facteurs influençant la taille de l'infarctus en situation post-ischémique (chapitre 5, section 5.1.2) sont d'une importance capitale dans l'effort de réduction de la taille d'un infarctus du myocarde. Par ailleurs, il est crucial que cette protection soit soutenue (Hearse, 1984). La taille de l'infarctus doit donc être réduite de façon soutenue (« permanente ») chez un patient, l'intervention étant inutile si l'infarctus progresse avec une plus longue période de reperfusion. Ainsi, notre intervention pharmacologique par stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine s'est avérée efficace à réduire la taille de l'infarctus de façon soutenue. Cette thérapie pourrait être efficace chez l'humain lorsque utilisée conjointement avec une approche de reperfusion. Certainement, des évidences cliniques sont nécessaires avant de généraliser cette thérapie pharmacologique.

11.2.6 Signalisation

11.2.6.1 *PI3K et Akt*

L'administration d'un agoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine module l'activité de la PI3K en l'augmentant et en provoquant un effet cardioprotecteur via la survie cellulaire lors de l'ischémie-reperfusion (Boucher, 2004). L'implication de la PI3K dans les phénomènes de survie cellulaire a été démontrée auparavant. L'activation de la PI3K entraîne la stimulation de la protéine sérine/thréonine kinase Akt. L'activation de cette

dernière permet la phosphorylation de divers substrats à l'intérieur de la cellule, comme Bad et la caspase-3 (Datta, 1997; Datta, 1999; Kuwahara, 2000; Wu, 2000), ainsi que sa survie. Il a été démontré que l'activation du récepteur au IGF-1, stimulant lui-même la PI3K, provoque une protection contre la mort cellulaire par apoptose (Buerke, 1995; Wang, 1998). Il a également été observé que la surexpression d'IGF-1 et l'activation de la PI3K dans un modèle murin d'infarctus du myocarde réduit la mort cellulaire et limite la dilatation ventriculaire, la charge myocardique et l'hypertrophie cardiaque (Li, 1997). Ces observations démontrent donc le potentiel cardioprotecteur de la PI3K. Aucune étude à ce jour n'a par contre démontré l'implication de la PI3K durant la reperfusion myocardique lors de la stimulation de récepteurs A_{2A} de l'adénosine. Nos résultats suggèrent que la stimulation de ces récepteurs avant le début de la reperfusion engendre l'initiation d'une cardioprotection significative et, également, de l'activation de la kinase protectrice PI3K (Boucher, 2004). Cependant, les mêmes résultats ne permettent pas l'identification de l'isoforme de la PI3K impliquée dans cette protection post-ischémique à cinq heures de reperfusion. L'identification de la ou des isoformes responsables serait possible avec l'utilisation d'anticorps spécifiques.

L'inhibition de la voie impliquant la PI3K avec l'aide d'agents pharmacologiques a permis l'étude de ses effets cardioprotecteurs. L'administration simultanée d'un inhibiteur de la PI3K (LY294002) et de l'agoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine (CGS21680) a engendré une perte de l'effet protecteur (Boucher, 2004). La taille de l'infarctus est passée $25,7 \pm 5,3$ % pour le groupe traité précocement avec l'agoniste A_{2A} seul (Early) à $43,9 \pm 7,9$ % pour le groupe traité précocement simultanément avec l'agoniste et A_{2A} l'inhibiteur de la PI3K (Early + LY). Ces observations démontrent ainsi l'implication de la PI3K dans notre modèle et la dépendance de la cardioprotection sur cette kinase de survie cellulaire.

La PI3K est rapidement activée lors de la réintroduction du sang dans l'artère. Après seulement cinq minutes de reperfusion, son activation est constatée dans le myocarde

ischémique, cette dernière étant toujours active à 15 minutes (Boucher, 2004). L'activation de la PI3K provoque donc rapidement la phosphorylation d'Akt. Cette dernière est l'effecteur direct de la PI3K (Datta, 1996). Il a été proposé que ces deux protéines étaient impliquées dans la génération d'une cardioprotection (Hausenloy, 2004). En effet, ces protéines sont membres de la famille RISK et auraient un effet bénéfique lors de la reperfusion myocardique en favorisant la survie cellulaire et en limitant les lésions de reperfusion. Cette observation est en accord avec les résultats décrits plus hauts, à savoir que l'activation de la PI3K et d'Akt favorise la survie cellulaire pour ultimement réduire la taille de l'infarctus.

En regard de ces observations, la protéine Akt est aussi nécessaire à l'observation d'une protection myocardique dans notre modèle. Son activation a seulement été observée au niveau du groupe traité précocement avec le CGS21680 (Early) après seulement 15 minutes de reperfusion, passant d'environ 80 % pour le groupe témoin à environ 509 % pour le groupe Précoce (Early) (Boucher, 2005b). Le rôle protecteur d'Akt a été proposé précédemment par d'autres groupes. En effet, dans un modèle de cardiomyocytes isolés, Fujio et coll. (Fujio, 2000) ont montré l'importance de cette protéine dans la survie des cellules contre une privation de sérum en réduisant la mort des cellules. De plus, ils ont observé que l'infection de ces mêmes cardiomyocytes par un adénovirus contenant le gène d'Akt de type sauvage ou constitutivement actif provoquait une réduction de la mort cellulaire. Par ailleurs, l'injection de la forme active d'Akt dans la paroi ventriculaire a conféré une résistance à l'ischémie-reperfusion *in vivo* lors de l'occlusion coronarienne, la taille de l'infarctus étant significativement réduite (Fujio, 2000). Un autre groupe a démontré une diminution de l'étendue de l'infarctus du myocarde semblable. Miao et coll. (Miao, 2000), suite à l'injection intra-coronarienne et à l'occlusion de l'artère antérieure descendante gauche, ont montré que la présence de cette forme d'Akt réduisait significativement la taille de l'infarctus. Matsui et coll. (Matsui, 2001) ont quant à eux également observé une diminution de la taille de l'infarctus du myocarde suite à l'injection intra-myocardique de la même forme constitutivement active d'Akt.

Il est intéressant de noter que l'indice d'activation d'Akt (ratio de sa forme phosphorylée sur la forme totale) est toujours significativement augmenté à 72 heures de reperfusion. Cette activation est constatée dans les deux groupes traités, peu importe le moment de l'initiation du traitement pharmacologique lors du début de la reperfusion. La taille de l'infarctus dans le groupe tardif (Late; $44,5 \pm 7,1\%$) n'a pas été réduite significativement et avec la même ampleur qu'en comparaison au groupe Précoce (Early; $35,2 \pm 1,9\%$). Cependant, l'activation d'Akt suite à 72 heures de reperfusion pourrait tout de même traduire une diminution de la mort cellulaire, une taille de l'infarctus réduite ainsi qu'une activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine. D'autres travaux sont cependant nécessaires pour expliquer cette observation.

Par les résultats obtenus durant ces travaux, il n'est pas possible de déterminer si les récepteurs A_{2A} de l'adénosine modulent directement l'activité de la PI3K ou d'Akt. En effet, l'activation de ces protéines pourrait être modulée indirectement via certains effecteurs des récepteurs A_{2A} de l'adénosine. Différentes composantes cellulaires pourraient agir comme intermédiaires entre les récepteurs, la PI3K et Akt. Par exemple, dans le cas des récepteurs A_{2A} possédant l'adénylate cyclase comme effecteur (génération d'AMPc), il est possible que la PKA soit impliquée. Les protéines $G_{\beta\gamma}$ pourraient constituer d'autres intermédiaires entre les récepteurs et leur cible intracellulaire. Davantage de travaux via l'utilisation d'activateurs ou de bloqueurs pharmacologiques permettront de déterminer si le couplage des récepteurs aux protéines étudiées dans notre modèle d'infarctus du myocarde reperfusé est direct ou indirect.

Les résultats de cette thèse supportent le rôle protecteur que la PI3K et d'Akt possèdent au niveau des cardiomyocytes et du tissu cardiaque soumis à une ischémie-reperfusion. Nos résultats suggèrent que lors de la stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine, la PI3K et Akt sont rapidement activées, engendrant ainsi une cardioprotection significative et résultant en une réduction de la taille de l'infarctus.

11.2.6.2 *Caspase-3 et apoptose*

L'administration d'un agoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine module rapidement l'activité de la caspase-3 (Boucher, 2004). En effet, après seulement cinq minutes de reperfusion, son activité est diminuée dans le groupe traité précocement (Early). De plus, cette diminution persiste à 15 minutes de reperfusion dans l'endocarde ischémique. L'absence de réduction significative à 15 minutes dans l'épicarde ischémique pourrait refléter une plus grande viabilité cellulaire suite à l'ischémie-reperfusion.

L'inhibition des caspases est une approche cardioprotectrice efficace (Black, 1998; Yaoita, 1998; Holly, 1999; Huang, 2000; Mocanu, 2000; Regan, 2003). Cette inhibition doit absolument avoir lieu en début de reperfusion, sans quoi, aucune réduction de la taille de l'infarctus n'est observée. Les lésions de reperfusion débutant dès l'initiation de la reperfusion, l'inhibition des caspases doit donc être effectuée à ce moment. Ceci explique donc en partie l'effet protecteur de la stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine dans le groupe Précoce (Early) par rapport au groupe tardif (Late). L'agent pharmacologique doit être présent à la reperfusion afin d'entraîner une réduction de l'activation de la caspase-3. L'inhibition des caspases et subséquemment des processus apoptotiques est une méthode puissante de contrer la progression de l'infarctus lors d'une occlusion coronarienne. Il est également possible de générer une cardioprotection en ciblant d'autres composantes du système de signalisation apoptotique. La modification de l'expression de protéines appartenant à la famille Bcl-2 est un exemple. En effet, la transfection du gène Bcl-2 (protéine anti-apoptotique appartenant à la famille portant son nom) au niveau des cardiomyocytes de rats néonataux en culture engendre une résistance contre la mort par apoptose (Kirshenbaum, 1997). Bcl-xL, un autre membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, confère aussi une résistance contre l'ischémie et la reperfusion. Le groupe de Huang et coll. (Huang, 2003) a injecté un adénovirus contenant le gène Bcl-xL dans le myocarde (injection intra-myocardique) avant une ischémie-reperfusion. Ce groupe procéda par la suite à la génération d'un infarctus du myocarde et démontra que cette injection provoque

non seulement une réduction de la taille de l'infarctus mais aussi une amélioration des fonctions cardiaques post-infarctus. De plus, concurremment à la cardioprotection, Huang et coll. (Huang, 2003) ont observé une réduction des processus apoptotiques suite aux dommages. Dans un autre modèle, Imahashi et coll. (Imahashi, 2004) ont récemment montré une diminution de la taille de l'infarctus conjointement à une amélioration des fonctions cardiaques dans un modèle de cœur de souris isolé et surexprimant la protéine Bcl-2 spécifiquement au niveau du tissu cardiaque.

Bax est quant à elle membre de la famille Bcl-2 mais possède des propriétés pro-apoptotiques. Son inactivation génique (KO) chez la souris entraîne une tolérance contre l'ischémie. En effet, le groupe de Hochhauser et coll. (Hochhauser, 2003) ont observé que l'absence de la protéine Bax accorde une réduction de la taille de l'infarctus, de la relâche de créatine kinase et de l'apoptose des cardiomyocytes (observé par TUNEL et activité caspase-3) suite à une ischémie-reperfusion dans un modèle de cœur isolé. Ces diminutions sont accompagnées par une amélioration des fonctions cardiaques.

La modification d'expression de Bax et de Bcl-2 pourrait expliquer la cardioprotection par les récepteurs A_{2A} de l'adénosine. En effet, le CGS21680 entraîne une augmentation de l'expression de Bcl-2 et une réduction de celle de Bax dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion (Zhao, 2001a). Nous avons observé des résultats similaires dans notre modèle d'infarctus du myocarde (Boucher et coll., résultats non-publiés), corroborant cette hypothèse. Cette modulation pourrait donc en partie expliquer la protection pharmacologique de l'agoniste A_{2A} dans notre modèle d'infarctus du myocarde. En somme, toutes ces observations démontrent le potentiel protecteur de la famille des protéines Bcl-2 avec propriétés anti-apoptotiques. La réduction de l'expression de Bax, son inactivation ou sa séquestration pourrait également constituer une autre alternative protectrice.

Les travaux effectués figurant dans cette thèse ne déterminent pas si l'apoptose a été modulée via la stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine par son agoniste, le

CGS21680. En effet, pour quantifier les processus apoptotiques, il aurait été nécessaire d'effectuer des mesures via la coloration TUNEL sur coupes histologiques ou via d'autres techniques (par exemple, la microscopie électronique). Comme mentionné précédemment, la coloration TUNEL permet un marquage à l'extrémité 3' de l'ADN, une visualisation et une quantification rapide des processus apoptotiques avec l'aide d'un microscope à fluorescence. Un simple comptage des cellules positives est alors nécessaire : plus le nombre de cellules est grand, plus les processus apoptotiques sont importants.

La spécificité de cette méthode est par contre remise en question au niveau d'études portant sur l'ischémie-reperfusion. En effet, il a été démontré que des cardiomyocytes en apoptose et en nécrose pouvaient être marqués positivement par la coloration TUNEL. Guerra et coll. (Guerra, 1999) ont démontré un marquage positif de cellules apoptotiques et nécrotiques dans du tissu humain infarci. Or, les phénomènes nécrotiques sont présents lors d'une ischémie-reperfusion. La coloration TUNEL n'est donc pas nécessairement représentative seulement de l'apoptose. La méthode de marquage fluorescent de l'ADN sur coupes histologiques avec des sondes spécifiques générées par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) pourrait être utilisée en substitution à l'essai TUNEL et ce, via la génération de sondes spécifiques pour chacun des types de mort cellulaire (Didenko, 1996; Didenko, 1998; Guerra, 1999). Durant l'apoptose, les endonucléases clivent l'ADN et laisse une extrémité 3' non-cohésive. La mort par nécrose quant à elle entraîne la génération d'une extrémité 3' cohésive via le clivage par les endo et exonucléases lysosomiales. La création par PCR de sondes possédant une extrémité non-cohésive spécifiques à l'apoptose (via l'enzyme *Taq*) et cohésive spécifiques à la nécrose (via l'enzyme *Pfu*) est possible. Par la suite, sur des coupes histologiques et via l'enzyme T4 ligase, les sondes sont liées à l'extrémité 3' et sont visualisées par microscopie à fluorescence. Cette méthode discrimine mieux les deux types de mort cellulaire en comparaison à la coloration TUNEL.

Par ailleurs, la microscopie électronique permettrait d'identifier, dans le tissu ischémique, les processus apoptotiques. L'apoptose entraîne la génération de cellules ayant une architecture bien distincte par rapport aux cellules nécrotiques. Entre autres, il est possible d'y observer l'ADN marginalisé ainsi que les corps apoptotiques formés par le contenu cytoplasmique des cellules entourées de membrane. La microscopie électronique est une technique fiable pour évaluer qualitativement l'apoptose mais est très lourde pour la quantification de ces mêmes processus (cette méthode ne permettant seulement que l'observation de quelques cellules à la fois à de très forts grossissements).

L'utilisation de ces méthodes de marquage et de détection demeure à ce jour la seule façon d'évaluation et de quantification des processus apoptotiques dans du tissu ayant subi une ischémie-reperfusion. Il est évident que ces méthodes estiment grossièrement les processus apoptotiques à un endroit précis dans le temps et l'espace. Les techniques disponibles pour observer l'évolution et quantifier les processus apoptotiques *in vivo* à l'intérieur du cœur ou de tout autre organe, tissu ou cellule demeurent encore aujourd'hui mal définis.

Dans notre modèle d'infarctus du myocarde reperfusé, des mesures d'apoptose pourraient être effectuées via les méthodes TUNEL et sondes PCR sur coupes histologiques pour observer l'évolution de l'apoptose au niveau du tissu ischémique péri-nécrotique lors d'un traitement précoce ou tardif avec un agoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine. Ceci permettrait de quantifier les processus apoptotiques dans notre modèle d'infarctus du myocarde reperfusé.

11.2.6.3 Hsp

Le traitement pharmacologique par l'agoniste A_{2A} a permis de moduler l'expression de Hsp27 à 72 heures de reperfusion (Boucher, 2005b). En effet, suite à la période de reperfusion, l'expression de Hsp27 était significativement augmentée dans les deux

groupes, et ceci, peu importe le moment de l'initiation du traitement. L'expression de Hsp27 est passée de 82 % pour le groupe témoin à environ 197 % pour le groupe Précoce (Early) et 204 % pour le groupe tardif (Late). En ce qui a trait à Hsp70, aucun changement n'a été noté entre les différents groupes.

Plusieurs études ont montré un effet protecteur des Hsp dans des modèles d'ischémie-reperfusion. Le groupe de Hollander et coll (Hollander, 2004) a observé un effet protecteur de Hsp27 lorsque surexprimé dans le cœur de souris. Suite à une ischémie globale de 20 minutes et 60 minutes de reperfusion, l'expression augmentée de la protéine réduisait l'efflux de créatine kinase lors de l'ischémie-reperfusion. La surexpression de Hsp70 confère aussi une cardioprotection se traduisait par une diminution de 40 % de la taille de l'infarctus, une réduction de la relâche de créatine kinase ainsi qu'une amélioration des fonctions cardiaques lors de la reperfusion (Marber, 1995).

La principale limitation de ces observations est que la protection ne peut être présente seulement lorsque l'expression de ces protéines est augmentée avant l'ischémie. Ainsi, les études ont observé l'effet de la présence pré-ischémique de ces protéines ou de l'effet du préconditionnement ischémique sur l'expression des Hsp. Toutes ces interventions ont lieu précédemment à l'épisode d'occlusion coronarienne principale. Aucune étude n'a déterminé l'effet d'une intervention post-ischémique sur l'expression dite « normale » (aucune surexpression, expression de type sauvage) des Hsp. Nos résultats contrastent donc avec ceux-ci étant donné que la procédure expérimentale cardioprotectrice résulte en l'augmentation de l'expression de Hsp27 et non pas l'inverse (que l'augmentation de l'expression de la protéine provoque la cardioprotection). En fait, le traitement avec l'agoniste A_{2A} engendre une augmentation de l'expression de Hsp27 suite à 72 heures mais sans constater de changement notable entre les différents groupes expérimentaux à 15 minutes de reperfusion. Par ailleurs, la réduction de la taille de l'infarctus ne semble pas être le facteur prépondérant dans la modification de l'expression de Hsp27 étant donné que cette expression est augmentée dans les deux groupes traités avec

l'agoniste A_{2A}, avec (Early) ou sans (Late) protection. Ceci démontre qu'un certain délai est nécessaire afin d'augmenter la transcription génique et le contenu protéique et que, peu importe le moment de l'initiation du traitement, l'expression de cette protéine s'élève. Hsp27 ne joue donc pas un rôle capital dans notre modèle de cardioprotection par les récepteurs A_{2A} de l'adénosine. Nonobstant ceci, Hsp27 pourrait être impliquée à plus long terme en ce qui a trait au remodelage cardiaque suite à l'infarctus du myocarde. Cette protéine est une chaperone protéique et est essentielle au bon repliement des protéines. Sa présence accrue pourrait être bénéfique au myocarde reperfusé. Cette hypothèse dépasse le cadre des travaux présentés et d'autres travaux sont nécessaires afin d'évaluer cet aspect du projet.

11.2.6.4 CREB

L'administration de l'agoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine a engendré une activation de CREB. En effet, peu importe le moment du début de cette administration, CREB est rapidement activé à 15 minutes de reperfusion, passant d'environ 35 % pour le groupe témoin à environ 104 % pour le groupe Précoce (Early) et 100 % pour le groupe tardif (Late). Autant au niveau du groupe Précoce (Early) que tardif (Late), CREB est significativement plus phosphorylé par rapport au groupe témoin, suggérant son activation augmentée.

Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine peuvent activer CREB. À ce titre, Kull et coll. (Kull, 1999b) ont montré une phosphorylation de CREB accrue lors d'une stimulation de cellules en culture avec l'agoniste spécifique CGS21680. Depuis, d'autres groupes ont obtenu des résultats similaires (Kull, 1999b; Bshesh, 2002; Cheng, 2002; Lee, 2002a, 2002b). L'augmentation de l'AMPc par l'activation de ces récepteurs ainsi que l'activation de la PKA sont responsables de cette stimulation du facteur de transcription (Bshesh, 2002; Cheng, 2002; Lee, 2002a, 2002b; Lynge, 2003).

Par ailleurs, l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine semble être protectrice en regard à CREB. Dans un modèle de cellules PC12 en culture, Huang et coll. (Huang, 2001) ont observé que lors d'une privation de sérum, le CGS21680 provoquait une protection de ces cellules en réduisant la mort des cellules par apoptose. Riccio et coll. (Riccio, 1999) ont montré le rôle de CREB dans la survie cellulaire dans un modèle de neurones isolés de cerveaux de rats néonataux en culture stimulés par le facteur de croissance neuronal (NGF). Bonni et coll. (Bonni, 1999) ont quant à eux observé que CREB était également activé suite à une stimulation au BDNF dans un autre modèle de neurones isolés. La protection était abolie lors de l'injection d'une forme mutante catalytiquement inactive de CREB dans ces deux derniers modèles (Bonni, 1999; Riccio, 1999). Ces observations démontrent donc que les récepteurs A_{2A} de l'adénosine ont le potentiel d'activer CREB via une signalisation cellulaire impliquant la protéine $G_{\alpha s}$, l'adénylyle cyclase, l'AMPc et la PKA. Par ailleurs, Akt peut phosphoryler CREB (Du, 1998). Il est possible que ce facteur de transcription puisse être activé par les récepteurs A_{2A} de l'adénosine dans notre modèle via Akt. Il est à noter que la protéine Akt est rapidement activée dans le groupe traité de façon précoce (Early) mais que CREB est quant à lui activé dans les deux groupes traités (Boucher, 2005b). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le traitement pharmacologique lui-même serait responsable de l'activation de CREB (via la génération d'AMPc et la PKA) et non pas l'activation de Akt. Les résultats obtenus dans cette thèse ne permettent pas cependant d'exclure la possibilité que Akt puisse activer le facteur de transcription.

L'implication de CREB dans le préconditionnement a été précédemment démontrée. En utilisant un modèle de cœur isolé, Das et coll. (Das, 2005a; Das, 2005b) ont récemment observé que le facteur de transcription était nécessaire pour observer une cardioprotection par le resvératrol. De plus, ils ont établi que les récepteurs A_3 étaient également indispensables pour cette protection. Ces résultats établissent donc le potentiel cardioprotecteur de CREB conjointement avec les récepteurs de l'adénosine.

Le rôle de CREB dans la cardioprotection par les récepteurs A_{2A} de l'adénosine lors d'une intervention post-ischémique reste incertain. Par les travaux présentés dans cette thèse, CREB n'aurait qu'un rôle mineur à jouer dans ce type de cardioprotection (Boucher, 2005b). En effet, le facteur de transcription ne serait pas essentiel à la protection myocardique dans notre modèle étant donné que seulement le groupe Précoce (Early) présente une cardioprotection mais que son activation est constatée dans les deux groupes traités avec l'agoniste A_{2A} (Précoce et Tardif; Early et Late). Nous n'excluons pas que CREB serait impliquée dans cette cardioprotection mais son rôle semble n'être que mineur.

11.2.6.5 Intégration des voies et vue générale

La PI3K et Akt sont des protéines nécessaires à la génération d'une cardioprotection. Comme revue par Hausenloy et Yellon en 2004 (Hausenloy, 2004), ces composantes du système de survie cellulaire contrent les lésions de reperfusion (RISK) en provoquant rapidement, lors de l'initiation de la reperfusion, une cascade cellulaire qui, ultimement, engendre une réduction de la taille de l'infarctus. Notre modèle de cardioprotection démontre une telle activation de la PI3K et d'Akt lors du début de la période de reperfusion, corroborant l'hypothèse de Hausenloy et Yellon (Hausenloy, 2004). Ainsi, le traitement pharmacologique avec l'agoniste A_{2A} institué juste avant la reperfusion (intervention post-ischémique) active ces protéines de survie cellulaire, réduisant les lésions de reperfusion et menant ultimement à une réduction de la taille de l'infarctus (figure 11.1).

Par ailleurs, l'activité de la caspase-3 est rapidement réduite lors de l'initiation de la reperfusion. L'inhibition ou la réduction d'activation de cette enzyme est cardioprotectrice (Mocanu, 2000). Seulement le groupe Précoce (Early) présente cette réduction, démontrant un effet de l'agoniste A_{2A} . Afin d'observer une cardioprotection significative, les résultats de cette thèse suggèrent qu'il est nécessaire d'un côté d'augmenter l'activation de la voie impliquant la PI3K et Akt et, d'un autre côté, de réduire celle de la caspase-3 rapidement lors de l'initiation de la reperfusion (figure 11.1). Ces modifications permettent ainsi

d'inhiber/réduire les lésions de reperfusion et la taille de l'infarctus, produisant ainsi une cardioprotection.

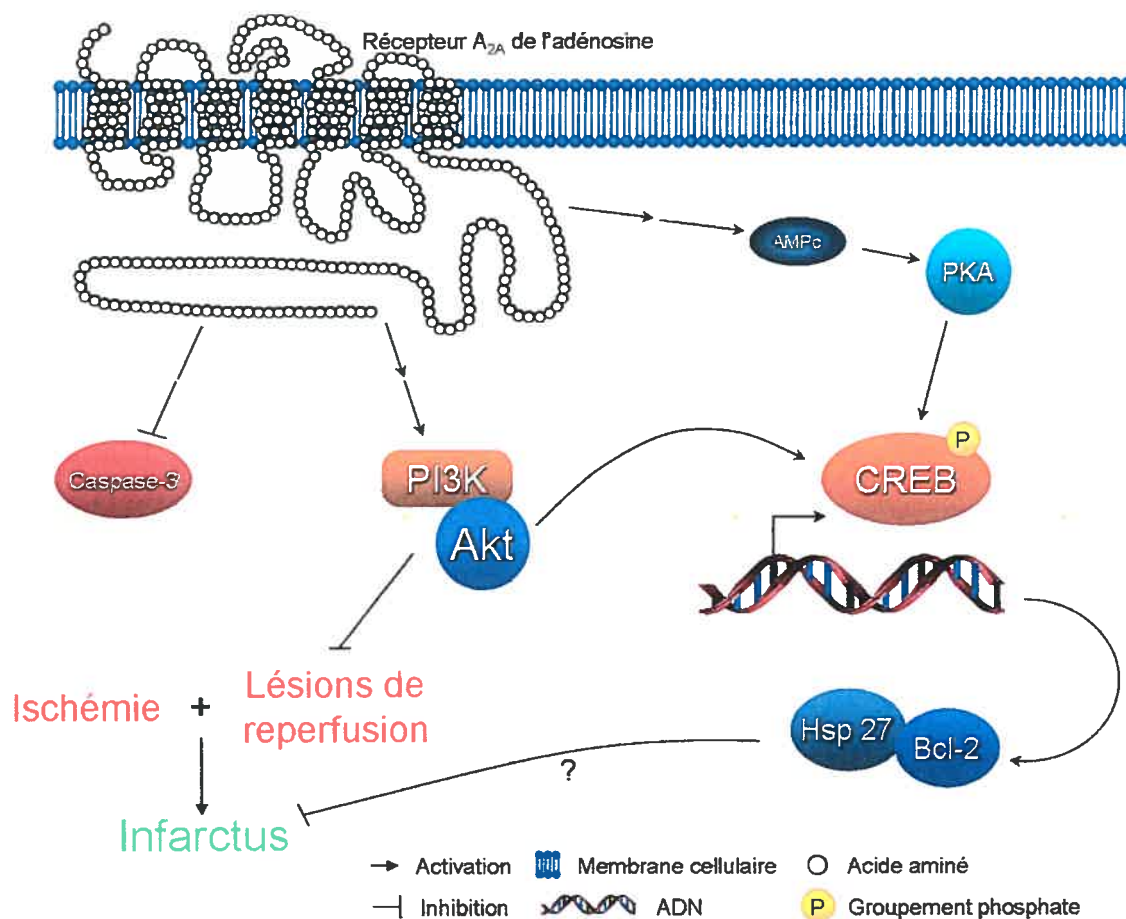


Figure 11.1 Schéma de l'intégration des différentes voies de signalisation. La stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine lors de la reperfusion myocardique entraîne une activation de la voie de la PI3K et de Akt. Par ailleurs, cette stimulation pourrait être responsable non seulement de l'activation de CREB mais également d'une élévation du contenu protéique de Hsp27 et Bcl-2, deux médiateurs potentiels de la protection.

D'autre part, Akt a pour cible plusieurs différents effecteurs (chapitre 4, section 4.2.2) dont le facteur de transcription CREB (Du, 1998). Malgré le fait que ce facteur de

transcription semble jouer un rôle mineur dans notre modèle de cardioprotection, nous ne pouvons exclure son implication. Le traitement pharmacologique provoque l'activation de CREB et ce, peu importe le moment de son initiation. La stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine pourrait donc entraîner une activation d'Akt qui, à son tour, irait phosphoryler et activer subséquemment CREB. Ainsi stimulé, le facteur de transcription serait en mesure d'aller cibler son élément de réponse à l'ADN et engendrer une transcription génique (figure 11.1).

CREB pourrait modifier l'expression des protéines Hsp. En effet, l'élément de réponse CRE se retrouve au niveau des gènes des Hsp (Zhang, 2005b). La liaison de CREB à son élément de réponse (CRE) en amont du gène de Hsp27 constituerait un mécanisme expliquant l'augmentation de l'expression de cette dernière. En parallèle, CREB pourrait également provoquer une augmentation de la transcription génique de Bcl-2 (Pugazhenti, 1999; Pugazhenti, 2000). En effet, en utilisant un modèle de cellules en culture, Pugazhenti et coll. (Pugazhenti, 1999; Pugazhenti, 2000) ont montré que CREB produisait une augmentation de la transcription génique de Bcl-2 et ce, engendrée par l'activation d'Akt. Ces résultats démontrent donc le potentiel protecteur non seulement de CREB mais aussi de la kinase Akt en amont du facteur de transcription. Dans notre modèle de cardioprotection, suivant l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine et/ou de la PI3K et d'Akt, CREB pourrait en conséquence augmenter le contenu protéique de Hsp et de Bcl-2 (figure 11.1). Étant donné que l'expression de ces dernières n'augmente qu'après l'ischémie, il est probable qu'elles ne participent pas à la génération d'une protection myocardique. Elles pourraient cependant posséder un effet à plus long terme comme le remodelage cardiaque.

L'utilisation de souris transgéniques pour CREB (mutant inactif non-phosphorylable, la délétion du gène étant létale) permettra d'élucider son rôle dans la cardioprotection et peut-être sur l'expression des Hsp. Par ailleurs, l'utilisation de souris mutantes pour la PI3K serait une alternative afin de clarifier son effet cardioprotecteur. La

sous-unité catalytique p110 γ est activée par les récepteurs couplés aux protéines G tels que le sous-type A_{2A}. Sa délétion (KO) est viable ((Hirsch, 2000); revue par Vanhaesebroeck et coll. (Vanhaesebroeck, 2005)) et pourrait constituer une méthode pour montrer le mécanisme de cardioprotection et le lien entre cette enzyme, les protéines Akt et CREB. Finalement, la délétion du gène des récepteurs A_{2A} de l'adénosine (Ledent, 1997; Chen, 1999; Chen, 2001) confirmera le potentiel cardioprotecteur de ces récepteurs en situation de thérapie post-ischémique.

11.3 Protection pharmacologique du cerveau : régression de l'apoptose dans l'amygdale en situation post-infarctus du myocarde

11.3.1 Apoptose et amygdale

Les résultats obtenus dans cette thèse démontre la régression des phénomènes apoptotiques au niveau de l'amygdale par un agoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine suite à un infarctus du myocarde (Boucher, 2005a). Cette régression de l'apoptose a été quantifiée par la coloration TUNEL et a montré une diminution du nombre de cellules positives dans le groupe traité de façon précoce (Early). Ce dernier possédait aussi une activité de l'enzyme pro-apoptotique caspase-3 significativement diminuée par rapport au groupe témoin. Simultanément, une augmentation de l'activité de la PI3K, de l'activation de son effecteur direct Akt ainsi que de l'expression de Bcl-2 a été constatée, toutes trois des protéines possédant un effet anti-apoptotique.

Wann et coll. (Wann, 2005a) ont clairement démontré la présence d'apoptose au niveau de l'amygdale suite à 72 heures de reperfusion. Ces processus apoptotiques ont été identifiés au niveau de l'amygdale par divers techniques (TUNEL, immunodétections et mesures d'activités enzymatiques). De plus, ce même groupe a montré qu'il était possible de moduler pharmacologiquement ces phénomènes de mort cellulaire. Les résultats présentés dans cette thèse corroborent ces observations, démontrant une fois de plus la

présence d'apoptose dans la structure cérébrale à 72 heures de reperfusion et qu'il est possible de provoquer leur régression par un agent pharmacologique.

La réduction de l'apoptose observée seulement dans le groupe Précoce (Early) en comparaison au groupe Tardif (Late) pourrait être le résultat d'une augmentation du signal de survie cellulaire par rapport au signal de mort cellulaire. L'augmentation de l'activité de la PI3K et l'activation d'Akt ne s'observent que dans le groupe Précoce (Early). La PI3K et Akt constituant des membres de la famille des protéines avec propriétés anti-apoptotiques, le signal de survie cellulaire pourrait ainsi être accru dans le groupe Précoce (Early). En contraste, l'expression de Bcl-2 est similaire entre les deux groupes traités. Cette observation pourrait s'expliquer par le traitement pharmacologique, celui-ci pouvant activer la transcription génique de Bcl-2 via l'activation de CREB. Au niveau du myocarde, nous avons observé une stimulation rapide de CREB à 15 minutes de reperfusion dans les groupe Précoce (Early) et Tardif (Late) (Boucher, 2005b). L'élément de réponse CRE se retrouvant au niveau des gènes des Bcl-2 (Zhang, 2005b), CREB irait lier son élément de réponse en amont du gène de Bcl-2, augmentant ainsi sa transcription génique. Il a été démontré par Pugazhenthii et coll. (Pugazhenthii, 1999; Pugazhenthii, 2000) que l'augmentation du Bcl-2 peut s'effectuer via CREB. Il est donc possible de croire que le contenu protéique de Bcl-2 pourrait être accru par un mécanisme dépendant de CREB au niveau de l'amygdale dans nos deux groupes traités avec l'agoniste A_{2A} . Une autre similitude entre les groupes Précoce (Early) et Tardif (Late) a été observée au niveau de l'amygdale quant à l'activité de la caspase-3. Cette activité semblable entre les deux groupes (mais significativement réduite par rapport au groupe témoin) pourrait être le résultat de l'expression augmentée de Bcl-2. En effet, cette protéine étant en amont de la caspase-3 en regard à la cascade apoptotique (Adams, 1998; Thornberry, 1998; Budihardjo, 1999; Hengartner, 2000), l'augmentation d'expression de Bcl-2 pourrait entraîner un effet net anti-apoptotique, réduisant par le fait même l'activation des caspases.

Il a été démontré que l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine provoquait une réduction des processus apoptotiques. En effet, Huang et coll. (Huang, 2001) ont observé que cette activation permettait aux cellules PC12 de résister à l'apoptose générée par le retrait du sérum du milieu de culture. Cassada et coll. (Cassada, 2001) ont aussi démontré un effet anti-apoptotique d'un agoniste spécifique des récepteurs A_{2A} de l'adénosine dans un modèle de reperfusion de la moëlle épinière. De plus, Zhao et coll. (Zhao, 2001a) ont observé une réduction des processus apoptotiques myocardiques suite à une ischémie-reperfusion. Ces modèles diffèrent substantiellement du modèle de dépression post-infarctus mais démontrent malgré tout le potentiel anti-apoptotique des récepteurs A_{2A} de l'adénosine.

L'effet net de la stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine en début de reperfusion est donc une réduction des processus apoptotiques au niveau de l'amygdale du groupe traité de façon précoce (Early). Le signal de survie cellulaire n'étant pas assez élevé par rapport au signal de mort dans le groupe Tardif (Late), l'effet ultime est l'apoptose. D'autres travaux sont nécessaires afin de confirmer toutes ces hypothèses.

11.3.2 Hypothèses de l'inflammation et de réduction intracérébrale

Les résultats présentés dans la troisième partie de cette thèse montrent une réduction de la production de $TNF\alpha$, une cytokine pro-inflammatoire (Boucher, 2005a). En effet, l'expression de la cytokine est significativement réduite dans le groupe Précoce (Early), passant d'environ 100 % pour le groupe Témoin à environ 43 % pour le groupe Précoce (Early). Cette même expression n'était pas modifiée au niveau du groupe Tardif (Late; environ 101 %).

Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine sont connus comme pouvant réduire l'inflammation. Ces derniers inhibent les neutrophiles (Revan, 1996; Jordan, 1997; Sullivan, 2001) ainsi que la production et la relâche de radicaux libres (Jordan, 1997;

Sullivan, 2001) et de $\text{TNF}\alpha$ (Harada, 2000; Ohta, 2001 ; Bshesh, 2002). La réduction de production de cytokines pro-inflammatoires lors de la reperfusion myocardique pourrait être bénéfique pour l'amygdale. L'administration d'un inhibiteur de synthèse de cytokines, le pentoxifylline, réduit la réponse pro-inflammatoire. Le pentoxifylline est un inhibiteur de synthèse des cytokines pro-inflammatoires, principalement de $\text{TNF}\alpha$ (D'Hellencourt, 1996; Marcinkiewicz, 2000; Silva, 2000; Weber, 2001; Colson, 2003). Dans le modèle d'infarctus du myocarde reperfusé présenté par Wann et coll. (Wann, 2005a), l'administration du pentoxifylline a entraîné une régression des processus apoptotiques au niveau de l'amygdale. Cette régression a été caractérisée par une réduction de la coloration TUNEL, de l'activité de la caspase-3 et du ratio Bax/Bcl-2 ainsi qu'une augmentation de l'activité de la PI3K. Ces résultats démontrent qu'il est possible de moduler l'apoptose au niveau de l'amygdale suite à un infarctus du myocarde. L'inhibition ou la réduction de synthèse de $\text{TNF}\alpha$, une cytokine pro-inflammatoire et pro-apoptotique, est une approche efficace. La stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine semble donc avoir un effet similaire, expliquant la régression des phénomènes apoptotiques.

La différence observée entre les groupes traités de façon précoce (Early) et tardive (Late) au niveau du $\text{TNF}\alpha$ s'explique par le protocole d'administration de l'agoniste. En effet, le traitement pharmacologique avec l'agoniste A_{2A} débute cinq minutes avant l'initiation de la reperfusion pour le groupe Précoce (Early). Ce même traitement ne débute que cinq minutes après l'initiation de la reperfusion pour le groupe Tradif (Late). Il est connu que la reperfusion myocardique provoque rapidement, dès son initiation, une réponse pro-inflammatoire massive (Fox, 1987). Par ailleurs, l'adénosine, via le récepteur A_{2A} de l'adénosine, possède des propriétés anti-inflammatoires (Cronstein, 1994). La présence d'adénosine ou d'un agoniste spécifique au moment de la reperfusion réduirait l'inflammation causée par cette reperfusion myocardique. Étant donné que l'agent pharmacologique est présent dès le moment de la reperfusion uniquement au niveau du groupe Précoce (Early), seulement celui-ci présente une réduction de la réponse

inflammatoire et de l'apoptose amygdalienne. Au niveau du groupe Tardif (Late), l'initiation du traitement s'effectue suite à cinq minutes de reperfusion. Ce délai pourrait faire en sorte que la réponse inflammatoire est déjà enclenchée et que l'agent pharmacologique est incapable de la réduire. Ces observations pourraient donc constituer un mécanisme expliquant la réduction de TNF α seulement au niveau du groupe Précoce (Early).

Une autre hypothèse pouvant élucider la réduction de la cytokine pro-inflammatoire est l'inhibition de son transporteur ((Gutierrez, 1993); revue par Banks et coll. (Banks, 1995)) directement ou indirectement par l'agent pharmacologique. Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine étant présents sur l'endothélium vasculaire, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les récepteurs puissent inhiber le transport directement via la génération d'AMPC et sa phosphorylation ou indirectement par une cascade de signalisation cellulaire en diminuant son expression protéique.

Le mécanisme proposé par Francis et coll. (Francis, 2004b) pourrait également constituer une explication concernant la réduction de TNF α au niveau de l'amygdale. En regard à cette hypothèse, la diminution pourrait être due à une réduction de cette synthèse à l'intérieur de la barrière hémato-encéphalique. En effet, Francis et coll. (Francis, 2004b) ont démontré que suite à un infarctus du myocarde, le TNF α était synthétisé dans l'hypothalamus. De plus, ce groupe propose que cette synthèse s'effectue sous un contrôle neuronal par les afférences sympathiques cardiaques et par le nerf vague. Le même principe pourrait s'appliquer à l'amygdale. L'hypothalamus étant en communication directe avec l'amygdale (Nieuwenhuys, 1996), le signal des nerfs afférents sympathiques cardiaques et vague pourraient aussi affecter l'amygdale. Des cytokines y seraient synthétisées dans cette structure cérébrale suite à un infarctus du myocarde. La stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine provoquerait donc une réduction de l'activation des nerfs afférents sympathiques cardiaques et réduire ultimement la génération de TNF α au niveau de l'amygdale. De plus, il est possible que la diminution de la taille de l'infarctus

provoquée par l'agoniste A_{2A} réduise cette stimulation neuronale, ayant pour effet de réduire d'autant plus la synthèse de la cytokine.

La réduction de $TNF\alpha$ pourrait être le résultat d'une stimulation directe des récepteurs A_{2A} de l'adénosine au niveau de l'amygdale, du système limbique ou des structures cérébrales y projetant des connections. Ces récepteurs sont présents au niveau de l'amygdale. Bien que leur expression n'y est pas élevée (Rosin, 1998) en comparaison au striatum (revue par Svenningsson et coll. (Svenningsson, 1999)), leur activation pourrait avoir un effet de réduction du $TNF\alpha$. L'expression des récepteurs A_{2A} de l'adénosine étant bien établie dans le striatum, leur activation pourrait aussi réduire la génération de $TNF\alpha$. Le striatum possède des connections directes avec l'amygdale et les autres structures du système limbique. Il est de ce fait possible que l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine au niveau du striatum enclenche une diminution de la synthèse de $TNF\alpha$ dans l'amygdale et dans les structures environnantes.

Finalement, la modulation de la mort cellulaire dans un organe indirectement par des dommages induits dans un autre organe pourrait expliquer la réduction de l'apoptose dans l'amygdale. Cette manifestation a précédemment été décrite en situation de protection myocardique. Récemment, Kerendi et coll. (Kerendi, 2005) ont décrit un phénomène de postconditionnement cardiaque via l'occlusion de l'artère rénale suivant une occlusion coronarienne. En effet, la taille de l'infarctus du myocarde était significativement réduite, passant d'environ 49 % pour un groupe témoin à environ 24 % pour un groupe avec postconditionnement par l'occlusion de l'artère rénale. Des résultats similaires ont été obtenus avec le préconditionnement par l'occlusion d'une artère d'un organe avant l'occlusion coronarienne (Gho, 1996; Birnbaum, 1997; Takaoka, 1999). Possiblement, le même phénomène pourrait s'observer dans notre modèle. La réduction de la taille de l'infarctus pourrait engendrer un signal faisant en sorte de diminuer la mort cellulaire par apoptose dans l'amygdale. Selon cette hypothèse, la stimulation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine ne serait pas suffisante à moduler cette apoptose mais serait nécessaire (afin de

réduire la taille de l'infarctus). Par ailleurs, aucune donnée n'est présentement disponible au niveau de la dépression post-infarctus et aucun mécanisme n'est encore décrit. Davantage de travaux sont nécessaire afin de valider cette hypothèse.

Aucune étude n'est présentement disponible afin de valider ces hypothèses. L'utilisation de souris sans récepteurs A_{2A} de l'adénosine (KO; (Ledent, 1997; Chen, 1999; Chen, 2001) pourrait permettre de répondre à certaines questions. Davantage de travaux sont nécessaires afin de bien les valider.

11.3.3 Implication au niveau de la dépression

Comme précédemment discuté, Wann et coll. (Wann, 2005b) ont confirmé que leur modèle d'infarctus du myocarde engendrait bien une dépression. Les symptômes étaient atténués par un traitement anti-dépresseur avec la désipramine. Les travaux de cette thèse ne montrent pas si l'agoniste A_{2A} entraîne non seulement une régression de l'apoptose au niveau de l'amygdale mais aussi une diminution des symptômes de dépression post-infarctus. D'autres travaux sont nécessaires afin de clarifier cet aspect capital. Par le test de préférence au glucose et de la nage forcée (Porsolt), il sera possible de montrer si la stimulation rapide des récepteurs A_{2A} de l'adénosine lors de la reperfusion peut provoquer une modification du comportement des animaux se traduisant par une réduction de la dépression.

Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine pourrait donc constituer une cible pharmacologique pour réduire efficacement non seulement la taille de l'infarctus mais aussi l'apoptose post-infarctus au niveau de l'amygdale et ultimement la dépression.

Conclusion

Ces travaux ont permis de démontrer l'implication des récepteurs A_{2A} de l'adénosine au niveau de la cardioprotection post-ischémique. En effet, la stimulation de ces récepteurs entraîne une réduction de la taille de l'infarctus lorsque l'agoniste est administré rapidement, juste avant l'initiation de la reperfusion. De plus, cette protection cardiaque demeure présente suivant une période de reperfusion allongée. Par ailleurs, nous avons montré la nécessité de la voie de survie cellulaire impliquant la PI3K et Akt. Ces travaux ont également démontré que ce même traitement provoque une régression de l'apoptose au niveau de l'amygdale. La régression observée pourrait s'effectuer via un mécanisme anti-inflammatoire. L'apoptose au niveau de l'amygdale pourrait expliquer la dépression post-infarctus du myocarde observée chez les patients atteints de maladies coronariennes.

Ces résultats permettent d'entrevoir une nouvelle avenue thérapeutique réduisant la taille de l'infarctus ainsi que la dépression post-infarctus. En effet, l'administration d'un agoniste des récepteurs A_{2A} de l'adénosine simultanément à un processus de reperfusion (agent thrombolytique, pontage, angioplastie) pourrait sauver davantage de tissu myocardique, améliorant ainsi les performances cardiaques et la qualité de vie du patient touché par l'occlusion coronarienne. Cette administration réduirait aussi l'incidence de la dépression post-infarctus et, ainsi, diminuerait la morbidité et la mortalité associées à cette pathologie.

Toutefois, plusieurs questions demeurent sans réponse. La cardioprotection par les récepteurs A_{2A} de l'adénosine et sa fenêtre thérapeutique seront investiguées plus en profondeur (moment d'administration avant/après l'initiation de la reperfusion et doses pharmacologiques utilisées). Par ailleurs, l'effet d'une stimulation de ces récepteurs en début de reperfusion sur l'apparition de la dépression post-infarctus sera également investigué en étudiant le comportement des animaux suite à la reperfusion par différents tests comportementaux (nage forcée et préférence de l'eau sucrée).

Bibliographie

Abbracchio MP, Fogliatto G, Paoletti AM, Rovati GE, Cattabeni F (1992) Prolonged exposure of rat brain slices to adenosine analogs: Selective desensitization of adenosine A₁ but not A₂ receptors, *European Journal of Pharmacology* 227:317-324;

Abercrombie HC, Schaefer SM, Larson CL, Oakes TR, Lingren KA, Holden JE, Perlman SB, Turski PA, Krahn DD, Benca RM, Davidson RJ (1998) Metabolic rate in the right amygdala predicts negative affect in depressed patients, *Neuroreport* 9:3301-3307;

Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* 281:1322-1326;

Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF (1997) An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation, *Journal of Cell Biology* 137:825-834;

Akbar M, Okajima F, Tomura H, Shimegi S, Kondo Y (1994) A single species A₁ adenosine receptor expressed in Chinese hamster ovary cells not only inhibits cAMP accumulation but also stimulates phospholipase C and arachidonate release, *Molecular Pharmacology* 45:1036-1042;

Alfonso F, Henson PM, Leslie CC (1986) A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine, *Biophysical Biochemical Acta* 878:273-280;

Ambrosio G, Becker LC, Hutchins GM, Weisman HF, Weisfeldt ML (1986) Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase : Insight into the pathophysiology of reperfusion injury, *Circulation* 74:1424-1433;

- Anand-Srivastava MB, Cantin M, Ballak M, Picard S (1989) Desensitization of the stimulatory A₂ adenosine receptor-adenylate cyclase system in vascular smooth muscle cells from rat aorta, *Molecular and Cellular Endocrinology* 62:273-279;
- Anderson CM, Xiong W, Young JD, Cass CE, Parkinson FE (1996) Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in the rat brain, *Brain Research Molecular Brain Research* 42:358-361;
- Antman EL, Braunwald E (2001) *Acute myocardial infarction*, In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, eds., *Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine*, Philadelphia:W.B. Saunders Company, 6th edition, 1114-1231;
- Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J (1998) Apoptosis and myocardial infarction, *Basic Research in Cardiology* 93:Suppl 3, 8-12;
- Arch JR, Newsholme EA (1978) The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine, *Essays in Biochemistry* 14:82-123;
- Ardehali A, Ports TA (1990) Myocardial oxygen supply and demand, *Chest* 98:699-705;
- Armstrong R, Wen W, Meinkoth J, Taylor S, Montminy M (1995) A refractory phase in cyclic AMP-responsive transcription requires down regulation of protein kinase A, *Molecular & Cellular Biology* 15:1826-32.;
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation, *Science* 281:1305-1308;

American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, Washington, DC:American Psychiatric Association;

Atkinson MR, Townsend-Nicholson A, Nicholl JK, Sutherland GR, Schofield PR (1997) Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A₃ receptor (ADORA3) gene, *Neuroscience Research* 29:73-79;

Auchampach JA, Grover CJ, Gross GJ (1992) Blockade of ischemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate, *Cardiovascular Research* 26:1054-1062;

Auchampach JA, Gross GJ (1993) Adenosine A₁ receptor, K_{ATP} channels, and ischemic preconditioning in dogs, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 264:H1327-H1336;

Auchampach JA, Jin J, Wan TC, Caughey GH, Linden J (1997a) Canine mast cell adenosine receptors: Cloning and expression of the A₃ receptors and evidence that degranulation is mediated by the A_{2B} receptor, *Molecular Pharmacology* 52:846-860;

Auchampach JA, Rizvi A, Qiu Y, Tang XL, Maldonado C, Teschner S, Bolli R (1997b) Selective activation of A₃ adenosine receptors with N⁶-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits, *Circulation Research* 80:800-809;

Auchampach JA, Ge ZD, Wan TC, Moore J, Gross GJ (2003) A₃ adenosine receptor agonist IB-MECA reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in dogs, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 285:H607-H613;

Avila MY, Stone RA, Civan MM (2002) Knockout of A3 adenosine receptors reduces mouse intraocular pressure, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43:3021-3026;

Baines CP, Wang L, Cohen MV, Downey JM (1999) Myocardial protection by insulin is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase C or K_{ATP} channels in the isolated rabbit heart, *Basic Research in Cardiology* 94:188-198;

Balogh S, Fitzpatrick DF, Hendricks SE, Paige SR (1993) Increases in heart rate variability with successful treatment in patients with major depressive disorder, *Psychopharmacology Bulletin* 29:201-206;

Balou LR, DeWitt LM, Cheung WY (1986) Substrate-specific forms of human platelet phospholipase, *Journal of Biological Chemistry* 261:3107-3111;

Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD (1995) Passage of cytokines across the blood-brain barrier, *Neuroimmunomodulation* 2:241-248;

Barton K, Muthusamy N, Chanyangam M, Fischer C, Clendenin C, Leiden JM (1996) Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB, *Nature* 379:81-85;

Baxter GF, Hale SL, Miki T, Kloner RA, Cohen MV, Downey JM, Yellon DM (2000) Adenosine A₁ agonist at reperfusion trial (AART): Results of a three-center, blinded, randomized, controlled experimental infarct study, *Cardiovascular Drugs and Therapy* 14:607-614;

Becker F, Craig E (1994) Heat shock proteins as molecular chaperones, *European Journal of Biochemistry* 219:11-23;

Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ (1990) Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly, *Science* 248:850-854;

Bednar M, Smith B, Pinto A, Mullane KM (1985) Neutrophil Depletion Suppresses ¹¹¹In-Labeled Platelet Accumulation in Infarcted Myocardium, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 7:906-912;

Belardinelli L, Shyrook JC, Song Y, Wang D, Srinivas M (1995) Ionic basis of the electro physiological actions of adenosine in cardiomyocytes, *FASEB Journal* 9:359-365;

Bell RM, Yellon DM (2003a) Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway, *Journal of the American College of Cardiology* 41:508-515;

Bell RM, Yellon DM (2003b) Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35:185-193;

Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P (1998) Cell Surface Trafficking of Fas: A Rapid Mechanism of p53-Mediated Apoptosis, *Science* 282:290-293;

Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26:509-517;

Berne RM, Rubio R, Curnish RR (1974) Release of adenosine from ischemic brain, *Circulation Research* 35:262-271;

Berne RM (1980) The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow, *Circulation Research* 58:807-813;

Beutler B, Cerami A (1989) The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response, *Annual Review in Immunology* 7:625-655;

Bhattacharyya T, Karnezis AN, Murphy SP, Hoang T, Freeman BC, Phillips B, Morimoto RI (1995) Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70, *Journal of Biological Chemistry* 270:1705-1710;

Biegon A, Weizman A, Karp L, Ram A, Tiano S, Wolff M (1987) Serotonin 5-HT₂ receptor binding on blood platelets--a peripheral marker for depression?, *Life Sciences* 41:2485-2492;

Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA (1997) Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit, *Circulation* 96:1641-6;

Bishop SP, White FC, Bloor CM (1976) Regional myocardial blood flow during acute myocardial infarction in the conscious dog, *Circulation Research* 38:429-438;

Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P, Radinovic S, Eberhart A, Nicholson DW, Rodger IW (1998) Colocalization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30:733-742;

Blikstad I, Markey F, Carlsson L, Persson T, Lindberg U (1978) Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of deoxyribonuclease I, *Cell* 15:935-943;

Blum D, Hourez R, Galas MC, Popoli P, Schiffmann SN (2003a) Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics, *Lancet Neurology* 2:366-374;

Blum D, Galas MC, Pintor A, Brouillet E, Ledent C, Muller CE, Bantubungi K, Galluzzo M, Gall D, Cuvelier L, Rolland AS, Popoli P, Schiffmann SN (2003b) A dual role of adenosine A_{2A} receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A_{2A} antagonists, *Journal of Neuroscience* 23:5361-5369;

Boerth RC, Covell JW, Pool PE, Ross J (1969) Increased myocardial oxygen consumption and contractile state associated with increased heart rate in dogs, *Circulation Research* 24:725-734;

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

Bolli R (2000) The late phase of preconditioning, *Circulation Research* 87:972-983;

Bolli R, Becker L, Gross G, Mentzer R, Balshaw D, Lathrop DA (2004) Myocardial protection at a crossroads: The need for translation into clinical therapy, *Circulation Research* 95:125-134;

Bond U, Schlesinger MJ (1985) Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts, *Molecular & Cellular Biology* 5:949-956;

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms, *Science* 286:1358-1362;

Boucher M, Pesant S, Falcao S, de Montigny C, Schampaert É, Cardinal R, Rousseau R (2004) Post-ischemic cardioprotection by A_{2A} adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 43:416-422;

Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, Schampaert É, Cardinal R, Godbout R, Rousseau G (2005a) Apoptosis regression in the amygdala following A_{2A} adenosine receptor activation in a model of cardioprotection in rats, *Apoptosis* **Submitted**;

Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, Massé R, Schampaert É, Cardinal R, Rousseau R (2005b) Sustained cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor stimulation after 72 hours of myocardial reperfusion, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 45:439-446;

Bowley MP, Drevets WC, Ongur D, Price JL (2002) Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorders, *Biological Psychiatry* 52:404-412;

Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJJ, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL (1998) Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats, *Circulation* 97:1382-1391;

Brackett LE, Daly JW (1994) Functional characterization of the A_{2b} adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts, *Biochemical Pharmacology* 47:801-814;

Brar BK, Jonassen AK, Stephanou A, Santilli G, Railson J, Knight RA, Yellon DM, Latchman DS (2000) Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway, *Journal of Biological Chemistry* 275:8508-8514;

Brar BK, Stephanou A, Liao Z, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS (2001a) Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation, *Cardiovascular Research* 51:265-274;

Brar BK, Stephanou A, Pennica D, Latchman DS (2001b) CT-1 mediated cardioprotection against ischaemic re-oxygenation injury is mediated by PI3 kinase, Akt and MEK1/2 pathways, *Cytokine* 16:93-96;

Brar BK, Stephanou A, Knight R, Latchman DS (2002) Activation of protein kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34:483-492;

Braunwald E (1974) Reduction of myocardial-infarct size, *New England Journal of Medicine* 291:525-526;

Briley MS, Langer SZ, Raisman R, Sechter D, Zarifian E (1980) Tritiated imipramine binding sites are decreased in platelets of untreated depressed patients, *Science* 209:303-305;

Brindle P, Linke S, Montminy M (1993) Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors, *Nature* 364:821-824;

Broch OJ, Ueland PM (1980) Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain, *Journal of Neurochemistry* 35:484-488;

Brown IP, Thompson CI, Belloni FL (1993) Role of nitric oxide in hypoxic coronary vasodilation in isolated perfused guinea pig heart, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 264:H821-H829;

Brown R, Ollerstam A, Johansson B, Skott O, Gebre-Medhin S, Fredholm BB, Persson AE (2001a) Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A₁ receptor-deficient mice, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281:R1362-R1367;

Brown RA, Shepherd PR (2001b) Growth factor regulation of the novel class II phosphoinositide 3-kinase, *Biochemical Society Transactions* 29:535-537;

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor, *Cell* 96:857-868;

Bshesh K, Zhao B, Spight D, Biaggioni I, Feokistov I, Denenberg A, Wong HR, Shanley TP (2002) The A_{2A} receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells, *Journal of Leukocyte Biology* 72:1027-1036;

Budde JM, Velez DA, Zhao Z-Q, Clark KL, Morris CD, Muraki S, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2000) Comparative study of AMP579 and adenosine in inhibition of neutrophil-mediated vascular and myocardial injury during 24 h of reperfusion, *Cardiovascular Research* 47:294-305;

- Budde JM, Morris CD, Velez DA, Muraki S, Wang NP, Guyton RA, Zhao ZQ (2004) Reduction of infarct size and preservation of endothelial function by multidose intravenous adenosine during extended reperfusion, *Journal of Surgical Research* 116:104-115;
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter L, Luo L, Wang X (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* 15:269-290;
- Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer AM (1995) Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92:8031-8035;
- Buja LM, Burton KP, Hagler HK, Roan P, Willerson JT (1980) Calcium and lipid accumulation during evolution of experimental myocardial infarction, *Circulation* 62[Suppl III]:III144 (Abstract);
- Buja LM, Burton KP, Hagler HK, Willerson JT (1983) Quantitative x-ray microanalysis of the elemental composition of individual myocytes in hypoxic rabbit myocardium, *Circulation* 68:872-882;
- Burda P, Padilla SM, Sarkar S, Emr SD (2002) Retromer function in endosome-to-golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase, *Journal of Cell Science* 115:3889-3900;
- Burgdorf C, Richardt D, Kurz T, Seyfarth M, Jain D, Katus HA, Richardt G (2001) Adenosine inhibits norepinephrine release in the postischemic rat heart: the mechanism of neuronal stunning, *Cardiovascular Research* 49:713-720;

Burgdorf C, Schutte F, Kurz T, Dendorfer A, Richardt G (2005) Adenylyl cyclase-dependent inhibition of myocardial norepinephrine release by presynaptic adenosine A₁-receptors, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 45:1-3;

Burton KP (1988) Evidence of direct toxic effects of free radicals on the myocardium, *Free Radical Biology & Medicine* 4:15-24;

Califf RM, O'Neill W, Stack RS, Aronson L, Mark DB, Mantell S, George BS, Candela RJ, Kereiakes DJ, Abbottsmith C, al. e (1988) Failure of simple clinical characteristics to predict perfusion status after intravenous thrombolysis, *Annals of Internal Medicine* 108:658-662;

Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B, al. e (1990) Circulating IL-1 and TNF α in septic shock and experimental endotoxic fever, *Journal of Infectious Diseases* 161:79-84;

Cantrell DA (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways, *Journal of Cell Science* 114:1439-1445;

Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y (1995) Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat brain; its possible role in the febrile response, *Brain Research* 697:187-196;

Cao G, Ni X, Jiang M, Ma Y, Cheng H, Guo L, Ji C, Gu S, Xie Y, Mao Y (2002) Molecular cloning and characterization of a novel human cAMP response element-binding (CREB) gene (CREB4), *Journal of Human Genetics* 47:373-376;

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Frank TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science* 282:1318-1321;

Cargnoni A, Ceconi C, Boraso A, Bernocchi P, Monopoli A, Curello S, Ferrari R (1999) Role of A_{2A} receptor in the modulation of myocardial reperfusion damage, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 33:883-893;

Casati C, Monopoli A, Dionisotti S, Zocchi C, Bonizzoni E, Ongini E (1994) Repeated administration of selective adenosine A₁ and A₂ receptor agonists in the spontaneously hypertensive rat: Tolerance develops to A₁-mediated hemodynamic effects., *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 268:1506-1511;

Caspers GJ, Leunissen JAM, W.W. DJ (1995) The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "α-crystallin domain", *Journal of Molecular Evolution* 40:238-248;

Cassada DC, Tribble CG, Laubach VE, Nguyen B-N, Rieger JM, Linden J, Kaza AK, Long SM, Kron IL, Kern JA (2001) An adenosine A_{2A} agonist, ATL-146e; reduces paralysis and apoptosis during rabbit spinal cord reperfusion, *Journal of Vascular Surgery* 34:482-488;

Chambers DE, Yellon DM, Hearse DJ, Downey JM (1983) Effects of flubiprofen in altering the size of myocardial infarcts in dogs: reduction or delay ?, *American Journal of Cardiology* 51:884-890;

Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM (1985) Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 17:145-152;

Chapman WP, Schroeder HR, Guyer G, Brazier MAB, Fager C, Poppen JL (1954) Physiological evidence concerning the importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulating function and emotion in man, *Science* 129:949-950;

Charney DS (1998) Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression, *Journal of Clinical Psychiatry* 59 (Suppl 14):11-14;

Chatelain P, Latour JG, Tran D, de Lorgeril M, Dupras G, Bourassa M (1987) Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts : relation with extent of injury and effect of reperfusion, *Circulation* 75:1083-1090;

Cheirif J, Zoghbi WA (1991) Adenosine echocardiography: a new pharmacologic stress test, *Coronary Artery Disease* 2:564-568;

Chen JF, Huang Z, Ma J, Zhu J, Moratalla R, Standaert D, Moskowitz MA, Fink JS, Schwarzschild MA (1999) A_{2A} adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice, *Journal of Neuroscience* 19:9192-9200;

Chen JF, Moratalla R, Impagnatiello F, Grandy DK, Cuellar B, Rubinstein M, Beilstein MA, Hackett E, Fink JS, Low MJ, Ongini E, Schwarzschild MA (2001) The role of the D₂ dopamine receptor (D₂R) in A_{2A} adenosine receptor (A_{2A}R)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A_{2A} and D₂ receptor knockout mice, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 98:1970-1975;

Chen JF (2003) The adenosine A_{2A} receptor as an attractive target for Parkinson's disease treatment, *Drug News & Perspectives* 16:597-604;

Chen X, Easton D, Oh HJ, Lee-Yoon DS, Liu X, Subjeck J (1996) The 170 kDa glucose regulated stress protein is a large HSP70-, HSP110-like protein of the endoplasmic reticulum, *FEBS Letters* 380:68-72;

Chen Y, Epperson S, Makhsudova L, Ito B, Suarez J, Dillmann W, Villarreal F (2004) Functional effects of enhancing or silencing adenosine A_{2b} receptors in cardiac fibroblasts, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 287:H2478-2486;

Cheng HC, Shih HM, Chern Y (2002) Essential role of cAMP-response element-binding protein activation by A_{2A} adenosine receptors in rescuing the nerve growth factor-induced neurite outgrowth impaired by blockage of the MAPK cascade, *Journal of Biological Chemistry* 277:33930-33942;

Chern Y, Lai HL, Fong JC, Liang Y (1993) Multiple mechanisms for desensitization of A_{2A} adenosine receptor-mediated cAMP elevation in rat pheochromocytoma PC12 cells, *Molecular Pharmacology* 44:950-958;

Chicheportide Y, Bourdon R, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL (1997) TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis, *Journal of Biological Chemistry* 272:32401-32410;

Chien KR, Reeves JP, Buja LM, Bonte F, Parkey RW, Willerson JT (1981) Phospholipid alteration in canine ischemic myocardium. Temporal and topographical correlation with Tc-99m-PPi accumulation and an in vitro sarcolemmal Ca²⁺ permeability defect, *Circulation Research* 48:711-719;

Chien KR, Han A, Sen A, Buja LM, Willerson JT (1983) Accumulation of unesterified arachidonic acid in ischemic canine myocardium: relationship to a phosphatidylcholine

deacylation-reacylation cycle and depletion of membrane phospholipids, *Circulation Research* 54:313-322;

Chilian WM, Marcus ML (1984) Coronary venous outflow persists after cessation of coronary arterial inflow, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 247:H984-H990;

Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ (1995) A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions, *EMBO Journal* 14:5589-5596;

Chovan JP, Zane PA, Grenberg GE (1992) Automated-extraction, high-performance liquid chromatographic method and pharmacokinetics in rats of a highly A2-selective adenosine agonist, CGS 21680, *Journal of Chromatography* 578:77-83;

Chrousos GP, Gold P (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis, *Journal of the American Medical Association* 267:1244-1252;

Ciechanowski PS, Katon WJ, Russo JE (2000) Depression and diabetes: impact of depressive symptoms on adherence, function, and costs, *Archives of Internal Medicine* 160:3278-3285;

Claing A, Perry SJ, Achiriloaie M, Walker JKL, Albanesi JP, Lefkowitz RJ, Premont RT (2000) Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97:1119-1124;

Cohen MV, Liu GS, Downey JM (1991) Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits, *Circulation* 84:341-349;

Cohen MV, Baines CP, Downey JM (2000) Ischemic preconditioning: From adenosine receptor to K_{ATP} channel, *Annual Review in Physiology* 62:79-109;

Cohen-Cole SA, Brown FW, McDaniel JS (1993) *Assessment of depression and grief reaction in the medically ill*, In: Stoudemire A, Fogel BS, eds., *Psychiatric care of the medical patient*, London:Oxford University Press, 53-71;

Collier NC, Schesinger MJ (1986) The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts, *Journal of Cell Biology* 103:1495-1507;

Colson A, Willems B, Thissen JP (2003) Inhibition of TNF- α production by pentoxifylline does not prevent endotoxin-induced decrease in serum IGF-I, *Journal of Endocrinology* 178:101-109;

Comb M, Burnberg NC, Seascholtz A, Herbert E, Goodman HM (1986) A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element, *Nature* 323:353-356;

Concannon CG, Gorman AM, Samali A (2003) On the role of Hsp27 in regulating apoptosis, *Apoptosis* 8:61-70;

Craig EA, Kang PJ, Boorstein W (1990) A review of the role of 70 kDa heat shock proteins in protein translocation across membranes, *Antonie van Leeuwenhoek* 58:137-148;

Crofford LJ, Tan B, McCarthy CJ, Hla T (1997) Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes, *Arthritis and Rheumatism* 40:226-236;

Cronstein BN, Levin RI, Belonoff J, Weissmann G, Hirschhorn R (1986) Adenosine: An endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells, *Journal of Clinical Investigation* 78:760-770;

Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchinson AJ, Williams M (1990) The adenosine/neutrophil paradox resolved: Human neutrophils possess both A₁ and A₂ receptors that promotes chemotaxis and inhibit O₂ generation, respectively, *Journal of Clinical Investigation* 85:1150-1157;

Cronstein BN (1994) Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent, *Journal of Applied Physiology* 76:5-13;

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B, *Nature* 378:785-789;

D'Hellencourt CL, Diaw L, Cornillet P, Guenounou M (1996) Differential regulation of TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF β , and IL-10 by pentoxifylline, *International Journal of Immunopharmacology* 18:739-748;

Dalack GW, Roose SP (1990) Perspectives on the relationship between cardiovascular disease and affective disorder, *Journal of Clinical Psychiatry* 51 (suppl):4-9;

Das S, Cordis GA, Maulik N, Das DK (2005a) Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A₃ receptor activation, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 288:H328-H335;

Das S, Tosaki A, Bagchi D, Maulik N, Das DK (2005b) Resveratrol mediated activation of CREB through adenosine A₃ receptor by Akt-dependent and -independent pathways, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* In Press;

Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN (1996) 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, *Journal of Biological Chemistry* 271:30835-30839;

Datta SR, Dubek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signal to the cell-intrinsic death machinery, *Cell* 91:231-241;

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts, *Genes & Development* 13:2905-2927;

Davis M, Whalen PJ (2001) The amygdala: Vigilance and emotion, *Molecular Psychiatry* 6:3-34;

Day YJ, Huang L, McDuffie MJ, Rosin DL, Ye H, Chen JF, Schwarzschild MA, Fink JS, Linden J, Okusa MD (2003) Renal protection from ischemia mediated by A_{2A} adenosine receptors on bone marrow-derived cells, *Journal of Clinical Investigation* 112:883-891;

De Artinano AA, Gonzalez VL (1999) Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction, *Pharmacological Research* 40:113-124;

De Jong R, Out M, Maas WJ, De Jong JW (2002) Preconditioning of rat hearts by adenosine A₁ or A₃ receptor activation, *European Journal of Pharmacology* 441:165-172;

de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallée M, Clément R, Millette D, Rousseau G, Latour JG (1989) Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs, *American Heart Journal* 117:523-532;

de Lorgeril M, Basmadjian A, Clément R, Rousseau G, Latour JG (1990a) Influence of reflow ventricular fibrillation and electrical defibrillation on infarct size in a canine preparation of myocardial infarction, *Cardiovascular Research* 24:151-155;

de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, St-Jean G, Tran DC, Latour JG (1990b) Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium, *American Journal of Cardiovascular Pathology* 3:143-153;

De Maio AD (1999) Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams, *Shock* 11:1-2;

Decker RS, Wildenthal K (1978) Sequential lysosomal alterations during cardiac ischemia. II. Ultrastructural and cytochemical changes, *Laboratory Investigation* 38:662-673;

Deisher TA, Garcia I, Harlan JM (1993) Cytokine-induced adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells is not regulated by cyclic adenosine monophosphate accumulation, *Life Sciences* 53:365-370;

Deleage AM, Ferland LH, Mellon P (1987) Tissue-specific enhancer of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene: dependence on cyclic AMP-inducible elements, *Molecular & Cellular Biology* 7:3994-4002;

Delmas V, Laoide BM, Masquillier D, de Groot RP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1992) Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 15:42226-4230;

Delyani JA, Van Wylen DGL (1994) Endocardial and epicardial interstitial purines and lactate during graded ischemia, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 266:H1019-H1026;

Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades, *Journal of Biological Chemistry* 272:17269-17275;

Desai A, Victor-Vega C, Gadangi S, Montesinos MC, Chu CC, Cronstein BN (2005) Adenosine A_{2A} receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1, *Molecular Pharmacology* 67:1406-1413;

Deten A, Zimmer HG (2002) Heart function and cytokine expression is similar in mice and rats after myocardial infarction but differences occurs in TNF α expression, *Pflugers Archives European Journal of Physiology* 445:289-296;

Dickenson JM, Hill SJ (1998) Involvement of G-protein $\beta\gamma$ subunits in coupling the adenosine A₁ receptor to phospholipase C in transfected CHO cells, *European Journal of Pharmacology* 355:85-93;

Didenko VV, Hornsby PJ (1996) Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cell undergoing apoptosis but not necrosis, *Journal of Cell Biology* 135:1369-1376;

Didenko VV, Tunstead JR, Hornsby JR (1998) Biotin-labeled hairpin oligonucleotides: Probes to detect double-strand breaks in DNA in apoptotic cells, *American Journal of Pathology* 153:897-903;

Dillmann WH, Mehta HB, Barrieux A, Guth BD, Neeley WE, Ross JJ (1986) Ischemia of the dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat-shock/stress protein 71, *Circulation Research* 59:110-114;

Dixon AK, Gubitza AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat, *British Journal of Pharmacology* 118:1461-1468;

Djordjevic S, Driscoll PC (2002) Structural insights into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinase, *Trends in Biochemical Sciences* 27:426-432;

Dolphin AC, Forda SR, Scott RH (1986) Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue, *Journal of Physiology* 373:47-61;

Downey JM, Bashour FA, Stephens AJ, Kechejian SJ, Underwood RH (1973) Transmural gradients of retrograde collateral blood flow from acutely ischemic canine myocardium, *Circulation Research* 35:365-371;

Downey JM, Kirk ES (1974) Distribution of coronary flow across the canine wall during systole, *Circulation Research* 34:251-257;

Downey JM, Kirk ES (1975) Inhibition of coronary blood flow by a vascular water fall mechanism, *Circulation Research* 36:753-760;

Downey JM (1984) *Why the endocardium ?*, In: Hearse DJ, Yellon DM, eds., *Therapeutic approaches to myocardial infarct*, New York:Raven Press, 125-138;

Drevets WC, Videen TO, Price JL, Preskorn SH, Carmichael ST, Raichle ME (1992) A functional anatomical study of unipolar depression, *Journal of Neuroscience* 12:3628-3641;

Drevets WC, Gadde K, Krishnan R (1999a) *Neuroimaging studies of depression*, In: Charney DS, Nester EJ, Bunney BS, eds., *Neurobiology of mental illness*, New York:Oxford Press, 394-418;

Drevets WC (1999b) Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression, *Annals of the New York Academy of Sciences* 877:614-637;

Drevets WC (2000) Neuroimaging studies of mood disorders: Implications for a neural model of major depression, *Biological Psychiatry* 48:813-829;

Du K, Montminy M (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB, *Journal of Biological Chemistry* 273:32377-32379;

Duffy SJ, Castle SF, Harper RW, Meredith IT (1999) Contribution of vasodilator prostanoid and nitric oxide to resting flow, metabolic vasodilation, and flow-mediated dilation in human coronary circulation, *Circulation* 100:1951-1957;

Dunn RB, Griggs DM (1975) Transmural gradients in ventricular tissue metabolites produced by stopping coronary flow in the dog, *Circulation Research* 37:438-445;

Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in the rat hippocampus, *Journal of Neuroscience* 17:7673-7682;

Dwarki VJ, Montminy M, Verma IM (1990) Both the basic region and the 'leucine zipper' domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation, *EMBO Journal* 9:225-232;

Edington BV, Whelan SS, Hightower LE (1989) Inhibition of heat stress protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction, *Journal of Cellular Physiology* 139:219-228;

Efthymiou CA, Mocanu MM, Yellon DM (2005) Atorvastatin and myocardial reperfusion injury: New pleiotropic effect implicating multiple prosurvival signaling, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 45:247-252;

El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Bertorelli R, Ongini E, Costentin J, Vaugeois JM (2001) Adenosine A_{2A} receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A_{2A} receptor knockout mice, *British Journal of Pharmacology* 134:68-77;

- Elferink JGR, Deierkauf M (1985) Involvement of intracellular Ca^{2+} in chemotaxis and metabolic burst by neutrophils: the use of antagonists of intracellular Ca^{2+} , *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 50:67-81;
- Engler R, Gilpin E (1989) Can superoxide dismutase alter myocardial infarct size?, *Circulation* 79:1137-1142;
- Ewing JF, Maines MD (1991) Rapid induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase-2 is not a heat shock protein, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 88:5364-5368;
- Fan GC, Ren X, Qian J, Yuan Q, Nicolaou P, Wang Y, Jones WK, Chu G, Kranias EG (2005) Novel cardioprotective role of a small heat-shock protein, Hsp20, against ischemia/reperfusion injury, *Circulation* 111:1792-1799;
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, *Annual Reviews in Physiology* 61:243-282;
- Fedorova IM, Jacobson MA, Basile A, Jacobson KA (2003) Behavioral characterization of mice lacking the A_3 adenosine receptor: sensitivity to hypoxic neurodegeneration, *Cellular and Molecular Neurobiology* 23:431-447;
- Feigl EO (1998) Neuronal control of coronary blood flow, *Journal of Vascular Research* 35:85-92;

Feoktistov I, Biaggioni I (1995) Adenosine A_{2b} receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofyllinesensitive mechanism with implications for asthma, *Journal of Clinical Investigation* 96:1979-1986;

Feoktistov I, Goldstein AE, Biaggioni I (1999) Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal regulated protein kinase kinase in adenosine A_{2B} receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells, *Molecular Pharmacology* 55:726-34;

Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, Biaggioni I (2002) Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: Role of A_{2B} receptors in angiogenic factor regulation, *Circulation Research* 90:531-538;

Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I (2003) Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: Cooperative interaction between A_{2B} and A₃ adenosine receptors, *Circulation Research* 92:485-492;

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargoni A, Medici D (1986) Oxygen free radicals and reperfusion injury : the effect of ischemia and reperfusion on the cellular ability to neutralise oxygen toxicity, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 18[Suppl 4]:67-69;

Ferreri K, Gill G, Montminy M (1994) The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 91:1210-1213;

Fink JS, Verhave M, Kasper S, Tsukada T, Mandel G, Goodman RH (1988) The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 85:6662-6666;

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR (1978) The histopathologic evolution of myocardial infarction, *Chest* 73:843-849;

Fliss H, Gattinger D (1996) Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium, *Circulation Research* 79:949-956;

Follick MJ, Gorkin L, Capone RJ, Smith TW, Ahern DK, Stablein D, Niaura R, Visco J (1988) Psychological distress as a predictor of ventricular arrhythmias in a post-myocardial infarction population, *American Heart Journal* 116:32-36;

Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription, *Cell* 64:739-749;

Foulkes NS, Mellstrom B, Benusiglio E, Sassone-Corsi P (1992) Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator, *Nature* 355:80-84;

Fox KAA, Saffitz JE, Corr PB (1987) Pathophysiology of myocardial reperfusion, *Cardiology Clinics* 5:31-48;

Francis J, MohanKumar PS, MohanKumar SM (2001) Lipopolysaccharide stimulates norepinephrine efflux from the rat hypothalamus in vitro: blockade by soluble IL-1 receptor, *Neuroscience Letters* 308:71-74;

Francis J, Chu Y, Johnson AK, Weiss RM, Felder RB (2004a) Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 286:H2265-H2271;

Francis J, Zhang ZH, Weiss RM, Felder RB (2004b) Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 287:H791-H797;

Franke TF, D.R. K, Cantley LC, Toker A (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate, *Science* 275:665-668;

Frasere-Smith N, Lespérance F, Talajic M (1993) Depression following myocardial infarction, *Journal of the American Medical Association* 270:1819-1825;

Frasere-Smith N, Lespérance F, Talajic M (1995) Depression and 18-month prognosis after myocardial infarction, *Circulation* 91:999-1005;

Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I (1996) Adenosine A_{2A} receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-met-leu-phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 254:262-267;

Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes, *Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology* 362:364-374;

Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz K-N, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors, *Pharmacological Reviews* 53:527-552;

Fredholm BB, Cunha RA, Svenningsson P (2002) Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors and therapeutic applications, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3:413-426;

Freedhand KE, Lustman PJ, Carney RM, Hong BA (1992) Underdiagnosis of depression in patients with coronary artery disease: the role of nonspecific symptoms, *International Journal of Psychiatry in Medicine* 22:221-229;

Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J (2000) Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32:197-208;

Fry MJ (1994) Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases, *Biochimica et Biophysica Acta* 1226:237-268;

Fry MJ (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play?, *Breast Cancer Research* 3:304-312;

Fuchs E, Flugge G (2002) Social stress in tree shrews: Effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals, *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 73:247-258;

Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K (2000) Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart, *Circulation* 101:660-667;

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt, *Nature* 399:597-601;

Gaboury JP, Anderson DC, Kubes P (1994) Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocytes-endothelium cell interactions in vivo, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 266:H637-H642;

Gamble WJ, LaFarge CG, Fyler DC, Weisul J, Monroe RG (1974) Regional coronary venous oxygen saturation and myocardial oxygen tension following abrupt changes in ventricular pressure in the isolated dog heart, *Circulation Research* 34:672-681;

Ganz P, Ganz W (2001) *Coronary blood flow and myocardial ischemia*, In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, eds., *Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine*, Philadelphia:W.B. Saunders Company, 6th edition, 1087-1113;

Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL (2002) 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* 105:1497-1502;

Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E (1995) Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium: direct evidence for decreased myofilament Ca^{2+} sensitivity and altered diastolic function in intact ventricular muscle, *Circulation Research* 76:1036-1048;

Gao WD, Liu Y, Marban E (1996a) Mechanism of decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness in stunned rat ventricular myocardium: relative roles of soluble cytosolic factors versus structural alterations, *Circulation Research* 78:455-465;

Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E (1996b) Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium, *Circulation Research* 80:393-399;

Gao Z, Chen T, Weber MJ, Linden J (1999) A_{2B} adenosine and P2Y₂ receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. Cross-talk between cyclic AMP and protein kinase c pathways, *Journal of Biological Chemistry* 274:5972-5980;

Gao ZG, Mamedova LK, Chen P, Jacobson KA (2004) 2-Substituted adenosine derivatives: affinity and efficacy at four subtypes of human adenosine receptors, *Biochemical Pharmacology* 68:1985-1993;

Gauthier NS, Headrick JP, Matherne GP (1998) Myocardial function in the working mouse heart overexpressing cardiac A₁ adenosine receptors, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30:187-193;

Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD (1996) Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue, *Circulation* 94:2193-200;

Gloor P (1960) *Amygdala*, In: Society AP, eds., *Handbook of physiology. Neurophysiology*, Washington, DC:1395-1420;

Glover DK, Riou LM, Ruiz M, Sullivan GW, Linden J, Rieger JM, Macdonald TL, Watson DD, Beller GA (2005) Reduction of infarct size and post-ischemic inflammation from a

highly selective adenosine A_{2A} receptor agonist, ATL-146e, in reperfused canine myocardium, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 288:H1851-H1858;

Go LO, Murry CE, Richard VJ, Weischedel GR, Jennings RB, Reimer KA (1988) Myocardial neutrophil accumulation during reperfusion after reversible or irreversible ischemic injury, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 255:1188-1198;

Goldblum SE, Sun WL (1990) Tumor necrosis factor- α augments pulmonary arterial transendothelial albumin flux in vitro, *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 258:L57-L67;

Goldblum SE, Ding X, Campbell-Washington J (1993) TNF α induces endothelial cell F-actin depolymerization, new actin synthesis, and barrier dysfunction, *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 264:C894-C905;

Gonzalez GA, Montminy M (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133, *Cell* 59:675-680;

Gonzalez GA, Menzel P, Leonard J, Fischer WH, Montminy MR (1991) Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP responsive transcription factor CREB, *Molecular & Cellular Biology* 11:1306-1312;

Gottlieb RA, Burlison KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes, *Journal of Clinical Investigation* 94:1621-1628;

Gresele P, Agnelli G (2002) Novel approaches to the treatment of thrombosis, *Trends in Pharmacological Sciences* 23:25-32;

Grosjean SA, Arstall MA, Mitchell RN, Klappacher GW, Kelly RA, Pfeffer MA, Pfeffer JM (1999) Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor in animal models of myocardial necrosis induced by coronary artery ligation or isoproterenol injection, *Journal of Cardiac Failure* 1999:236-245;

Gruss HJ, Dower SK (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas, *Blood* 85:3378-3404;

Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P (1999) Myocyte death in the failing human heart is gender dependent, *Circulation Research* 85:856-866;

Guo Y, Bolli R, Bao W, Wu WJ, Black RG, Murphree SS, Salvatore CA, Jacobson MA, Auchampach JA (2001) Targeted deletion of the A₃ adenosine receptor confers resistance to myocardial ischemic injury and does not prevent early preconditioning, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33:825-830;

Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, Yakirevich V (1996) Tumor necrosis factor- α is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion, *Journal of the American College of Cardiology* 28:247-252;

Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ (1993) Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse, *Journal of Neuroimmunology* 47:169-176;

Haas IG (1994) BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum, *Experientia* 50:1012-1020;

Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, Montminy M (1992) Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB, *Cell* 70:105-113;

Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR (1993) Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A, *Molecular & Cellular Biology* 13:4852-4859;

Hai TW, Liu F, Coukos WJ, Green MR (1989) Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers, *Gene & Development* 3:2083-2090;

Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, Sun HY, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ (2004) Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning, *Annals of Thoracic Surgery* 78:961-969;

Hansen R, Oren M (1997) p53; from inductive signal to cellular effect, *Current Opinion in Genetics & Development* 7:46-51;

Harada N, Okajima K, Murakami K, Usune S, Sato C, Ohshima K, Katsuragi T (2000) Adenosine and selective A_{2A} receptor agonists reduce ischemia/reperfusion injury of rat liver mainly by inhibiting leukocyte activation, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294:1034-1042;

Hardman JG, Limbird LE, Molinof PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (1996) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, New York:McGraw-Hill;

Harken AH, Simson MB, Haselgrove J, Wetstein L, Harden WR, Barlow CH (1981) Early ischemia after complete coronary ligation in the rabbit, dog, pig, and monkey, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 241:H202-H210;

Hartl FU, Martin J (1992) Protein folding in the cell. The role of molecular chaperones HSP70 and HSP60, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 21:293-322;

Hartman DJ, Hoogenraad NJ, Condron R, Hoj PB (1992) Identification of a mammalian 10-kDa heat shock protein, a mitochondrial chaperonin 10 homologue essential for assisted folding of trimeric ornithine transcarbamoylase in vitro, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 89:3394-3398;

Haskó G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzcild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabó C (2000) Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A_{2a} receptor-dependent and independent mechanisms, *FASEB Journal* 14:2065-2074;

Hatayama T, Nishiyama E, Yasuda K (1994) Cellular localization of high-molecular-mass heat shock proteins in murine cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200:1367-1373;

Hattori H, Liu YC, Tohnai I, Ueda M, Kaneda T, Kobayashi T, Tanabe K, Ohtsuka K (1992) Intracellular localization and partial amino acid sequence of a stress-inducible 40-kDa protein in HeLa cells, *Cell Structure and Function* 17:77-86;

Hausenloy DJ, Yellon DM (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway, *Cardiovascular Research* 61:448-460;

Haynes J, Obiako B, Thompson WJ, Downey J (1995) Adenosine-induced vasodilation: receptor characterization in pulmonary circulation, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 268:H1862-H1868;

Hearse DJ (1977) Reperfusion of the ischemic myocardium, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 9:605-616;

Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR (1978) The oxygen paradox and the calcium paradox: Two facets of the same problem?, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 10:641-668;

Hearse DJ, Yellon DM (1984) *Why are we still in doubt about infarct size limitation? The Experimentalist's viewpoint*, In: Hearse DJ, Yellon DM, eds., *Therapeutic approaches to myocardial infarct size limitation*, New York:Raven Press Books, 17-41;

Hendrick JP, Hartl FU (1993) Molecular chaperone functions of heat shock proteins, *Annual Reviews in Biochemistry* 62:349-384;

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407:770-776;

Herrmann JM, Stuart RA, Craig EA, Neupert W (1994) Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA, *Journal of Cell Biology* 127:893-902;

Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S (1995) Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium, *American Journal of Pathology* 146:419-428;

Hillis LD, Braunwald E (1977a) Myocardial ischemia (first of three parts), *New England Journal of Medicine* 296:971-978;

Hillis LD, Braunwald E (1977b) Myocardial ischemia (second of three parts), *New England Journal of Medicine* 296:1034-1041;

Hillis LD, Braunwald E (1977c) Myocardial ischemia (third of three parts), *New England Journal of Medicine* 296:1093-1096;

Hirano N, Shibasaki F, Sakai R, Tanaka T, Nishida J, Yazaki Y, Takenawa T, Hirai H (1995) Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57/GRP58, a thiol-dependent reductase. Identification of its secretory form and inducible expression by the oncogenic transformation, *European Journal of Biochemistry* 234:336-342;

Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation, *Science* 287:1049-1053;

Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, Pannet H, Shneyvays V, Shainberg A, Goldshtaub V, Tobar A, Vidne BA (2003) Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 284:H2351-H2359;

Hollander JM, Martin JL, Belke DD, Scott BT, Swanson E, Krishnamoorthy V, Dillmann WH (2004) Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and a nonphosphorylatable

heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in a transgenic mouse model, *Circulation* 110:3544-3552;

Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, Cryns VL (1999) Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31:1709-1715;

Hori M, Kitakaze M (1991) Adenosine, the heart, and coronary circulation, *Hypertension* 18:565-574;

Horst M, Opliger W, Feifel B, Schatz G, Glick BS (1996) The mitochondrial protein import motor: dissociation of mitochondrial hsp70 from its membrane anchor requires ATP binding rather than ATP hydrolysis, *Protein Science* 5:759-767;

Hosokawa N, Takeshi SI, Yokota H, Hirayoshi K, Nagata K (1993) Structure of the gene encoding the mouse 47-kDa heat-shock protein, *Gene* 126:187-193;

Hourani SM (1996) Purinoceptors and platelet aggregation, *Journal of Autonomic Pharmacology* 16:349-352;

Huang J, Ito Y, Morikawa M, Uchida H, Kobune M, Sasaki K, Abe T, Hamada H (2003) Bcl-xL gene transfer protects the heart against ischemia/reperfusion injury, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311:64-70;

Huang J-Q, Radinovic S, Rezaiefar P, Black SC (2000) In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor administered after the onset of ischemia, *European Journal of Pharmacology* 402:139-142;

- Huang NK, Lin YW, Huang CL, Messing RO, Chern Y (2001) Activation of protein kinase A and atypical protein kinase C by A_{2A} adenosine receptors antagonizes apoptosis due to serum deprivation in PC12 cells, *Journal of Biological Chemistry* 276:13838-13846;
- Huang X, Zhang J, Lu L, Yin L, Xu M, Wang Y, Zhou Z, Sha J (2004) Cloning and expression of a novel CREB mRNA splice variant in human testis, *Reproduction* 128:775-782;
- Hutchison AJ, Webb RL, Oei HH, Ghai GR, Zimmerman MB, Williams M (1989) CGS 21680C, an A₂ selective adenosine receptor agonist with preferential hypotensive activity, *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 251:47-55;
- Ikeda U, Kurosaki K, Ohya KI, Shimada K (1997) Adenosine stimulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells, *Cardiovascular Research* 35:168-174;
- Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C, Murphy E (2004) Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury, *Circulation Research* 95:734-741;
- Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P (1999) Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor- α in postinfarction dysfunctional myocardium, *Circulation* 99:1492-1498;
- Itob G, Tamura J, Suzuki M, Susuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K (1995) DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labelling method and DNA agarose gel electrophoresis, *American Journal of Pathology* 146:1325-1331;

Jacob U, Lilie H, Meyer I, Buchner J (1995) Transient interaction of HSP90 with early unfolding intermediates of citrate synthase, *Journal of Biological Chemistry* 270:7288-7294;

Jacobson MA, Johnson RG, Luneau CJ, Salvatore CA (1995) Cloning and chromosomal localization of the human A2b adenosine receptor gene (ADORA2B) and its pseudogene, *Genomics* 27:374-376;

James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB, Alessi DR (1996) Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate without sequence activation, *Biochemical Journal* 315:709-713;

Jameson JL, Jaffe RC, Gleason SL, Habener JF (1986) Transcriptional regulation of chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit gene expression by 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate, *Endocrinology* 119:2560-2567;

Jarvis MF, Schulz R, Hutchinson AJ, Do UH, Sills MA, Williams M (1989) [³H]CGS 21680, a selective A₂ adenosine receptor agonist, directly labels A₂ receptors in rat brain, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 251:888-893;

Jennings RB, Ganote CE (1974a) Structural changes in myocardium during acute ischemia, *Circulation Research* 34-35[Suppl III]:III156-III168;

Jennings RB, Ganote CE (1974b) Structural changes in myocardium during acute myocardial infarction, *Circulation Research* 34-35:III156-III168;

Jennings RB, Ganote CE (1976) Mitochondrial Structure and Function in Acute Myocardial Ischemic Injury, *Circulation Research* 38[Suppl I]:I80-I89;

Jennings RB, Reimer KA (1983) Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effects of reperfusion of arterial blood, *Circulation* 68[Suppl I]:I25-I36;

Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C, Reimer KA (1985) Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure, *Circulation Research* 56:262-278;

Jennings RB, Sebbag L, Schwartz LM, Crago MS, Reimer KA (2001) Metabolism of preconditioned myocardium: Effect of loss and reinstatement of cardioprotection, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33:1571-1588;

Jewett SL, Eddy LJ, Hochstein P (1989) Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion ?, *Free Radical Biology & Medicine* 6:323-326;

Ji XD, Jacobson KA (1999) Use of the triazolotriazine [³H]ZM241385 as a radioligand at recombinant human A_{2B} adenosine receptors, *Drug Design & Discovery* 16:217-226;

Jiang J, van Rhee AM, Chang L, Patchornik A, Ji XD, Evans P, Melman N, Jacobson KA (1997) Structure-activity relationships of 4-(phenylethynyl)-6-phenyl-1,4-dihydropyridines as highly selective A₃ adenosine receptor antagonists, *Journal of Medicinal Chemistry* 40:2596-2608;

Jiang W, Babyak M, Krantz DS, Waugh RA, Coleman RE, Hanson MM, Frid DJ, McNulty S, Morris JJ, O'Connor CM, Blumenthal JA (1996) Mental stress-induced myocardial ischemia and cardiac events, *Journal of the American Medical Association* 276:1651-1656;

Johansson B, Ahlberg S, van Der Ploeg I, Brené S, Lindefors N, Persson H, Fredholm BB (1993) Effect of long term caffeine treatment on A₁ and A₂ adenosine receptor binding and on mRNA levels in rat brain, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 347:407-414;

Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu Xj, Hårdemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A₁ receptor, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 98:9407-9412;

Jolly SR, Kane WJ, Baillie MB, Abrams GD, Lucchesi BR (1984) Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combine administration of superoxide dismutase and catalase, *Circulation Research* 54:277-285;

Jonassen AK, Aasum E, Riemersma RA, Mjos OD, Larsen TS (2000a) Glucose-insulin-potassium reduces infarct size when administered during reperfusion., *Cardiovascular Drug & Therapy* 14:615-623;

Jonassen AK, Brar BK, Mjos OD, Sack MN, Latchman DS, Yellon DM (2000b) Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32:757-764;

Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, Yellon DM (2001a) Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling, *Circulation Research* 89:1191-1198;

Jonassen AK, Sack MK, Mjøs OD, D.M. Y (2001b) Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling, *Circulation Research* 89:1191-1198;

Jonassen AK, Mjøs OD, Sack MN (2004) p70s6 kinase is a functional target of insulin-activated Akt cell-survival signaling, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315:160-165;

Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, Taft S, Vinten-Johansen J (1997) Adenosine A₂ receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280:301-309;

Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RKB, Nakamura J, Kase H, Kuwana Y, Jenner P (1998) Adenosine A_{2A} antagonists: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys, *Annals of Neurology* 43:507-513;

Kang PJ, Osterman J, Shiling J, Neupert W, Craig EA, Pfanner N (1990) Requirement for HSP70 in the mitochondrial matrix for translocation of precursor proteins, *Nature* 348:137-142;

Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL (1995) Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration, *Journal of Clinical Investigation* 96:1042-1052;

Kapp BS (1992) *Amygdaloid contributions to conditioned arousal and sensory information processing*, In: Aggleton JP, eds., *The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*, New York:Wiley-Liss, 229-254;

Karliner JS (2005) Symbols within words: Have we neglected the Adenosine A₂ receptor?, *Cardiovascular Research* 763-765;

Katzung BG (2001) *Basic & Clinical Pharmacology*, New York:McGraw-Hill;

Kaul SC, Wadhwa R, Komatsu Y, Sugimoto Y, Mitsui Y (1993) On the cytosolic and perinuclear mortalin: an insight by heat shock, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193:348-355;

Kaul SC, Taira K, Pereira-Smith OM, Wadhwa R (2002) Mortalin: present and prospective, *Experimental Gerontology* 37:1157-1164;

Kelekar A, Thompson CB (1998) Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis, *Trends in Cell Biology*; 8:324-330;

Kendler KS, Kessler RC, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ (1993) The prediction of major depression in women: towards an integrated etiologic model, *American Journal of Psychiatry* 150:1139-1148;

Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2005) Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors., *Basic Research in Cardiology* 100:In Press;

Kiec-Kononowicz NK, Drabczynska A, Pełkalska E, Michalak E, Müller CE, Schumacher B, Karolak-Wojciechowska J, Duddeck H, Rockitt S, Wartchow R (2001) New

developments in A₁ and A₂ adenosine receptor antagonists, *Pure and Applied Chemistry* 73:1411-1420;

Kim YC, Ji X, Jacobson KA (1996) Derivatives of the triazoloquinazoline adenosine antagonist (CGS15943) are selective for the human A₃ receptor subtype, *Journal of Medicinal Chemistry* 39:4142-4148;

Kim YC, Karton Y, Ji X, Melman N, Linden J, Jacobson KA (1999) Acyl-hydrazide derivatives of a xanthine carboxylic congener (XCC) as selective antagonists at human A_{2B} adenosine receptors, *Drug Development Research* 47:178-188;

Kim YC, Ji X, Melman N, Linden J, Jacobson KA (2000) Anilide derivatives of an 8-phenylxanthine carboxylic congener are highly potent and selective antagonists at human A_{2B} adenosine receptor, *Journal of Medicinal Chemistry* 43:1165-1172;

Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2004) Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion, *Cardiovascular Research* 62:74-85;

Kingma JGJ (1999) Cardiac adaptation to ischemia-reperfusion injury, *Annals of the New York Academy of Sciences* 874:83-99;

Kirchhoff SR, Gupta S, Knowlton AA (2002) Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury, *Circulation* 105:2899-2904;

Kirk ES, Honig CR (1964) An experimental and theoretical analysis of myocardial tissue pressure, *American Journal of Physiology* 207:361-367;

Kirshenbaum LA, de Moissac D (1997) The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes, *Circulation* 96:1580-1585;

Kis A, Baxter GF, Yellon DM (2003) Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A₁/A₂ receptor agonist: role of A_{2A} receptor and Erk1/2, *Cardiovascular Drugs and Therapy* 17:415-425;

Kiselgof E, Tulshian DB, Arik L, Zhang H, Fawzi A (2005) 6-(2-Furanyl)-9H-purin-2-amine derivatives as A_{2A} adenosine antagonists, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15:2119-2122;

Kitakaze M, Node K, Komamura K, Minamino T, Inoue M, Hori M, Kamada T (1995) Evidence for nitric oxide generation in the cardiomyocytes: its augmentation by hypoxia, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27:2149-2154;

Kleiger RE, Miller JP, Bigger JTJ, Moss AJ (1987) Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction, *American Journal of Cardiology* 59:256-262;

Kloner RA, Ganote CE, Whalen DA, Jennings RB (1974) Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow, *American Journal of Pathology* 74:399-422;

Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E (1983) Studies of experimental coronary artery reperfusion: Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damages, *Circulation* 68:I8-I15;

Klotz KN, Hessling J, Hegler J, Owman C, Kull B, Fredholm BB, Lohse MJ (1998) Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 357:1-9;

Klotz KN, Camaioni E, Volpini R, Kachler S, Vittori S, Cristalli G (1999) 2-substituted N-ethylcarboxamidoadenosine derivatives as high-affinity agonists at human A₃ adenosine receptors, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 360:103-108;

Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, Goldberg M, Allen T, Barber MJ, Green DR, Newmeyer DD (1999) The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol, *Journal of Cell Biology* 147:809-822;

Klüver H, Bucy PC (1937) "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys, *American Journal of Physiology* 119:352-353;

Knowlton AA, Brecher P, Apstein CS (1991) Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia, *Journal of Clinical Investigation* 87:139-147;

Kobayashi K, Neely JR (1979) Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle, *Circulation Research* 44:166-175;

Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Polvilshock JT, Rowe T, Hess ML (1985) Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats, *Circulation Research* 57:142-151;

Kopecky SL, Aviles RJ, Bell MR, Lobl JK, Tipping D, Frommell G, Ramsey K, Holland AE, Midei M, Jain A, Kellet M, Gibbons RJ (2003) A randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-ranging study measuring the effect of an adenosine agonist on infarct size reduction in patients undergoing primary percutaneous transluminal coronary angioplasty: the ADMIRE (AmP579 delivery for myocardial infarction REduction) study, *American Heart Journal* 146:146-152;

Koyasu S, Nishida T, Kadowaki T, Matsuzaki F, Iida K, Harada F, Kasuga M, Sakai H, Yahara I (1986) Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100 are actin-binding proteins, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 83:8054-8055;

Krugmann S, Hawkins PT, Pryer N, Braselmann S (1999) Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110 γ phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G $\beta\gamma$ subunits, *Journal of Biological Chemistry* 274:17152-17158;

Kull B, Arslan G, Nilsson C, Owman C, Lorenzen A, Schwabe U, Fredholm BB (1999a) Differences in the order of potency for agonists, but not antagonists, at human and rat adenosine A_{2A} receptors, *Biochemical Pharmacology* 57:65-75;

Kull B, Ferre S, Arslan G, Svenningsson P, Fuxe K, Owman C, Fredholm BB (1999b) Reciprocal interactions between adenosine A_{2A} and dopamine D₂ receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors, *Biochemical Pharmacology* 58:1035-1045;

Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE (1996) Tumor necrosis factor- α and interleukin 1- β are responsible for the in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum, *Journal of Experimental Medicine* 183:949-958;

Kuwahara K, Saito Y, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Nakao K (2000) Cardiotrophin-1 phosphorylates Akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocyte, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32:1385-1394;

Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M (1993) Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia, *Circulation Research* 72:1293-1299;

Lacroix S, Rivest S (1998) Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain, *Journal of Neurochemistry* 70:452-466;

Ladwig KH, Kieser M, König J, Breithardt G, Borggrefe M (1991) Affective disorders and survival after acute myocardial infarction. Results from the post-infarction late potential study, *European Heart Journal* 12:959-964;

Laflamme N, Lacroix S, Rivest S (1999) An essential role of interleukin-1 β in mediating NF- κ B activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to systemic and localized inflammation, but not during endotoxemia, *Journal of Neuroscience* 19:10923-10930;

- Laghrissi-Thode F, Wagner WR, Pollock BG, Johnson PC, Finkel MS (1997) Elevated platelet factor 4 and beta-thromboglobulin plasma levels in depressed patients with ischemic heart disease, *Biological Psychiatry* 42:290-295;
- Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F, Sassone-Corsi P (1993) The functional versatility of CREM is determined by its modular structure, *EMBO Journal* 12:1179-1191;
- Lappas CM, Rieger JM, Linden J (2005) A_{2A} adenosine receptor induction inhibits IFN- γ production in murine CD4⁺ T cells, *Journal of Immunology* 174:1073-1080;
- Lasley RD, Mentzer RM (1992) Adenosine improves recovery of postischemic myocardial function via an adenosine A₁ receptor mechanism, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 263:H1460-H1465;
- Lasley RD, Mentzer RM (1993) Pertussis toxin blocks adenosine A₁ receptor mediated protection of the ischemic rat heart, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 25:815-821;
- Lasley RD, Jahania MS, Mentzer Jr. RM (2001a) Beneficial effects of adenosine A_{2a} agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 280:H1660-H1666;
- Lasley RD, Narayan P, Mentzer Jr RM (2001b) New insights into adenosine receptor modulation of myocardial ischemia-reperfusion injury, *Drug Development Research* 52:357-365;
- Latchman DS (2001) Heat shock proteins and cardiac protection, *Cardiovascular Research* 51:637-646;

Latini R, Bianchi M, Correale E, Dinarello CA, Fantuzzi G, Fresco C, Maggioni AP, Mengozzi M, Romano S, Shapiro L (1994) Cytokines in acute myocardial infarction: selective increase in circulating tumor necrosis factor, its soluble receptor, and interleukin 1 receptor antagonist, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 23:1-6;

Lau S, Patnaik N, Sayen MR, Mestral R (1997) Simultaneous overexpression of two stress proteins in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against ischemia-induced injury, *Circulation* 96:2287-2296;

Lavallée M, Cox D, Patrick TA, Vatner SF (1983) Salvage of myocardial function by coronary artery reperfusion 1, 2, and 3 hours after occlusion in conscious dogs, *Circulation Research* 53:235-247;

Laws KH, Clanton JA, Starnes VA, Lupinetti FM, Collins JC, Oates JA, Hammon JW (1983) Kinetics and imaging of indium-111-labeled autologous platelets in experimental myocardial infarction, *Circulation* 67:110-116;

Le Vraux V, Chen YL, Masson I, De Sousa M, Giroud JP, Florentin I, Chauvelot-Moachon L (1993) Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists, *Life Sciences* 52:1917-1924;

Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor, *Nature* 388:674-678;

LeDoux JE (1987) *Emotion*, In: Mills J, Mountcastle VB, Plum F, Geiger SR, eds., *Handbook of physiology - The nervous system*, Baltimore, MD:Williams & Wilkins, 373-417;

LeDoux JE (1998) *The Emotional Brain*, New York:Simon & Schuster;

LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain, *Annual Reviews in Neuroscience* 23:155-184;

Lee HT, Emala CW (2002a) Adenosine attenuates oxidant injury in human proximal tubular cells via A₁ and A_{2a} adenosine receptors, *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 282:F844-F852;

Lee HT, Emala CW (2002b) Characterization of adenosine receptors in human kidney proximal tubule (HK-2) cells, *Experimental Nephrology* 10:383-392;

Lees-Miller SP, Anderson CW (1989) The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 alpha at two NH₂-terminal threonine residues, *Journal of Biological Chemistry* 264:17275-17280;

Li G, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, Liu Y, Kajstura J, Baserga R, Anversa P (1997) Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy, *Journal of Clinical Investigation* 100:1991-1999;

Li RC, Row BW, Gozal E, Kheirandish L, Fan Q, Brittan KR, Guo SZ, Sachleben LRJ, Gozal D (2003) Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rat, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168:469-475;

Li YW, Whittaker P, Kloner RA (1992) The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia, *American Heart Journal* 123:346-353;

Li Z, Menoret A, Srivastava P (2002) Role of heat shock proteins in antigen presentation and cross-preservation, *Current Opinion in Immunology* 14:45-51;

Liang BT, Haltiwanger B (1996) Adenosine A_{2a} and A_{2b} receptors in cultured fetal chick heart cells. High- and low-affinity coupling to stimulation of myocytes contractility and cAMP accumulation, *Circulation Research* 76:242-251;

Liao Z, Brar BK, Cai Q, Stephanou A, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS (2002) Cardiotrophin-1 (CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion, *Cardiovascular Research* 53:902-910;

Lin HY, Masso-Welch P, Di YP, Cai JW, Shen JW, Subject JR (1993) The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin, *Molecular Biology of the Cell* 4:1109-1119;

Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestral R, Scheffler IE, Dillmann WH (2001) Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation, *Circulation* 103:1787-1792;

Linden J, Taylor HE, Robeva AS, Tucker AL, Stehle JH, Rivkees SA, Fink JS, Reppert SM (1993a) Molecular cloning and functional expression of a sheep A₃ adenosine receptor with widespread tissue distribution, *Molecular Pharmacology* 44:524-532;

- Linden J, Tucker AL, Robeva AS, Graber SG, Munshi R (1993b) Properties of recombinant adenosine receptors, *Drug Development Research* 28:232-236;
- Linden J (1994) Cloned adenosine A₃ receptors: Pharmacological properties, species differences and receptor functions, *Trends in Pharmacological Science* 15:298-306;
- Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS (1999) Characterization of human A_{2B} adenosine receptors: radioligand binding, Western blotting, and coupling to G_q in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells, *Molecular Pharmacology* 56:705-713;
- Linden J (2001) Molecular approach to adenosine receptors: Receptors-mediated mechanisms of tissue protection, *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* 41:775-787;
- Linden J, Tucker AL, Price R, Youkey R (2003) *Use of selective A₁ receptor agonists, antagonists and allosteric enhancers to manipulate angiogenesis*, US Patent Application No. 20030212082;
- Linden J (2005) Perspective: Adenosine in tissue protection and tissue regeneration, *Molecular Pharmacology* 67:1385-1387;
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat shock proteins, *Annual Reviews in Genetics* 22:631-677;
- Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, Wilder RL, Elenkov IJ, 164:436-442. Ji (2000) Ligand-activation of the adenosine A_{2a} receptors inhibits IL-12 production by human monocytes, *Journal of Immunology* 164:436-442;

Lipšić E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJH, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG (2004) Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 44:473-479;

Liu GS, Richards SC, Olsson RA, Mullane K, Walsh RS, Downey JM (1994) Evidence that the adenosine A₃ receptor may mediate the protection afforded by preconditioning in the isolated rabbit heart, *Cardiovascular Research* 28:1057-1061;

Liu Y, Gao WD, O'Rourke B, Marban E (1997) Priming effect of adenosine on KATP currents in intact ventricular myocytes: implications for preconditioning, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 273:H1637-H1643;

Lloyd HG, Fredholm BB (1995) Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices, *Neurochemistry International* 26:387-395;

Lochner A, Marais E, Genade S, Huisamen B, Moolman JA (2004) Events downstream of p38MAPK (p38) in ischaemic preconditioning (PC): HSP27 and CREB, *Cardiovascular Journal of South Africa* 15:S4-S5 (Abstract);

Longhurst JC, Tjen ALSC, Fu LW (2001) Cardiac sympathetic afferent activation provoked by myocardial ischemia and reperfusion. Mechanisms and reflexes, *Annals of the New York Academy of Sciences* 940:74-95;

- Lopes LV, Cunha RA, Ribeiro JA (1999) ZM241385, an adenosine A_{2A} receptor antagonist, inhibits hippocampal A₁ receptor responses, *European Journal of Pharmacology* 383:395-398;
- Lopes LV, Cunha RA, Kull B, Fredholm BB, Ribeiro JA (2002) Adenosine A_{2A} receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A₁ receptor inhibition, *Neuroscience* 112:319-329;
- Lozza G, Conti A, Ongini E, Monopoli A (1997) Cardioprotective effects of adenosine A₁ and A_{2A} receptor agonists in the isolated rat heart, *Pharmacological Research* 35:57-64;
- Lucassen PJ, Muller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, Hoogendijk WJ, De Kloet ER, Swaab DF (2001) Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure, *American Journal of Pathology* 158:453-468;
- Lucassen PJ, Fuchs E, Czéh B (2004) Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex, *Biological Psychiatry* 55:789-796;
- Lukashev D, Ohta A, Apasov S, Chen JF, Sitkovsky M (2004) Physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the G_s protein-coupled A_{2A} adenosine receptor in vivo, *Journal of Immunology* 173:21-24;
- Lynge J, Schulte G, Nordsborg N, Fredholm BB, Hellsten Y (2003) Adenosine A_{2B} receptors modulate cAMP levels and induce CREB but not ERK1/2 and p38 phosphorylation in rat skeletal muscle cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307:180-187;

MacCollin M, Peterfreund R, MacDonald M, Fink JS, Gusella J (1994) Mapping of a human A_{2a} adenosine receptor (ADORA2) to chromosome 22, *Genomics* 20:332-333;

Macfarlane NG, Miller DJ (1992) Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat, *Circulation Research* 70:1217-1224;

Maddock HL, Mocanu MM, Yellon DM (2002) Adenosine A₃ receptor activation protects the myocardium from reperfusion/reoxygenation injury, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 283:H1307-H1313;

Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata A, DiCarli MF, Leeser MA, Browne KF, Eisenberg PR, Bolli R, Casas AC, Molina-Viamonte V, Orlandi C, Blevins R, Gibbons RJ, Califf RM, Granger CB (1999) Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: The Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial, *Journal of the American College of Cardiology* 34:1711-1720;

Makujina SR, Mustafa SJ (1993) Adenosine-5'-uronamides rapidly desensitize the adenosine A₂ receptor in coronary artery, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22:506-509;

Mallory G, White P, Salcedo-Salgar J (1939) The speed of healing of myocardial infarction, *American Heart Journal* 18:647-671;

Mann DL (1996) Stress activated cytokines and the heart, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 7:341-354;

Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM (1993) Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction, *Circulation* 88:1264-1272;

Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH (1995) Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury, *Journal of Clinical Investigation* 95:1446-1456;

Marcinkiewicz J, Grabowska A, Lauterbach R, Bobek M (2000) Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages, *Immunopharmacology* 49:335-343;

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, Ashkenazi A (1998) Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3, *Current Biology* 8:525-528;

Martin BJ, Lasley RD, Mentzer RM (1997a) Infarct size reduction with the nucleoside transport inhibitor R-75231 in swine, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 272:H1857-H1865;

Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL, Dillmann WH (1997b) Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes, *Circulation* 96:4343-4348;

Martin TW, Seaworth JF, Johns JP, Pupa LE, Condos WR (1992) Comparison of adenosine, dipyridamole, and dobutamine in stress echocardiography, *Annals of Internal Medicine* 116:190-196;

Massey KD, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Standiford TJ (1995) Cardiac myocytes release leukocyte-stimulating factors, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 269:H980-H987;

Matasi JJ, Caldwell JP, Hao J, Neustadt B, Arik L, Foster CJ, Lachowicz J, Tulshian DB (2005) The discovery and synthesis of novel adenosine receptor (A_{2A}) antagonists, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15:1333-1336;

Matherne GP, Linden J, Byford AM, Gauthier NS, Headrick JP (1997) Transgenic A_1 adenosine receptor overexpression increases myocardial resistance to ischemia, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 94:6541-6546;

Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee K-H, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A (2001) Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo, *Circulation* 104:330-335;

Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:599-609;

McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury, *New England Journal of Medicine* 312:159-163;

McCurrach ME, Connor TM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Lowe SW (1997) Bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-

dependent apoptosis, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 94:2345-2349;

McIntyre TM, Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM (1995) *Oxygen radical-mediated leukocytes adherence*, In: Granger DN, Schmid-Schönbein GW, eds., *Physiology and pathophysiology of leukocyte adhesion*, New-York:Oxford University Press, 261-277;

McVey MJ, Smits GJ, Cox BF, J.M. K, Clark KL, Perrone MH (1999) Cardiovascular pharmacology of the adenosine A₁/A₂-receptor agonist AMP 579: coronary hemodynamic and cardioprotective effects in the canine myocardium, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 33:703-710;

Megson AC, Dickenson JM, Townsend-Nicholson A, Hill SJ (1995) Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A₁-receptors and constitutive P₂-purinoceptors in CHO-K1 cells, *British Journal of Pharmacology* 115:1415-1424;

Meldrum DR (1998) Tumor necrosis factor in the heart, *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 274:R577-R595;

Meng H, McVey M, Perrone M, Clark KL (2000) Intravenous AMP 579, a novel adenosine A₁/A_{2a} receptor agonist, induces a delayed protection against myocardial infarction in minipig, *European Journal of Pharmacology* 387:101-105;

Meng X, Brown JM, Ao L, Franklin W, Banerjee A, Harken AH (1996) Heat shock protein 70 contributes to the induced cardiac resistance to bacterial lipopolysaccharide in the rat, *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 271:C1316-C1324;

- Merkel L, Rojas CJ, Jarvis MF, Cox BF, Fink C, Smits GJ, Spada AP, Perrone MH, Clark KL (1998a) Pharmacological characterization of AMP 579, a novel adenosine A₁/A₂ receptor agonist and cardioprotective, *Drug Development Research* 45:30-43;
- Merkel L, Hawkins ED, Colussi DJ, al. e (1998b) Pharmacological characterization of AMP 579: a novel A₁/A₂ adenosine receptor agonist and cardioprotective, *FASEB Journal* 12:A78;
- Miao W, Luo Z, Kitsis R, Walsh K (2000) Intracoronary, adenovirus-mediated Akt gene transfer in hearts limits infarct size following ischemia-reperfusion injury in vivo, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32:2397-2402;
- Michelson D, Stratakis C, Hill L, Reynolds J, Galliven E, Chrousos G, Gold P (1996) Bone mineral density in women with depression, *New England Journal of Medicine* 335:1176-1181;
- Minelli A, Liguori L, Bellazza I, Mannucci R, Johansson B, Fredholm BB (2004) Involvement of A₁ adenosine receptors in the acquisition of fertilizing capacity, *Journal of Andrology* 25:286-292;
- Miura T, Yellon DM, Hearse DJ, Downey JM (1987) Determinants of infarct size during permanent occlusion of a coronary artery in the closed chest dog, *Journal of the American College of Cardiology* 9:647-654;
- Miura T, Goto M, Urabe K, Endoh A, Shimamoto K, Imura O (1991) Does myocardial stunning contribute to infarct size limitation by ischemic preconditioning?, *Circulation* 84:2504-2512;

- Miura T, Liu Y, Kita H, Ogawa T, Shimamoto K (2000) Roles of mitochondrial ATP-sensitive K channels and PKC in anti-infarct tolerance afforded by adenosine A₁ receptor activation, *Journal of the American College of Cardiology* 35:238-245;
- Miyazaki S, Fujiwara H, Onodera T, Kihara Y, Matsuda M, Wu DJ, Nakamura Y, Kumada T, S. S, Kawai C (1987) Quantitative analysis of contraction band and coagulation necrosis after ischemia and reperfusion in the porcine heart, *Circulation* 75:1074-1082;
- Mocanu MM, Baxter GF, Yellon DM (2000) Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury, *British Journal of Pharmacology* 130:197-2000;
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor, *Cell* 75:875-886;
- Monopoli A, Lozza G, Forlani A, Mattavelli A, Ongini E (1998) Blockade of adenosine A_{2A} receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischemia, *NeuroReport* 19:3955-3959;
- Montminy M (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP, *Annual Reviews in Biochemistry* 66:807-822;
- Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH (1986) Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 83:6682-6686;

Morita K, Mori H, Tsujioka K, Kimura A, Ogasawara Y, Goto M, Hiramatsu O, Kajiya F, Feigl EO (1997) α -adrenergic vasoconstriction reduces systolic retrograde coronary blood flow, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 273:H2746-H2755;

Morris AC, Hagler HK, Willerson JT, Buja LM (1989) Relationship between calcium loading and impaired energy metabolism during Na⁺, K⁺ pump inhibition and metabolic inhibition in cultured neonatal rat cardiac myocytes, *Journal of Clinical Investigation* 83:1876-1887;

Morrison RR, Hassan Talukder MA, Ledent C, Mustafa SJ (2002) Cardiac effects of adenosine in A2A receptor knockout hearts: uncovering A2B receptors, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 282:H437-H444;

Möser GH, Schrader J, Deussen A (1989) Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 256:C799-C806;

Mubagwa K, Mullane K, Flameng W (1996) Role of adenosine in the heart and circulation, *Cardiovascular Research* 32:797-813;

Mubagwa K, Flameng W (2001) Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: An updated overview, *Cardiovascular Research* 52:;

Mullane K, Bullough D (1995) Harnessing an endogenous cardioprotective mechanism: cellular sources and sites of action of adenosine, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27:1041-1054;

Mullane KM, Read N, Salmon JA, Moncada S (1984) Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs, *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 228:255-266;

Mullane KM, McGriff JC (1985) Platelet depletion and infarct size in an occlusion-reperfusion model of myocardial ischemia in anesthetized dogs, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 7:733-738;

Müller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR (1997) Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53, *Journal of Clinical Investigation* 99:403-413;

Mundell SJ, Benovic JL, Kelly E (1997) A dominant negative mutant of the G protein-coupled receptor kinase 2 selectively attenuates adenosine A₂ receptor desensitization., *Molecular Pharmacology* 51:991-998;

Murga C, Laguine L, Wetzker R, Cuadrado A, Gutkind JS (1998) Activation of Akt/Protein Kinase B by G Protein-coupled Receptors. A role for α and $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase γ , *Journal of Biological Chemistry* 273:19080-19085;

Murray TF (1982) Up-regulation of rat cortical adenosine receptors following chronic administration of theophylline, *European Journal of Pharmacology* 82:113-114;

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium, *Circulation* 74:1124-1136;

- Murthy MS, Pande SV (1994) A stress-regulated protein, GRP58, a member of thioredoxin superfamily, is a carnitine palmitoyltransferase isoenzyme, *Biochemical Journal* 304:31-34;
- Musselman DL, Tomer A, Manatunga AK, Knight BT, Porter MR, Kasey S, Marzec U, Harker LA, Nemeroff CB (1996) Exaggerated platelet reactivity in major depression, *American Journal of Psychiatry* 153:1313-1317;
- Musselman DL, Evans DL, Nemeroff CB (1998) The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment, *Archive of General Psychiatry* 55:580-592;
- Nadeau S, Rivest S (1999) Effects of circulating tumor necrosis factor (TNF) on the neuronal activity and expression of the genes encoding the TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier, *Neuroscience* 93:1449-1464;
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor, *Cell* 88:355-365;
- Nakai A, Satoh M, Hirayoshi K, Nagata K (1992) Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum, *Journal of Cell Biology* 117:903-914;
- Neely JR, Morgan HE (1974) Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle, *Annual Reviews in Physiology* 36:413-459;
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients, *Science* 226:1342-1344;

Neuss M, Crow MT, Chesley A, Lakatta EG (2001) Apoptosis in Cardiac Disease—What is it—How Does it Occur, *Cardiovascular Drugs and Therapeutics* 15:507-523;

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2002) Innate immunity: The missing link in neuroprotection and neurodegeneration?, *Nature Reviews Neuroscience* 3:216-2227;

Nieuwenhuys R (1996) The greater limbic system, the emotional motor system and the brain, *Progress in Brain Research* 107:551-580;

Nishizawa J, Nakai A, Higashi T, Tanabe M, Nomoto S, Matsuda K, Ban T, Nagata K (1996) Reperfusion causes significant activation of heat shock transcription factor 1 in ischemic rat heart, *Circulation* 94:2185-2192;

Nonaka H, Saki M, Ichimura M, Kase H (1997) Novel potent adenosine A_{2A} receptor antagonists, *Movement Disorders* 12(Suppl 1):452;

Offermanns S, Simons MI (1995) G_{α15} and G_{α16} couple a wide variety of receptors to phospholipase C, *Journal of Biological Chemistry* 270:15175-15180;

Oh HJ, Chen X, Subject JR (1997) Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance, *Journal of Biological Chemistry* 272:31636-31640;

Ohisalo JJ (1987) Regulatory functions of adenosine, *Medical Biology* 65:181-191;

Ohta A, Sitkovsky M (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage, *Nature* 414:916-920;

Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, Virmani R (1987) Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon, *Circulation* 76:1135-1145;

Olah ME (1997) Identification of A_{2a} adenosine receptor domains involved in selective coupling to Gs. Analysis of chimeric A₁/A₂ adenosine receptors, *Journal of Biological Chemistry* 272:337-344;

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, DiLoreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P (1997) Apoptosis in the failing human heart, *New England Journal of Medicine* 336:1131-1141;

Ongini E, Dionisotti S, Gessi S, Irenius E, Fredholm BB (1999) Comparaison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 359:7-10;

Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S (1998) Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling, *Circulation* 98:149-156;

Ordway GA, Klimek V, Mann JJ (2002) *Neurocircuitry of mood disorders*, In: Davis KL, Charney D, Nemeroff C, eds., *Neuropsychopharmacology: The 5th generation of progress*, Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 1051-1064;

Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression, *Molecular & Cellular Biology* 15:3032-3040;

Palmer TM, Gettys TW, Jacobson KA, Stiles GL (1994) Desensitization of the canine A_{2a} adenosine receptor: Delineation of multiple processes, *Molecular Pharmacology* 45:1082-1094;

Palmer TM, Stiles GL (1995a) Adenosine receptors, *Neuropharmacology* 34:683-694;

Palmer TM, Gettys TW, Stiles GL (1995b) Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A₃ adenosine receptor, *Journal of Biological Chemistry* 270:16895-16902;

Palmer TM, Benovic JL, Stiles GL (1996) Molecular basis for subtype-specific desensitization of inhibitory adenosine receptors. Analysis of a chimeric A₁-A₃ adenosine receptor, *Journal of Biological Chemistry* 271:15272-15278;

Palmer TM, Stiles GL (1997a) Identification of an A_{2a} adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization, *Biochemistry* 36:832-838;

Palmer TM, Stiles GL (1997b) Structure-function analysis of inhibitory adenosine receptor regulation, *Neuropharmacology* 36:1141-1147;

Palmer TM, Stiles GL (2000) Identification of threonine residues controlling the agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A₃ adenosine receptor, *Molecular Pharmacology* 57:539-545;

Pan W, Zadina JE, Harlan RE, Weber JT, Banks WA, Kastin AJ (1997) Tumor necrosis factor- α : a neuromodulator in the CNS, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21:603-613;

Parsons WJ, Stiles GL (1987) Heterologous desensitization of the inhibitory A₁ adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat adipocytes, *Journal of Biological Chemistry* 262:841-847;

Paykel E (1979) *Causal relationships between clinical depression and life events*, In: Barret JE, eds., *Stress and mental disorders*, New York:Raven Press, ;

Peakman MC, Hill SJ (1994) Adenosine A_{2B}-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes, *British Journal of Pharmacology* 111:191-198;

Peart JN, Flood A, Linden J, Matherne GP, Headrick JP (2002) Adenosine-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 39:117-129;

Peart JN, Gross GJ (2005) Cardioprotection following adenosine kinase inhibition in rat hearts, *Basic Research in Cardiology* 100:328-336;

Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B, Kroemer G (1996) Mitochondria and programmed cell death: back to the future, *FEBS Letters* 396:7-13;

Pierce KD, Furlong TJ, Selbie LA, Shine J (1992) Molecular cloning and expression of an adenosine A_{2b} receptor from human brain, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187:86-93;

Piersen CE, True CD, Wells JN (1994) A carboxyl-terminally truncated mutant and nonglycosylated A_{2a} adenosine receptors retain ligand binding, *Molecular Pharmacology* 45:861-870;

Pitarysty II CJ, Virmani R, Vildibill Jr. HD, Jackson EK, Forman MB (1991) Reduction of myocardial reperfusion injury by intravenous adenosine administered during the early reperfusion period, *Circulation* 83:237-247;

Poucher SM, Keddie JR, Singh P, Stogall SM, Caulkett PWR, Jones G, Collis MG (1995) The in vitro pharmacology of ZM241385, a potent, non-xanthine A_{2a} selective adenosine receptor antagonist, *British Journal of Pharmacology* 115:1096-1102;

Prabhu SD, Chandrasekar B, Murray DR, Freeman GL (2000) β -adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling, *Circulation* 101:2103-2109;

Pratt WB (1993) The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor, *Journal of Biological Chemistry* 268:21455-21458;

Pudil R, Pidrman V, Krejsek J, Gregor J, Tichy M, Andrys C, Drahosova M (1999) Cytokines and adhesion molecules in the course of acute myocardial infarction, *Clinica Chimica Acta* 280:127-134;

Pugazhenthii S, Miller E, Sable C, Young P, Heidenreich KA, Boxer LM, Reusch JEB (1999) Insulin-like growth factor-I induces *bcl-2* promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein, *Journal of Biological Chemistry* 274:27529-27535;

Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxeri LM, Heasley LE, Reusch JEB (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein, *Journal of Biological Chemistry* 275:10761-10766;

Quan N, Whiteside M, Herkenham M (1998) Cyclooxygenase 2 mRNA expression in rat brain after peripheral injection of lipopolysaccharide, *Brain Research* 802:189-197;

Quinn PG (1993) Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein(CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription, *Journal of Biological Chemistry* 268:16999-17009;

Quintana M, Hjemdahl P, Sollevi A, Kahan T, Edner M, Rehnqvist N, Swahn E, Kjerr AC, Näsman P (2003) Left ventricular function and cardiovascular events following adjuvant therapy with adenosine in acute myocardial infarction treated with thrombolysis. Results of the ATTenuation by Adenosine of Cardiac Complications (ATTACC) study, *European Journal of Clinical Pharmacology* 59:1-9;

Rajagopalan S, Dube S, Canty JM (1995) Regulation of coronary diameter by myogenic mechanisms in arterial microvessels greater than 100 microns in diameter, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 268:H788-H793;

Ramkumar V, Olah ME, Jacobson KA, Stiles GL (1991) Distinct pathways of desensitization of A₁- and A₂-adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells, *Molecular Pharmacology* 40:639-647;

Regan S, Broad M, Byford AM, Lankford AR, Cernway RJ, Mayo MW, Matherne GP (2003) A₁ adenosine receptor overexpression attenuates ischemia-reperfusion-induced

apoptosis and caspase 3 activity, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 284:H859-H866;

Reh fuss RP, Walton KM, Loriaux MM, Goodman RH (1991) The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A, *Journal of Biological Chemistry* 266:18431-18434;

Reichelt ME, Willems L, Molina JG, Sun CX, Noble JC, Ashton KJ, Schnermann J, Blackburn MR, Headrick JP (2005) Genetic deletion of the A₁ adenosine receptor limits myocardial ischemic tolerance, *Circulation Research* 96:363-367;

Reid EA, Kristo G, Yoshimura Y, Ballard-Croft C, Keith BJ, Mentzer Jr RM, Lasley RD (2005) In vivo adenosine receptor preconditioning reduces myocardial infarct size via subcellular ERK signaling, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 288:H2253-H2259;

Reif K, Nobes CD, Thomas G, Hall A, Cantrell DA (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways, *Current Biology* 6:1445-1455;

Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB (1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs, *Circulation* 56:786-794;

Reimer KA, Jennings RB (1979) 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, *Laboratory Investigation* 40:633-644;

Reimer KA, Jennings RB, Cobb FR, Murdock RH, Greenfield Jr. JC, Becker LC, Healy Bulkley B, Hutchins GM, Schwartz Jr RP, Bailey KR, Passamani ER (1985) Animals models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI cooperative study. Comparison of unconscious and conscious dog model, *Circulation Research* 56:651-665;

Ren H, Stiles GL (1994) Characterization of the human A₁ adenosine receptor gene, *Journal of Biological Chemistry* 269:3104-3110;

Ren H, Stiles GL (1995) Separate promoters in the human A₁ adenosine receptor gene direct the synthesis of distinct messenger RNAs that regulate receptor abundance, *Molecular Pharmacology* 48:975-980;

Reppert SM, Weaver DR, Stehle JH, Rivkees SA (1991) Molecular cloning and characterization of a rat A₁-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord, *Molecular Endocrinology* 5:1037-1048;

Revan S, Montesinos CM, Naime D, Landau S, Cronstein BN (1996) Adenosine A₂ receptor occupancy regulates stimulated neutrophil function via activation of a serine/threonine protein phosphatase, *Journal of Biological Chemistry* 271:17114-17118;

Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons, *Science* 286:2358-2361;

Richard VJ, Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1988) Therapy to reduce free radicals during early reperfusion does not limit the size of myocardial infarcts caused by 90 minutes of ischemia in dogs, *Circulation* 78:473-480;

Richardt G, Waas W, Kranzholer R, Mayer E, Schomig A (1987) Adenosine inhibits exocytotic release of endogenous noradrenalin in rat heart: A protective mechanism in early myocardial ischemia, *Circulation Research* 61:117-123;

Rieger JM, Brown ML, Sullivan GW, Linden J, Macdonald TL (2001) Design, synthesis, and evaluation of novel A_{2A} adenosine receptor agonists, *Journal of Medicinal Chemistry* 15:531-539;

Rivas F, Cobb FR, Bache RJ, Greenfield JC (1976) Relationship between blood flow to ischemic regions and extent of myocardial infarction: serial measurements of blood flow to ischemic regions in dogs, *Circulation Research* 38:439-447;

Roggo L, Bernard V, Kovacs AL, Rose AM, Savoy F, Zetka M, Wymann MP, Muller F (2002) Membrane transport in *Caenorhabditis elegans*: an essential role for VPS34 at the nuclear membrane, *EMBO Journal* 21:1673-1683;

Romson JL, Hook BF, Kunkel SL, Abrahams GD, Schork MA, Lucchesi BR (1983) Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in dogs, *Circulation* 67:1016-1023;

Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J (1998) Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system, *Journal of Comparative Neurology* 401:163-186;

Ross A, Gibbons RJ, Kloner RA, Marder VJ, Stone GW, Alexander RW (2002) Acute myocardial infarction study of adenosine (AMISTAD II), *Journal of the American College of Cardiology* 39 (Suppl 2):338A;

Ross SD, Tribble CG, Linden J, Gangemi JJ, Lanpher BC, Wang AY, Kron IL (1999) Selective adenosine-A_{2A} activation reduces lung reperfusion injury following transplantation, *Journal of Heart and Lung Transplantation* 18:994-1002;

Rousseau G, St-Jean G, Latour JG, Merhi Y, Nattel S, Waters D (1991) Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischemic myocardium, *Cardiovascular Research* 25:319-329;

Rousseau G, Hébert D, Libersan D, Khalil A, St-Jean G, Latour JG (1993a) Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs, *American Heart Journal* 125:1553-1563;

Rousseau R, Provost P, Latour JG (1993b) Sustained myocardial protection by clentiazem (TA-3090) after a 90-minute coronary occlusion and 72 hours of reperfusion in dogs with collateral flow, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22:264-272;

Rousseau R, Provost P, Tran D, Caillé G, Latour JG (1994) Clentiazem given at reperfusion improves subendocardial reflow and reduces myocardial infarct size in dog, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 268:1252-1260;

Rouzer CA, Samuelsson B (1985) On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 82:6040-6044;

Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB (1992) Adenosine and brain ischemia, *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews* 4:346-369;

Ruppert S, Cole TJ, Boshart M, Schmid E, Schutz G (1992) Multiple mRNA isoforms of the transcription activator protein CREB: generation by alternative splicing and specific expression in primary spermatocytes, *EMBO Journal* 11:1503-1512;

Sack MN, Yellon DM (2003) Insulin therapy as an adjunct to reperfusion after acute coronary ischemia. A proposed direct myocardial cell survival effect independent of metabolic modulation, *Journal of the American College of Cardiology* 41:1404-1407;

Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology, *Physiological Reviews* 83:803-834;

Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG (1993) Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 90:10365-10369;

Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, Koller BH, Jacobson MA (2000) Disruption of the A₃ adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells, *Journal of Biological Chemistry* 275:4429-4434;

Santoro MG (2000) Heat shock factors and the control of the stress response, *Biochemical Pharmacology* 59:55-63;

Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki L-M (1997) Apoptosis in human acute myocardial infarction, *Circulation* 95:320-323;

Sasaki T, Kitagawa K, Yamagata K, Takemiya T, Tanaka S, Omura-Matsuoka E, Sugiura S, Matsumoto M, Hori M (2004) Amelioration of hippocampal neuronal damage after

transient forebrain ischemia in cyclooxygenase-2-deficient mice, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24:107-113;

Schaper J, Mulch J, Winkler B, Schaper W (1979) Ultrastructural, functional, and biochemical criteria for estimation of reversibility of ischemic injury: A study on the effects of global ischemia on the isolated dog heart, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 11:521-541;

Schaper J, Schaper W (1983) Reperfusion of ischemic myocardium: Ultrastructure and histochemical aspects, *Journal of the American College of Cardiology* 1:1037-1046;

Schatzberg AF, Garlow SJ, Nemeroff CB (2002) *Molecular and cellular mechanisms in depression*, In: Davis KL, Charney D, Nemeroff C, eds., *Neuropsychopharmacology: The 5th generation of progress*, Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 1039-1050;

Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 94:5113-5118;

Schlack W, Schäfer M, Uebing A, Schäfer S, Borchard U, Thämer V (1993) Adenosine A2-receptor activation at reperfusion reduces infarct size and improves myocardial wall function in dog heart, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22:89-96;

Schleifer SJ, Macari-Hinson MM, Coyle DA, Slater WR, Kahn M, Gorlin R, Zucker HD (1989) The nature and course of depression following myocardial infarction, *Archives of Internal Medicine* 149:1785-1789;

Schoen FJ (1999) *The heart*, In: Cotran FS, Kumar V, Collins T, eds., *Pathologic Basis of Diseases*, Philadelphia:WB Saunders, 6th edition, 543-599;

Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W (1990) Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium, *Circulation Research* 66:1133-1142;

Schubert P, Komp W, Kreutzberg GW (1979) Correlation of 5'-nucleotidase activity and selective transneuronal transfer of adenosine in the hippocampus, *Brain Research* 168:419-424;

Schulman D, Latchman DS, Yellon DM (2002) Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 283:H1481-H1488;

Schulte G, Fredholm BB (2000) Human adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ receptors expressed in chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2., *Molecular Pharmacology* 58:477-82;

Schulte G, Fredholm BB (2003) The G_s-coupled adenosine A_{2B} receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38, *Experimental Cell Research* 290:168-176;

Schulz R, Beach SR, Ives DG, Martire LM, Ariyo AA, Kop WJ (2000) Association between depression and mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study, *Archives of Internal Medicine* 160:1761-1768;

Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG (2000) The structure of a CREB bZIP.somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding, *Journal of Biological Chemistry* 275:35242-35247;

Schwaninger M, Neher M, Viegas E, Schneider A, Spranger M (1997) Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine, *Journal of Neurochemistry* 69:1145-1150;

Schwarzschild MA, Xu K, Oztas E, Petzer JP, Castagnoli K, Castagnoli NJ, Chen JF (2003) Neuroprotection by caffeine and more specific A_{2A} receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease, *Neurology* 61:S55-S61;

Seidel MG, Klinger M, Freissmuth M, Holler C (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by A(2A)-adenosine receptor via rap1-dependent and p21(ras)-dependent pathway, *Journal of Biological Chemistry* 274:25833-25841;

Sexl V, Mancusi G, Höller C, Gloria-Maercker E, Schütz W, Freissmuth M (1997) Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A_{2A}-adenosine receptor in primary human endothelial cells, *Journal of Biological Chemistry* 272:5792-5799;

Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals, *Annual Reviews in Biochemistry* 68:821-861;

Sheline YI, Gado MH, Price JL (1998) Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression, *Neuroreport* 9:2023-2028;

Shen AC, Jennings RB (1972) Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury, *American Journal of Pathology* 67:441-452;

Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA, Daly JW (1994) Effects of chronic caffeine on adenosine, dopamine and acetylcholine systems in mice, *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 328:261-287;

Shlafer M, Kane PF, Kirsh MM (1982) Superoxide dismutase plus catalase enhance the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic, reperfused heart, *Circulation* 66[Suppl I]:I85-I92;

Shlafer M, Myers C, Adkins S (1987) Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 19:1195-1206;

Shryock JC, Belardinelli L (1997) Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: Biochemistry, physiology, and pharmacology, *American Journal of Cardiology* 79(12A):2-10;

Silva JC, Rocha MF, Lima AA, Brito GA, de Menezes DB, Rao VS (2000) Effects of pentoxifylline and nabumetone on the serum levels of IL-1 β and TNF α in rats with adjuvant arthritis, *Inflammation Research* 49:14-19;

Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, Gallagher KP, Lucchesi BR (1988) Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion, *Circulation Research* 63:1070-1079;

Sitaraman SV, Merlin D, Wang L, Wong M, Gewirtz AT, Si-Tahar M, Madara JL (2001) Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6, *Journal of Clinical Investigation* 107:861-869;

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death, *Cell* 76:959-962;

Smith III EF, Egan JW, Bugelski PJ, Hillegass LM, Hill DE, Griswold DE (1988) Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 255:H1060-H1068;

Smith TP, Canty JM (1993) Modulation of coronary autoregulatory response by nitric oxide: Evidence for flow-dependent adjustments in conscious dogs, *Circulation Research* 73:232-240;

Smits P, Williams SB, Lipson DE, Banitt P, Rongen GA, Creager MA (1995) Endothelial release of nitric oxide contributes to the vasodilator effect of adenosine in humans, *Circulation* 92:2135-2141;

Snoeckx LHEH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van der Vusse GJ (2001) Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology, *Physiological Reviews* 81:1461-1497;

Soberman RJ, Harper T, Betteridge D, Lewis RA, Austin KF (1985) Characterization and separation of arachidonic acid and 5-lipoxygenase and linoleic acid omega-6 lipoxygenase of human polymorphonuclear leukocytes, *Journal of Biological Chemistry* 260:4508-4515;

Sommers HM, Jennings RB (1964a) Experimental acute myocardial infarction : histologic and histochemical studies of early myocardial infarcts induced by temporary or permanent occlusion of coronary artery, *Laboratory Investigation* 13:1491-1502;

Sommers HM, Jennings RB (1964b) Experimental acute myocardial infarction. Histologic and histochemical studies of early myocardial infarcts induced by temporary or permanent occlusion of a coronary artery, *Laboratory Investigation* 13:1491-1503;

Sommerschild HT, Kirkebøen KA (2000) Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion – an overview, *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 44:1038-1055;

Sorger PK, Pelham HRG (1987a) Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major hsp70-like protein in unstressed rat cells, *EMBO Journal* 6:993-998;

Sorger PK, Pelham HR (1987b) The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90, *Journal of Molecular Biology* 194:341-344;

Sorli CH, Zhang HJ, Armstrong MB, Rajotte RV, Maclouf J, Robertson RP (1998) Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 95:1788-1793;

Spychala J, Datta NS, Takabayashi K, Datta M, Fox IH, Gribbin T, Mitchell BS (1996) Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 93:1232-1237;

Stambaugh K, Jacobson KA, Jiang JL, Liang BT (1997) A novel cardioprotective function of adenosine A₁ and A₃ receptors during prolonged simulated ischemia, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 273:H501-H505;

Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A₂-adenosine receptor subtype, *Molecular Endocrinology* 6:384-393;

Stephens L, Smrcha A, Cooke F, Jackson T, Sternweis P, Hawkins P (1994) A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein $\beta\gamma$ subunits, *Cell* 77:83-93;

Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT (1993) Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system?, *Biochimica et Biophysica Acta* 1179:27-75;

Stiles GL (1992) Adenosine receptors, *Journal of Biological Chemistry* 267:6451-6454;

Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase, *Science* 269:690-693;

Strike PC, Magid K, Brydon L, Edwards S, McEwan JR, Steptoe A (2004) Exaggerated platelet and hemodynamic reactivity to mental stress in men with coronary artery diseases, *Psychosomatic Medicine* 66:492-500;

Sullivan GW, Rieger JM, Scheld WM, Macdonald TL, Linden J (2001) Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A_{2A} receptor agonists, *British Journal of Pharmacology* 132:1017-1026;

Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J (2001) Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine A1 receptors, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 98:9983-9988;

Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ (2005) Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting the generation of reactive oxygen species and intracellular calcium overload, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 288:H1900-H1908;

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* 397:441-446;

Svensden JH (1991) Myocardial capillary permeability for small hydrophilic indicator during normal physiological conditions and after ischemia and reperfusion, *Acta Physiologica Scandinavica* 603:119-123;

Svensden JH, Bjerrum PJ (1992) Effects of exogenous oxygen derived free radicals on myocardial capillary permeability, vascular tone, and incidence of ventricular arrhythmias in the canine heart, *Cardiovascular Research* 26:1181-1188;

Svensden JH (1994) The microcirculation of the heart with special reference to the role of reactive oxygen metabolites in the microvascular reperfusion injury, *Danish Medical Bulletin* 41:526-540;

Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB (1999) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors, *Progress in Neurobiology* 59:355-396;

Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, Kinoshita M (1999) Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning", *J Am Coll Cardiol* 33:556-64;

Takemoto L, Emmons T, Horwitz J (1993) The C-terminal region of aA-crystallin: involvement in protection against heat-induced denaturation, *Biochemical Journal* 292:435-438;

Talukder MA, Morrison RR, Ledent C, Mustafa SJ (2003) Endogenous adenosine increases coronary flow by activation of both A_{2A} and A_{2B} receptors in mice, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41:562-570;

Tanabe M, Terashita Z, Nishikawa K, Hirata M (1984) Inhibition of coronary circulatory failure and thromboxane A₂ release during coronary occlusion and reperfusion, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 6:442-448;

Tanaka K (2001) Alteration of second messengers during acute cerebral ischemia - adenylylase, cyclic AMP-dependent protein kinase, and cyclic AMP response element binding protein, *Progress in Neurobiology* 65:173-207;

Tanaka M, Richard VJ, Murry CE, R.B. J, Reimer KA (1993) Superoxide dismutase plus catalase therapy delays neither cell death nor the loss of the TTC reaction in experimental myocardial infarction in dogs, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 25:367-378;

Tartaglia LA, Goeddel DV (1992) Two TNF receptors, *Immunology Today* 13:151-153;

Tavazzi L, Zotti AM, Rondanelli R (1986) The role of psychologic stress in the genesis of lethal arrhythmias in patients with coronary artery disease, *European Heart Journal* 7 (suppl A):99-106;

Teng B, Qin W, Ansari HR, Mustafa SJ (2005) Involvement of p38-mitogen-activated protein kinase in adenosine receptor-mediated relaxation of coronary artery, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 288:H2574-H2580;

Ter Horst GJ (2000) *Emotion and heart-activity control*, In: Ter Horst GJ, eds., *The nervous system and the heart*, Totowa, NJ:Humana Press, 55-115;

Thakur ML, Gottschalk A, Zaret BL (1979) Imaging experimental myocardial infarction with Indium-111-labeled autologous leukocytes: Effects of infarct age and residual regional myocardial blood flow, *Circulation* 60:297-305;

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: Enemies within, *Science* 281:1312-1316;

Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM (1992) Intravenous pretreatment with A1-selective analogues protects the heart against infarction, *Circulation* 85:659-665;

Tilders FJ, Schmidt ED, Hoogendijk WJ, Swaab DF (1999) Delayed effects of stress and immune activation, *Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 13:523-540;

Todd J, Zhao Z-Q, Williams MK, Sato H, Van Wylen DGL, Vinten-Johansen J (1996) Intravascular adenosine at reperfusion reduces infarct size and neutrophil adherence, *Annals of Thoracic Surgery* 62:1364-1372;

Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA, Westfall DP (1997) Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation, *Nature* 387:76-79;

Toker A (2000) Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling, *Molecular Pharmacology* 57:652-658;

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL (1995) Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium, *Circulation* 92:1487-1493;

Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL (1996a) Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: A report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD), *Journal of the American College of Cardiology* 27:1201-1206;

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL (1996b) Tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart, *Circulation* 93:704-711;

Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal baceraemia, *Nature* 330:662-664;

- Tracey KJ, Cerami A (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease, *Annual Reviews in Cell Biology* 9:317-343;
- Tracey WR, Magee WP, Oleynek JJ, Hill RJ, Smith AH, Flynn DM, Knight DR (2003) Novel N⁶-substituted adenosine 5'-N-methyluronamides with high selectivity for human adenosine A₃ receptors reduce ischemic myocardial injury, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 285:H2780–H2787;
- Traversa U, Rosati AM, Florio C, Vertua R (1994) Effects of chronic administration of adenosine antagonists on adenosine A₁ and A_{2a} receptors in mouse brain, *In Vivo* 8:1073-1078;
- Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM (2004) Postconditioning: A form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway, *Circulation Research* 95:230-232;
- Turnbull AV, Lee S, Rivier C, Ann t, NY Acad Sci 840: 434–443 (1998) Mechanisms of hypothalamic-pituitary- adrenal axis stimulation by immune signals in the adult ra, *Annals of the New York Academy of Sciences* 840:434-443;
- Uraizee A, Reimer KA, Murry CE, Jennings RB (1987) Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs, *Circulation* 75:1237-1248;
- Uustare A, Vonk A, Terasmaa A, Fuxe K, Rincken A (2005) Kinetic and functional properties of [³H]ZM241385, a high affinity antagonist for adenosine A_{2A} receptors, *Life Sciences* 76:1513-1526;

van der Wenden EM, Carnielli M, Roelen HC, Lorenzen A, von Frijtag Drabbe Kunzel JK, IJzerman AP (1998) 5'-substituted adenosine analogs as new high-affinity partial agonists for the adenosine A₁ receptor, *Journal of Medicinal Chemistry* 41:102-108;

van Kampen M, Kramer M, Hiemke C, Flugge G, Fuchs E (2002) The chronic psychosocial stress paradigm in male tree shrews: Evaluation of a novel animal model for depressive disorders, *Stress* 5:37-46;

van Muijlwijk-Koezen JE, Timmerman H, Link R, van der Goot H, IJzerman AP (1998) A novel class of adenosine A₃ receptor ligands. 2. Structure affinity profile of a series of isoquinoline and quinazoline compounds, *Journal of Medicinal Chemistry* 41:3994-4000;

Van Winkle DM, Matsuki T, Gad NM, Jordan MC, Downey JM (1990) Left ventricular unloading during reperfusion does not limit myocardial infarct size, *Circulation* 81:1374-1379;

Van Winkle DM, Kuzume K, Dote K, Wolff RA (1995) Infarct limitation by protein kinase C (PKC) is attenuated by blockade of ATP sensitive potassium (K_{ATP}) channels, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27:A142 (Abstract);

Van Wylen DGL, Schmit TJ, Lasley RD, Gingell RL, Mentzer RM (1992) Cardiac microdialysis in isolated rat hearts : interstitial purine metabolites during ischemia, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 262:H1934-H1938;

Vander Heide RS (2002) Increased expression of HSP27 protects canine myocytes from simulated ischemia-reperfusion injury, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 282:H935-H941;

- Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases, *Experimental Cell Research* 253:239-254;
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB, *Biochemical Journal* 346:561-576;
- Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids, *Annual Review in Biochemistry* 70:535-602;
- Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice, *Trends in Biochemical Sciences* 30:194-204;
- Varani K, Merighi S, Gessi S, Klotz KN, Leung E, Baraldi PG, Cacciari B, Romagnoli R, Spalluto G, Borea PA (2000) [³H]MRE 3008F20: a novel antagonist radioligand for the pharmacological and biochemical characterization of human A₃ adenosine receptors, *Molecular Pharmacology* 57:968-975;
- Verrier RL (1990) *Behavioral stress, myocardial ischemia, and arrhythmias*, In: Zipes DP, Jalife J, eds., *Cardiac electrophysiology from cell to bedside*, Philadelphia:Saunders Co., 343-352;
- Vinten-Johansen J, Thourani VH, Ronson RS, Jordan JE, Zhao ZQ, Nakamura M, Velez D, Guyton RA (1999) Broad-spectrum cardioprotection with adenosine, *Annals of Thoracic Surgery* 68:1942-1948;

- Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F (2005) Postconditioning. A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury, *Basic Research in Cardiology* 100:295-310;
- Vitadello M, Colpo P, Gorza L (1998) Rabbit cardiac and skeletal muscle myocytes differ in constitutive and inducible expression of the glucose-regulated protein GRP94, *Biochemical Journal* 332:351-359;
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002), *Journal of Biological Chemistry* 269:5241-5248;
- Volpi A, De Vita C, Franzosi MG, Geraci E, Maggioni AP, Mauri F, Negri E, Santoro E, Tavazzi L, Tognoni G (1993) Determinants of 6-month mortality in survivors of myocardial infarction after thrombolysis. Results of the GISSI-2 data base. The Ad hoc Working Group of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-2 Data Base., *Circulation* 88:416-429;
- Volpini R, Costanzi S, Vittori S, Cristalli G, Klotz KN (2003) Medicinal chemistry and pharmacology of A_{2B} adenosine receptors, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3:427-443;
- Wadhwa R, Kaul SC, Ikawa Y, Sugimoto Y (1993) Identification of a novel member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype, *Journal of Biological Chemistry* 268:6615-6621;
- Waeber G, Meyer TE, LeSieur M, Hermann HL, Gerard N, Habener JF (1991) Developmental stage-specific expression of cyclic adenosine 3',5' monophosphate response

element-binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing, *Molecular Endocrinology* 5:1418-1430;

Waeber G, Habener JF (1992) Novel testis germ cell-specific transcript of the CREB gene contains an alternatively spliced exon with multiple in-frame stop codons, *Endocrinology* 131:2010-2015;

Walker BA, Jacobson MA, Knight DA, Salvatore CA, Weir T, Zhou D, Bai TR (1997) Adenosine A₃ receptor expression and function in eosinophils, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 16:531-537;

Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP (1998) Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a *Sanhedrin* verdict, *Current Opinion in Immunology* 10:279-288;

Walton PA, Wendland M, Subramani S, Rachubinski RA, Welch WJ (1994) Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import, *Journal of Cell Biology* 125:1037-1046;

Wang L, Ma W, Markovitch R, Chen JW, Wang PH (1998) Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I, *Circulation Research* 83:516-522;

Wang Y, Hirai K, Ashraf M (1999) Activation of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity, *Circulation Research* 85:731-741;

Wann BP, Boucher M, Kaloustian S, Nim S, Godbout R, Rousseau G (2005a) Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in rats is prevented by pentoxifylline, *Biological Psychiatry* **In Press**;

Wann BP, Boucher M, Bah TM, LeMarec N, Rousseau G, Godbout R (2005b) Behavioural modifications during depression following myocardial infarction in the rat, *Journal of Neuroscience* In preparation;

Webb RL, Sills MA, J.P. C, Balwierczak JL, Francis JE (1992) CGS 21680: A potent selective adenosine A2 receptor agonist, *Cardiovascular Drug Reviews* 10:26-53;

Weber KT (2001) Aldosterone in congestive heart failure, *New England Journal of Medicine* 345:1689-1697;

Weiskrantz L (1956) Behavioural changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys, *Journal of Comparative and Physiological Pharmacology* 49:129-156;

Weiss HR, Neubauer JA, Lipp JA, Sinha AK (1978) Quantitative determination of regional oxygen consumption in the dog heart, *Circulation Research* 42:384-401;

Welch WJ, Feramisco JR (1982) Purification of the major mammalian heat shock proteins, *Journal of Biological Chemistry* 257:14949-14959;

Welch WJ, Feramisco JR (1984) Nuclear and nucleolar localization of the 72.000 dalton heat-shock protein in heat-shocked mammalian cells, *Journal of Biological Chemistry* 259:4501-4513;

Werns SW, Shea MJ, Driscoll EM, Cohen C, Abrams GD, Pitt B, Lucchesi BR (1985) The independent effect of oxygen radical scavengers on canine infarct size: Reduction by superoxide dismutase but not catalase, *Circulation Research* 56:895-898;

Whalen DA, Hamilton DG, Ganote CE, Jennings RB (1974) The effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. I: Effects on cell volume regulation, *American Journal of Pathology* 74:381-398;

Williams TC, Jarvis SM (1991) Multiple sodium-dependent nucleoside transport system in bovine brush-border membrane vesicle, *Biochemical Journal* 274:27-33;

Wolfrum S, Dendorfer A, Schutt M, Weidtmann B, Heep A, Tempel K, Klein HH, Dominiak P, Richardt G (2004) Simvastatin acutely reduces myocardial reperfusion injury in vivo by activating the phosphatidylinositide 3-kinase/Akt pathway, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 44:348-355;

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis, *Journal of Cell Biology* 139:1281-1292;

Wu W, Lee W-L, Wu YY, Chen D, Liu T-J, Jang A, Sharma PM, Wang PH (2000) Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells, *Journal of Biological Chemistry* 275:40113-40119;

Wurmser AE, Gary JD, Emr SD (1999) Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways, *Journal of Biological Chemistry* 274:9129-9132;

Wyatt RJ, Portnoy B, Kupfer DJ, Snyder F, Engelman K (1971) Resting plasma catecholamine concentrations in patients with depression and anxiety, *Archives of General Psychiatry* 24:65-70;

Wymann MP, Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases, *Biochimica et Biophysica Acta* 1436:127-150;

Xu H, Stein B, Liang B (1996) Characterization of a stimulatory A_{2A} receptor in adult rat ventricular myocytes, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 270:H1655-H1661;

Xu Z, Yang XM, Cohen MV, Neumann T, Heusch G, Downey JM (2000) Limitation of infarct size in rabbit hearts by the novel adenosine receptor agonist AMP 579 administered at reperfusion, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32:2339-2347;

Xu Z, Downey JM, Cohen MV (2001) AMP 579 reduces contracture and limits infarction in rabbit heart by activating adenosine A₂ receptors, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 38:474-481;

Xu Z, Downey JM, Cohen MV (2003) Timing and duration of administration are crucial for antiinfarct effect of AMP 579 infused at reperfusion in rabbit heart, *Heart Disease* 5:368-371;

Xu Z, Park SS, Mueller RA, Bagnell RC, Patterson C, Boysen PG (2005) Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes, *Cardiovascular Research* 65:803-812;

Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WHr, Montminy MR (1988) Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB, *Nature* 334:494-498;

Yamashita K, Kajtsura J, Discher DJ, Wasserlauf BJ, Bisphoric NH, Anversa P, Webster KA (2001) Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse overexpressin insulin-like growth factor-1, *Circulation Research* 88:609-614;

Yang L, Lanier ER, Kraig E (1997) Identification of a novel, spliced variant of CREB that is preferentially expressed in the thymus, *Immunology* 158:2522-2525;

Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV (2004) Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways, *Journal of the American College of Cardiology* 44:1103-1110;

Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV (2005a) Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation, *Basic Research in Cardiology* 100:57-63;

Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Ramos SI, Marshall M, Wang XQ, French BA, Linden J (2005b) Infarct-sparing effect of A_{2A}-adenosine receptor activation is due primarily to its action on lymphocytes, *Circulation* 111:2190-2197;

Yao Z, Cavero I, Gross GJ (1993) Activation of cardiac KATP channels: an endogenous protective mechanism during repetitive ischemia, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 264:H495-H504;

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

Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T (1997) Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo, *Nature* 385:637-640;

Yoshida KY, Sorimachi Y, Fujiwara M, Hinonaka K (1995) Calpain is implicated in rat myocardial injury after ischemia or reperfusion, *Japanese Circulation Journal* 59:40-48;

Young LH, Ikeda Y, Scalia R, Lefer AM (2000) Wortmannin, a potent antineutrophil agent, exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia/reperfusion, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295:37-43;

Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS (1998) Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 275:H250-H258;

Zala CA, Salas-Prato M, Yan WT, Banjo B, Perdue JF (1980) In cultured chick embryo fibroblasts the hexose transport components are not the 75,000 and 95,000 dalton polypeptide synthesized following glucose deprivation, *Canadian Journal of Biochemistry* 58:1179-1188;

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Mace B, Kroemer G (1996) Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis, *FEBS Letters* 384:53-57;

Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM, Fornace AJJ (1994) Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis, *Oncogene* 9:3743-3751;

Zhang J, Rivest S (2003) Is survival possible without arachidonate metabolites in the brain during systemic infection?, *News in Physiological Sciences* 18:137-142;

Zhang JG, Hepburn L, Cruz G, R.A. B, Clark KL (2005a) The role of adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors in the regulation of TNF- α production by human monocytes, *Biochemical Pharmacology* 69:883-889;

Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M (2005b) Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102:4459-4464;

Zhao Z, Makaritsis K, Francis CE, Gavras H, Ravid K (2000) A role for the A₃ adenosine receptor in determining tissue levels of cAMP and blood pressure: Studies in knock-out mice, *Biochimica et Biophysica Acta* 1500:280-290;

Zhao ZQ, McGee S, Nakanishi K, Toombs CF, Johnston WE, Ashar MS, Vinten-Johansen J (1993) Receptor-mediated cardioprotective effects of endogenous adenosine are exerted primarily during reperfusion after coronary occlusion in the rabbit, *Circulation* 88:709-719;

Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2001a) Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by

modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33:57-68;

Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, Hewan-Lowe KO, Nakamura M, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2001b) Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion, *Apoptosis* 6:279-290;

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning, *American Journal of Physiology. Heart & Circulatory Physiology* 285:H579-H588;

Zhao Z-Q, Sato H, Williams MW, Fernandez AZ, Vinten-Johansen J (1996) Adenosine A₂-receptor activation inhibits neutrophil-mediated injury to coronary endothelium, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 271:H1456-H1464;

Zhong H, Belardinelli L, Maa T, Zeng D (2005) Synergy between A_{2B} adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 32:2-8;

Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: The A₃ adenosine receptor, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 89:7432-7436;

Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P (1998) New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system, *Neurochemistry International* 32:421-425;

Annexe 1

Références du tableau 1.1

1. Fredholm, *et al.* (2001) *Pharmacol Rev*, 53:527-552;
2. Klotz (2000) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 362:382-391;
3. Klotz, *et al.* (1998) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 357:1-9;
4. Ji, *et al.* (1999) *Drug Des Disc*, 16:217-226;
5. Bruns, *et al.* (1986) *Mol Pharm*, 29:331-346;
6. Klotz, *et al.* (1991) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 343:196-201;
7. Olah, *et al.* (1994) *Mol Pharm*, 45:978-982;
8. Cristalli, *et al.* (1992) *J Med Chem*, 35:2363-2368;
9. Linden, *et al.* (1999) *Mol Pharmacol*, 56:705-713;
10. Gallo-Rodriguez, *et al.* (1994) *J Med Chem*, 37:636-646;
11. Klotz, *et al.* (1999) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 360:103-108;
12. Kim, *et al.* (1994) *J Med Chem*, 37:3614-3621;
13. Jarvis, *et al.* (1989) *J Pharmacol Exp Ther*, 251:888-893;
14. Siddiqui, *et al.* (1995) *J Med Chem*, 38:1174-1188;
15. Francis, *et al.* (1991) *J Med Chem*, 34:2570-2579;
16. van Galen, *et al.* (1994) *Mol Pharmacol*, 45:1101-1111;
17. Hutchison, *et al.* (1989) *J Pharmacol Exp Ther*, 251:47-55;
18. Cristalli, *et al.* (1994) *J Med Chem*, 37:1720-1726;
19. Volpini, *et al.* (2002) *J Med Chem*, 45:3271-3279;
20. Fredholm, *et al.* (2002) *Curr Top Med Chem*, 3:413-426;
21. Cristalli, *et al.* (1995) *J Med Chem*, 38:1462-1472;
22. Camaioni, *et al.* (1997) *Bioorg Med Chem*, 5:2267-2275;
23. Merkel, *et al.* (1998) *Drug Dev Res*, 45:30-43;
24. Lohse, *et al.* (1988) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 337:687-689;
25. Lohse, *et al.* (1988) *Eur J Pharmacol*, 156:157-160;
26. Kim, *et al.* (2000) *J Med Chem*, 43:1165-1172;
27. Lohse, *et al.* (1987) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 336:204-210;
28. Jacobson, *et al.* (1986) *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:4089-4093;
29. Kim, *et al.* (1999) *Drug Dev Res*, 47:178-188;
30. Nonaka, *et al.* (1997) *Mov Disord*, 12(Suppl 1):452;
31. Kanda, *et al.* (1998) *Ann Neurol*, 43:507-513;
32. Williams, *et al.* (1987) *J Pharmacol Exp Ther*, 241:415-420;
33. Baraldi, *et al.* (1994) *Bioorg Med Chem Lett*, 4:2539-2544;
34. Ongini, *et al.* (1999) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 359:7-10;
35. Poucher, *et al.* (1995) *Br J Pharmacol*, 115:1096-1102.



Annexe 2

Copie des manuscrits déjà publiés



Post-Ischemic Cardioprotection by A_{2A} Adenosine Receptors: Dependent of Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway

Matthieu Boucher, MSc, Stéphanie Pesant, BSc, Stéphanie Falcao, BSc, Chantal de Montigny, TSA, Erick Schampaert, MD, René Cardinal, PhD, and Guy Rousseau, PhD

Abstract: Activation of myocardial A_{2A} adenosine receptors during reperfusion has been shown to be cardioprotective. The intracellular mechanisms underlying this protection remain unknown. To understand the beneficial effects of activated A_{2A} adenosine receptors in such a state, we investigated whether the enzymes phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and caspase-3 can account for this post-ischemic cardioprotective effect in an anesthetized rabbit model of myocardial infarction (30 minutes ischemia; 5 hours reperfusion). Administration of the A_{2A} agonist CGS21680 (0.2 µg/kg/min) 5 minutes before reperfusion began (Early) reduced infarct size expressed as a percentage of the area at risk (25.7 ± 5.3% versus 46.5 ± 5.3% for the control group; **P* < 0.05). Treatment with the A_{2A} agonist 5 minutes after the onset of reperfusion (Late) had no effect on infarct size (38.2 ± 6.2%). In the presence of a selective inhibitor of PI3K (LY294002), the beneficial effects of CGS21680 on infarct size was no longer observed (43.9 ± 7.9%). After 5 hours of reperfusion, higher PI3K activity in the ischemic region was observed in the Early group compared with the other experimental groups. Caspase-3 activity was not observed in these different groups. In another set of experiments, PI3K activity was significantly higher during the first 15 minutes of reperfusion in the Early group as compared with the Control group. Caspase-3 activity increased rapidly during the first 15 minutes of reperfusion in the Control group and remained stable in the Early group. These results indicated that post-ischemic cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation is PI3K-dependent and modulate rapidly other signaling pathways such as caspase-3.

Key Words: A_{2A} adenosine receptors, cardioprotection, myocardial infarction, phosphatidylinositol 3-kinase, reperfusion injury

(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2004;43:416–422)

Received for publication June 9, 2003; accepted December 3, 2003.

From the Centre de Biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Département de pharmacologie and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Supported by the Fondation des Maladies du Cœur du Québec.

Reprints: Guy Rousseau, PhD, Centre de Biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, 5400, boul. Gouin Ouest, Montréal (Québec), Canada, H4J 1C5

Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

Cardioprotection can be afforded before or after ischemia by adenosine receptors activation. Activation of A₁ or A₃ adenosine receptor subtypes before the onset of sustained ischemia reduces infarct size significantly.^{1,2} Intracellular signaling pathways involved in these beneficial effects have been identified to involve kinases followed by phosphorylation and activation of membrane end-effectors possibly via K_{ATP} channels.³ Activation of A_{2A} adenosine receptors is effective at doing so during reperfusion.⁴ A_{2A} adenosine receptor activation post-ischemia may exert beneficial effects by interfering with the deleterious events associated with neutrophil accumulation,^{5,6} oxygen-free radical production,^{6,7} or apoptosis.⁴ The molecular signaling pathways involved in any post-ischemic cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation remain unknown.

Experimental evidence suggests that cell death occurring during reperfusion is due to apoptosis.^{8,9} Early after the onset of reperfusion,¹⁰ apoptotic stimuli activate the caspase cascade that involves caspase-3, which cleaves substrates important to the maintenance of cellular integrity.¹¹ Post-ischemic pharmacological interventions that reduce infarct size may thus interfere with apoptosis.^{4,12} To determine the intracellular signaling pathways involved in the cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation, we studied two enzymes that can be modulated by stimulation of G protein-coupled receptors and involved in cell survival.

PI3K is a key signaling enzyme that modifies downstream effectors such as kinases that are involved in cell growth and protein synthesis, thus cell survival.¹³ Among the different downstream effectors, PKB/Akt can inhibit caspase-9, a protease crucial in the initiation of apoptosis. PKB/Akt can also phosphorylate Bad, which can no longer, as a consequence, interact with Bcl-2 or Bcl-x1, allowing them to inhibit apoptosis.

The second enzyme, caspase-3, is rapidly activated during the early phase of apoptosis, thereby contributing to cell death. Inhibition of caspase-3 during reperfusion induces a significant reduction of infarct size. This reduction suggests an important role for this enzyme in reperfusion injury.^{12,14} Interestingly, it has been reported that activation of PI3K reduces

caspase-3 activity.^{15–17} According to these findings, PI3K seems to be upstream of caspase-3 and thus may act as an important enzyme in post-ischemic cardioprotection.

The present study was conducted to determine the role of A_{2A} adenosine receptors in modulating PI3K and caspase-3 activities and thus the role of the former in cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation.

METHODS

Materials

All chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO) unless specified. 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Leupeptin and Microcystin LR were obtained from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Anti-phospho-tyrosine (PY99) and secondary antibodies were obtained from Santa-Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA). Tween 20 and [γ ³²P]-ATP were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, Canada). Dimethylsulfoxide (DMSO), Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris), sodium chloride, and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Laboratoire MAT (Beauport, Canada). Ac-DEVD-AMC was obtained from BD Biosciences (Toronto, Canada). Lowry protein assay reagents were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Enhanced Chemiluminescence Reagents was obtained from Perkin Elmer (Markham, Ontario).

Experimental Groups

Protocol A

New-Zealand white rabbits (Charles River Canada, Saint-Constant, Québec) weighing between 2.3 and 3.1 kg were randomly assigned to 1 of the 4 following groups (8–10 animals/group): (1) Control group receiving vehicle (DMSO); (2) Early-treated group (Early) where 2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine hydrochloride (CGS21680; A_{2A} adenosine receptor agonist) was administered 5 minutes before the beginning of reperfusion (0.2 μ g/kg/min) into the marginal ear vein; (3) Late-treated group (Late) where the same agonist was administered 5 minutes after the beginning of reperfusion (0.2 μ g/kg/min); and (4) Early-treated group with the A_{2A} agonist and selective PI3K inhibitor (Early + LY) where CGS21680 (0.2 μ g/kg/min) and LY294002 (selective PI3K inhibitor; 1.66 μ g/kg/min) were administered simultaneously 5 minutes before the beginning of reperfusion. CGS21680 and LY294002 were solubilized in DMSO. Treatments were administered for 120 minutes in all groups. Dosage of the LY294002 used in the present study was determined from results obtained in a previous pilot study. Dosage of CGS21680 was chosen in accordance with the protocol used by Zhao et al.⁴

Protocol B

Three groups were constituted: (1) Control group receiving vehicle (DMSO); (2) Early-treated group (Early) where CGS21680 was administered 5 minutes before the onset of reperfusion (0.2 μ g/kg/min); and (3) Late-treated group (Late) where CGS21680 was administered 5 minutes after the onset of reperfusion.

Surgery

Rabbits were handled in compliance with the procedures of the Animal Care Local Committee. Ketamine/xylazine (35–50 mg/kg and 5 mg/kg i.m., respectively) was used to induce anesthesia, which was maintained with isoflurane (1.5%). Rabbits were intubated and placed on an artificial respirator to maintain physiologic levels of blood gases. Catheters were inserted into the carotid and femoral arteries to collect blood and monitor arterial pressure. Electrodes were placed on front paws to record ECG and heart rate. A left thoracotomy was performed at the fifth intercostal space and the left anterior descending coronary artery was occluded with a silk suture. Ischemia was confirmed by ST segment alterations and cyanosis on the myocardial surface. After 30 minutes of occlusion (ischemia), the ligature was loosened and the myocardial tissue was reperfused. Reperfusion was confirmed by the disappearance of cyanosis. The suture used to occlude the artery was left in place to localize the site of occlusion and to assess infarct size later. In protocol A, the reperfusion period lasted 5 hours. In protocol B, the reperfusion period was limited to 0, 5, or 15 minutes.

Measurement of Area at Risk and Infarct Size

At the end of the reperfusion period, the heart was removed and the left anterior descending coronary artery was occluded at the same site to determine the area at risk (AR) with infusion of Evans Blue (0.5%) by retrograde perfusion into aorta (protocol A and B). The heart was then placed at –80°C for 5 minutes and sliced in 4 to 5 transverse sections of 2 mm. Each section was incubated 5 minutes at 37°C in a triphenyltetrazolium chloride solution (TTC 1%, pH 7.4) to determine the area of necrosis (protocol A only). Myocardial infarction was expressed as a percentage of necrosis (I) of the AR. Moreover, AR was expressed as a percentage of left ventricle (LV) area. Ischemic central left ventricle sections from slices 2 to 4 were dissected into 2 equal endocardial and epicardial portions regardless of the localization of the myocardial infarction (protocol A and B). The nonischemic portions of the left ventricle were dissected to serve as internal control. Cardiac tissue was then subjected to snap freezing in liquid nitrogen and stored at –80°C until used.

PI3K Activity

Frozen cardiac tissue samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 20 mM β -glycerophosphate,

20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 µg/mL Leupeptin, 5 mM DTT, 1 µM microcystin LR, and 1% Triton X-100) with a polytron homogenizer (10 second bursts at maximum speed). The homogenate was centrifuged at 1000 × g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was removed, incubated for 30 minutes at 4°C, and centrifuged for 15 minutes at 10,000 × g at 4°C. The protein content was then assessed using the Lowry method (Bio-Rad). Protein extracts were precipitated with anti-phosphotyrosine antibody conjugated to biotin (1:50) overnight at 4°C. The immune complex was pelleted and washed 3 times with lysis buffer and 2 times with phosphate-buffered saline buffer containing 0.1 M Na₃VO₄. The immune pellet was then suspended in activation buffer (35 mM ATP, 0.2 mM adenosine, 30 mM MgCl₂, 10 mg/mL L-α-phosphatidylinositol, and 20 µCi [³²P]-ATP) and incubated at room temperature for 20 minutes. The reaction was stopped with the addition of 100 µL hydrogen chloride 1M and 200 µL of Chloroform: Methanol (1:1). The aqueous phase was then discarded. Eighty µL of hydrogen chloride: Methanol (1:1) were then added before discarding the aqueous phase. Twenty µL of the organic phase containing ³²P-Phosphatidylinositol were resolved by thin layer chromatography on K6 Silica Gel plates (Whatman, Clifton, NJ) in a solvent system containing Chloroform: Methanol: ammonium hydroxide (45:35:10). Plates were exposed to film for 3 to 5 days (-80°C) before revelation.

Caspase-3 Activity

Frozen cardiac tissue samples were lyophilized and cytosolic proteins were extracted in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1mM PMSF, 10 µg/mL Leupeptin, 10 µg/mL Pepstatin A, 10 g/mL Aprotinin). Enzymatic reactions were performed in reaction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT) with 25 µg of proteins and fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AMC (40µM). Reactions were incubated at 37°C for 3 hours and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M Glycine buffer. Fluorescence was quantified with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ) at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 465 nm.

Statistics

Results are expressed as mean (± standard error of the mean) and were evaluated using analysis of variance and covariance adapted for factorial experimental design.¹⁸ A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Hematological and Hemodynamic Data

All groups were similar in terms of weight, hematocrit, hemoglobin, leukocyte, and platelet number at occlusion time (Table 1). Heart rate and mean arterial pressure were similar

TABLE 1. Hematological and Hemodynamic Data From Rabbits of Different Groups

	Control	Early	Late	Early + LY
Number	10	10	10	8
Weight (kg)	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.0	2.5 ± 0.1
Hemoglobin (g/L)	118 ± 5	119 ± 2	120 ± 2	115 ± 3
Hematocrit (%)	36 ± 1	36 ± 1	36 ± 1	34 ± 1
Leukocytes (10 ⁶ /L)	4.6 ± 0.5	5.5 ± 0.3	4.6 ± 0.4	5.9 ± 0.6
Platelets (10 ⁹ /L)	359 ± 16	356 ± 19	400 ± 26	386 ± 25

between groups throughout experiments (Fig. 1A, 1B). These results indicated that neither CGS21680 dosage nor LY294002 exerted any significant effect on monitored hemodynamic parameters.

Infarct Size

Area at risk (AR), expressed as a percentage of the total left ventricle (LV) area, was similar for all groups, represent-

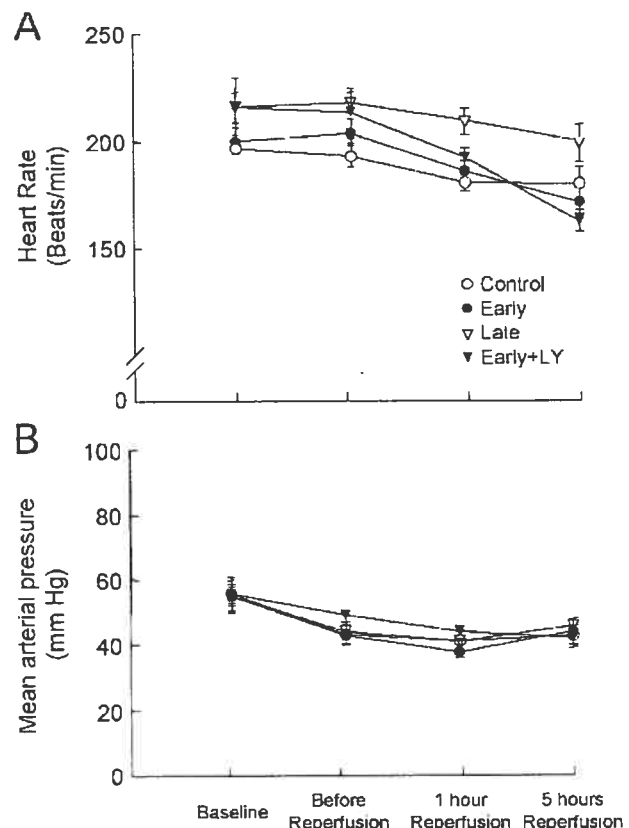


FIGURE 1. (A) Heart rate and (B) mean arterial pressure measured in the 4 different groups. No difference was observed between groups throughout experiments.

ing more than 45% of the LV area (Fig. 2B). Infarct size, expressed as a percentage of the AR (I/AR), was significantly smaller in the Early group (25.7 ± 5.3%) when compared with the Control (46.5 ± 5.3%) and Late (38.2 ± 6.2%) groups (Fig. 2A; *P < 0.05). In the presence of LY294002, cardioprotection observed with the early administration of CGS21680 (Early + LY) was no longer present (43.9 ± 7.9%). These results suggest that PI3K is involved in infarct size modulation during A_{2A} adenosine receptor activation.

Protocol A

PI3K activity

To determine A_{2A} adenosine receptor activation effects in the signaling pathways involved during post-ischemic cardioprotection, we measured PI3K activity by in vitro phosphorylation of L-α-phosphatidylinositol. PI3K activity was enhanced significantly within the Early group with CGS21680 (Fig. 3) when compared with the Control and Late groups. Indeed, PI3K was 64.2 ± 8.3% and 64.5 ± 10.1% for endocardial and epicardial ischemic regions respectively (Control group values being 8.4 ± 8.6% and 15.0 ± 5.2% and Late values being 3.3 ± 7.4% and 31.8 ± 8.8% for endocardial and epicardial ischemic regions respectively). In the presence of LY294002 along with CGS21680 (Early + LY), no PI3K activity was detected in ischemic or nonischemic regions.

Caspase-3 activity

As a potential key participant in the reperfusion injury, we measured caspase-3 activity in our experimental model. After 5 hours of reperfusion, we were unable to detect any significant activity in tissues derived from the different experimental groups (data not shown).

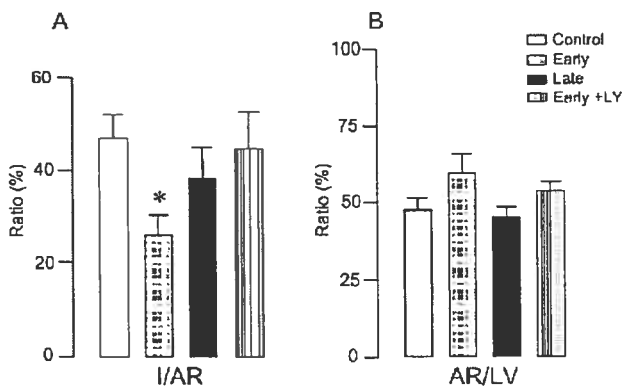


FIGURE 2. A, Infarct size (I) expressed as a percentage of the area at risk (AR) showed a marked reduction in the Early group as compared with the other groups (*P < 0.05). Addition of LY294002 (Early + LY) provokes a loss of the cardioprotective effect induced by CGS21680. B, Area at risk (AR) expressed as a percentage of the left ventricle (LV) was similar between groups.

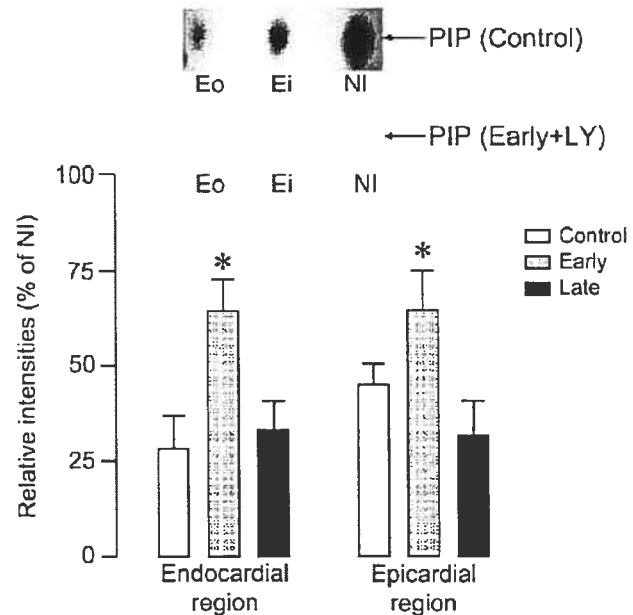


FIGURE 3. PI3K activity was assessed by in vitro phosphorylation of the L-α-phosphatidylinositol. Activity observed in the nonischemic region was expressed as 100% and normalized the activity found in the ischemic region. Significantly increased PI3K activity in both endocardial and epicardial ischemic regions was observed only in the Early group when compared with the Control, Late, and Early + LY groups (*P < 0.05). No PI3K activity was detected in the ischemic regions in the Early + LY (inset). Inset shows typical substrate phosphorylation for the Control and Early + LY groups. Eo, endocardial ischemic region; Ei, epicardial ischemic region; NI, nonischemic region.

Protocol B

Kinetics of activation of PI3K and caspase-3 early after onset of reperfusion

To estimate the effect of CGS21680 on the different enzyme activities during the early phase of reperfusion, we killed the animals after 30 minutes of ischemia followed by 0, 5, or 15 minutes of reperfusion. At the end of the ischemia period (0 minutes of reperfusion), PI3K activity measured in the area at risk was similar between the Control and Early groups. However, after 5 minutes of reperfusion, ischemic regions from the Control group demonstrated a significant reduction in PI3K activity (Fig. 4). This activity remained constant in the Early group. This reduction was greater after 15 minutes mainly in the ischemic endocardium. In the Late group, PI3K activity was not significantly different from that observed in the Control group at 15 minutes of reperfusion.

At the end of the period of ischemia, caspase-3 activity was similar among groups (Fig. 5). However, 5 minutes after the onset of reperfusion, caspase-3 activity was significantly increased in ischemic regions of the Control group as com-

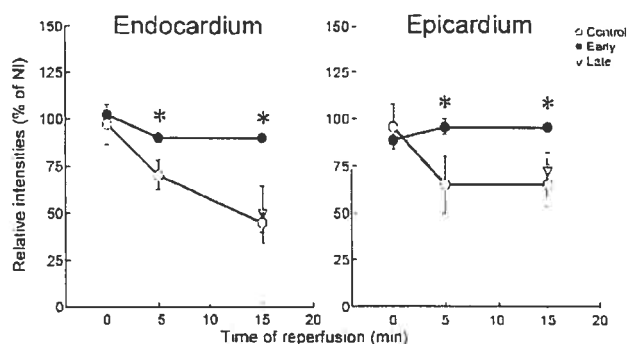


FIGURE 4. Kinetics of PI3K activation during the early phase of reperfusion in Control, Early, and Late groups for endocardial (endocardium) and epicardial (epicardium) ischemic regions. Activity was expressed as a percentage of the activity observed in the nonischemic (NI) region. At the end of the ischemia period (onset of reperfusion), PI3K activity was similar to the one determined in the nonischemic region. After 5 minutes, activity was significantly increased in both endocardial and epicardial ischemic regions only in the Early group when compared with the Control group (* $P < 0.05$). No significant difference was observed between Control and the Late groups at 15 minutes of reperfusion.

pared with the Early group. This effect was maintained during the first 15 minutes of reperfusion in the endocardial ischemic region. In the epicardial ischemic region, no statistical difference was detected. Activity observed in the Late group indicated that treatment was ineffective to reduce caspase-3 activation.

DISCUSSION

The present study demonstrates that the beneficial effects exerted by A_{2A} adenosine receptor activation on the post-ischemic myocardium are PI3K-dependent. Furthermore, in the presence of a selective PI3K inhibitor (LY294002), A_{2A} adenosine receptor activation imparted no further cardioprotection. We also observed that cardioprotective therapy via A_{2A} adenosine receptor activation inversely modulates the PI3K and caspase-3 activities. CGS21680 therapy, instituted 5 minutes after the onset of reperfusion, did not affect the PI3K and caspase-3 activities as compared with the Control group, and thus was unable to impart any cardioprotection. These results indicate the potential significance of these enzymes in the cardioprotective effects of A_{2A} adenosine receptor activation. The reduction of infarct size by post-ischemic A_{2A} adenosine receptor stimulation that we observed has been demonstrated by other groups in different experimental models, including pigs,¹⁹ rabbits,²⁰⁻²² and dogs.^{4,6,23} We also observed that the same regimen starting 5 minutes after the onset of reperfusion is ineffective in reducing infarct size. As proposed by Horwitz et al,²⁴ these data indicate that the optimal timing of therapy administration depends of the pharmacokinetics, diffusibility,

and mechanism of action of these selective pharmacological agents.

The present study is, to our knowledge, the first to identify the PI3K signaling pathway as a key target for post-ischemic cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptors. These receptors are not unique with respect to dependence on PI3K signaling for post-ischemic cardioprotection. Indeed, it has been shown that the beneficial effect of post-infarction insulin can also be blocked via a PI3K inhibitor,^{25,26} as can the effects of bradykinin.²⁷ PI3K is involved in cell survival and limits apoptosis by modulation of downstream target effectors such as PKB/Akt and p70^{S6} kinase. Both enzymes can phosphorylate Bad, maintaining cytosolic sequestration of this protein in its inactive form. When Bad is activated and translocated to mitochondria, it forms a heterodimer with Bcl-2 or Bcl-x1 to promote apoptosis.²⁸ It has also been suggested that PI3K activation is beneficial to the post-ischemic myocardium by decreasing caspase-3 activity.¹⁶ Data obtained from protocol B demonstrate that caspase-3 activity in the Early group is similar to that observed in nonischemic regions whereas caspase-3 activity in the Control group increases. Stable caspase-3 activation in Early-treated animals during early reperfusion parallels PI3K activity. In contrast, activity of both enzymes diverged in the Control group, presumably acting to promote cell death by apoptosis. Overall, the present data support a previous study indicating that A_{2A} adenosine receptor activation reduces apoptosis as evaluated by TUNEL staining and DNA fragmentation.⁴

Interestingly, results obtained in the Late group indicated PI3K and caspase-3 activities are similar to Control group, in contrast to the Early group. These results suggest that coupling between A_{2A} adenosine receptors and these enzymes is not direct and involves other proteins. If indeed direct coupling occurred between receptors and these enzymes, the activity measured in both treated groups (Early and Late) would have been more similar than that which we observed. Although second messenger(s) involved in modulating PI3K and caspase-3 activities remains unknown, recent studies indicate that cAMP may modulate PI3K activity.^{29,30} These findings are interesting since A_{2A} adenosine receptors are positively coupled to adenylyl cyclase and thus cAMP production. Further studies are needed to confirm the role of cAMP in this beneficial effect.

Myocardial tissue was separated into two regions (endocardial and epicardial ischemic regions) because of observations demonstrating that endocardium is more sensitive to ischemia than epicardium.³¹ Therefore, enzyme activity differences may be more prominent in the former region when comparing treated groups with control groups. Our results confirm that differences occur in both regions, reflecting the relative extent of damage in each area. However, analysis of covariance did not indicate any relation between infarct size and PI3K or caspase-3 activities after 5 hours of reperfusion. In

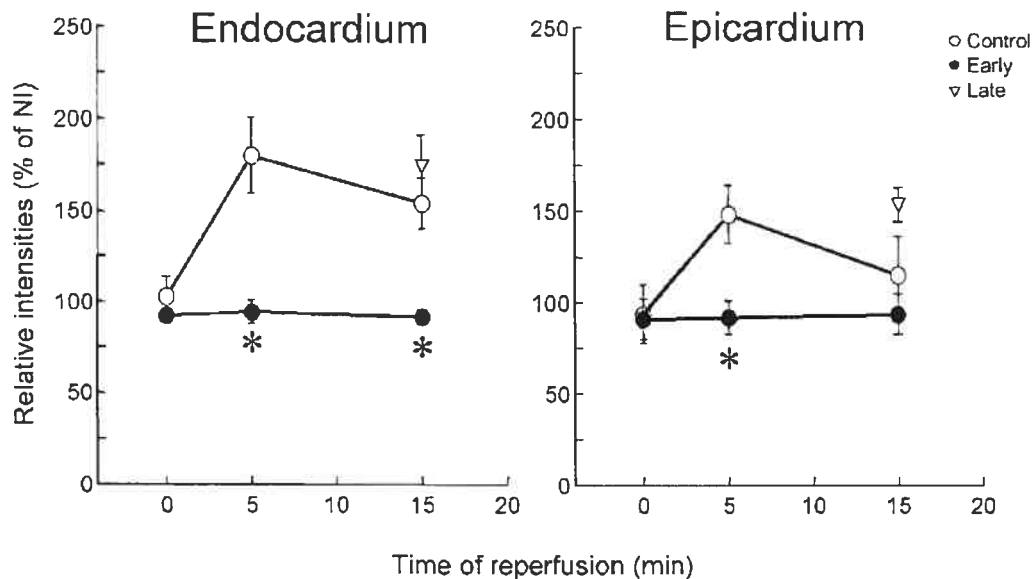


FIGURE 5. Kinetics of caspases-3 activation during the early phase of reperfusion in Control, Early, and Late groups for endocardial (endocardium) and epicardial (epicardium) ischemic regions. Activity was expressed as a percentage of the activity observed in the nonischemic (NI) region. At the end of the ischemia period (onset of reperfusion), caspases-3 activity was similar to the one determined in the nonischemic region. After 5 minutes, activity was significantly decreased in both endocardial and epicardial ischemic regions only in the Early group when compared with the Control group (**P* < 0.05). This difference tends to be limited in the epicardial region at 15 minutes of reperfusion but not in the endocardial region. Activity observed in the Late group was similar to the one observed in the Control group.

addition, we observed a significant difference in PI3K and caspase-3 activities after 5 minutes of reperfusion. According to Ganz et al,³² 5 minutes of reperfusion are not sufficient to detect any significant progression of infarct size. These results suggest that the extent of damage plays a minor role in the PI3K and caspase-3 activities observed and that other factors, including A_{2A} adenosine receptors activation, are involved.

In the present study isoflurane was used as the anesthetic agent. It has been shown that isoflurane can reduce infarct size with a mechanism similar to preconditioning.^{33,34} In our study, however, isoflurane did not reduce infarct size. This discrepancy can be explained by the fact that preconditioning induction can be achieved by stopping administration of isoflurane a few minutes before the ischemic period begins, thereby achieving maximum cardioprotective effect; this was not the case in our study.

A_{2A} adenosine receptors are mediators of vasodilation processes and may induce hypotension. In the present study, mean arterial pressure did not differ throughout the experiment among groups. This suggests that the CGS21680 dosage used had no hypotensive effect. Similar results were also obtained by Zhao et al⁴ using the same regimen of CGS21680 treatment. On the other hand, Jordan et al⁶ observed a reduction in left ventricular peak systolic pressure with this agent. One possibility may be that isoflurane, which possesses cardiopressant

effects, may mask any vasodilator effects of CGS21680. It is also possible that CGS21680 may induce vasodilation when infused directly into the coronary artery⁶ versus infusion into the marginal ear vein (our study) or the left atrium.⁴ Another possibility is that A_{2A} agonist concentrations are not high enough to induce any vasodilation. Cardioprotection afforded by the A_{2A} agonist might also be due to an indirect mechanism involving circulating cells such as neutrophils as observed by others.^{4,6} Further in vivo studies are needed to determine if CGS21680, when so administered, acts directly on cardiomyocytes.

One limitation of our study is that PI3K activities were determined in tissue that has been incubated in TTC (protocol A). Results obtained from pilot studies indicate that these activities were reduced by 25 to 30% when tissues samples were incubated in TTC. Since all ventricular tissue samples (including areas at risk) were in contact with TTC, we expressed our results in percentage terms, comparing data from ischemic to nonischemic tissue. This provides a way to correct enzyme activity levels and thus eliminate inter-animal variability. Moreover, in protocol B different activities were measured in tissues that were not incubated in TTC. The differences observed between these groups were found to be similar to those derived in protocol A, indicating that the methods of evaluating enzyme activity in protocol A was reliable.

CONCLUSION

Our results indicated that post-ischemic cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor activation is PI3K-dependent and may rapidly modulate other signaling pathways such as caspase-3.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Robert Élie for statistical analysis, Dr. Andrew Armour, Dr. Terrence Hebert, Diane Boucher, and Alexandro Zarruk for critical reading of the manuscript as well as Dr. Denis DeBlois and Dr. Eve-Lyne Marchand for caspase-3 assay.

REFERENCES

- Liang B. Direct preconditioning of cardiac ventricular myocytes via adenosine A₁ receptor and KATP channel. *Am J Physiol*. 1996;271:H1769–H1777.
- Takano H, Bolli R, Black RG, et al. A₁ or A₃ adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circ Res*. 2001;88:520–528.
- Kloner RA, Speakman MT, Przyklenk K. Ischemic preconditioning: a plea for rationally target clinical trials. *Cardiovasc Res*. 2002;55:526–533.
- Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, et al. Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:57–68.
- Cronstein BN, Rosenstein ED, Kramer SB, et al. Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts as an A₂ receptor on human neutrophils. *J Immunol*. 1985;135:1366–1371.
- Jordan J, Zhao Z, Sato H, et al. Adenosine A₂ receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280:301–309.
- Zhao ZQ, Sato H, Williams MW, et al. Adenosine A₂-receptor activation inhibits neutrophil-mediated injury to coronary endothelium. *Am J Physiol*. 1996;271:H1456–H1464.
- Fliiss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*. 1996;79:949–956.
- Gottlieb R, Burleson K, Kloner R, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1994;94:1621–1628.
- Freude B, Masters TN, Robicsek F, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:197–208.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:383–424.
- Huang JQ, Radinovic S, Rezaiefar P, et al. In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor after the onset of ischemia. *Eur J Pharmacol*. 2000;402:139–142.
- Toker A. Protein kinase as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharm*. 2000;57:652–658.
- Holly TA, Drincic A, Byun Y, et al. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:1709–1715.
- Laprise P, Chailier P, Houde M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem*. 2002;277:8226–8234.
- Wu W, Lee WL, Wu YY, et al. Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J Biol Chem*. 2000;275:40113–40119.
- Yamamori T, Inanami O, Sumimoto H, et al. Relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and small GTPase Rac for the activation of NADPH oxidase in bovine neutrophils. *Biochem Biophys Res Comm*. 2002;293:1571–1578.
- Winer BJ. *Statistical Principles in Experimental Design*. New-York: McGraw-Hill; 1971.
- Vähäsilta T, Virtanen J, Saraste A, et al. Adenosine in myocardial protection given through three windows of opportunity. An experimental study in pigs. *Scand Cardiovasc J*. 2001;35:409–414.
- Todd J, Zhao ZQ, Williams MW, et al. Intravascular adenosine at reperfusion reduces infarct size and neutrophil adherence. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:1364–1372.
- Xu Z, Downey JM, Cohen MV. AMP579 reduces contracture and limits infarction in rabbit heart by activating adenosine A₂ receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38:474–481.
- Zhao ZQ, McGee S, Nakanishi K, et al. Receptor-mediated cardioprotective effects of endogenous adenosine are exerted primarily during reperfusion after coronary occlusion in the rabbit. *Circulation*. 1993;88:709–719.
- Budde JM, Velez DA, Zhao ZQ, et al. Comparative study of AMP579 and adenosine in inhibition of neutrophil-mediated vascular and myocardial injury during 24 h of reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2000;47:294–305.
- Horwitz LD, Kong Y, Robertson AD. Timing of treatment for myocardial reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;33:19–29.
- Baines CP, Wang L, Cohen MV, et al. Myocardial protection by insulin is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase C or K_{ATP} channels in the isolated rabbit heart. *Basic Res Cardiol*. 1999;94:188–198.
- Jonassen AK, Sack MN, Mjøs OD, 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;89:1191–1198.
- Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;35:185–193.
- Datta K, Bellacosa A, Chan TO, et al. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1996;271:30835–30839.
- Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, et al. Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol Cell Biol*. 1999;19:5882–5891.
- Webster CR, Anwer MS. Role of the PI3-K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am J Physiol*. 1999;277:G1165–G1172.
- Downey JM. Why the endocardium? In: Hearse DJ, Yellon DM, eds. *Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct*. New York: Raven Press; 1984:125–138.
- Ganz W, Watanabe I, Kanamasa K, et al. Does reperfusion extend necrosis? A study in a single territory of myocardial ischemia-half reperfused and half not reperfused. *Circulation*. 1990;82:1020–1033.
- Marano G, Grigioni M, Tiburzi F, et al. Effects of isoflurane on cardiovascular system and sympathovagal balance in New Zealand white rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;28:513–518.
- Müllenheim J, Ebel D, Frädord J, et al. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology*. 2002;96:934–940.

Sustained Cardioprotection Afforded by A_{2A} Adenosine Receptor Stimulation After 72 Hours of Myocardial Reperfusion

Matthieu Boucher, MSc,*†‡ Boubacar Pasto Wann, MSc,*‡ Sevan Kaloustian, BSc,*
Rachel Massé,* Erick Schampaert, MD,* René Cardinal, PhD,*†‡
and Guy Rousseau, PhD*†‡

Abstract: This study was designed to determine whether cardioprotection afforded by A_{2A} adenosine receptor stimulation can be sustained and to determine the effect of an A_{2A} adenosine receptor agonist on Akt and cAMP response element binding protein (CREB) activation, as well as Hsp27 and Hsp70 protein expression in such events. The left anterior descending coronary artery was occluded for 40 minutes in anesthetized rats followed by 72 hours of reperfusion. A_{2A} agonist (CGS21680 at 0.2 µg/kg/min) was administered for 120 minutes, starting either 5 minutes before (early) or after (late) the beginning of reperfusion. Infarct size was reduced significantly in the early compared with the control group (35.2 ± 1.9% and 52.5 ± 3.4%, respectively; *P* < 0.05), whereas no difference was observed with the late group (44.5 ± 7.1%). After 72 hours of reperfusion, drug administration was accompanied by Akt activation (early, 121.8 ± 17.6%; late, 118.1 ± 16.4%; *P* < 0.05), as well as elevated Hsp27 expression (early, 197.2 ± 27.7%; late, 203.8 ± 36.8%; *P* < 0.05); CREB activation and Hsp70 expression were not altered. In another set of experiments in which reperfusion was limited to 15 minutes, Akt was activated only in the early group (121.8 ± 17.6%; *P* < 0.05). Moreover, CREB was activated in both the early and late groups (98.4 ± 8.3% and 107.0 ± 6.5%, respectively; *P* < 0.05), whereas Hsp27 and Hsp70 expression were not altered. These results demonstrate that A_{2A} adenosine receptor activation induces a sustained cardioprotection only if the therapy is instituted before reperfusion. This myocardial protection is associated by an early prosurvival Akt activation. CREB activation and Hsp27 content do not seem to be associated with cardioprotection because they are enhanced in both treated groups, suggesting indirect A_{2A} agonist and pathology-related effects.

Key Words: A_{2A} adenosine receptors, myocardial infarction, reperfusion, cardioprotection, Akt, CREB, heat shock protein

(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2005;45:439–446)

Salvage of the ischemic myocardium can be achieved by early coronary reperfusion.¹ On the other hand, reperfusion initiates a series of deleterious myocardial phenomena called reperfusion injury. Such events involve neutrophil and platelet accumulation,^{2–4} free radical generation,⁵ lysosomal enzyme release,⁶ and apoptosis of myocardial cells.^{7,8} All of these factors compromise the survival of jeopardized myocardial tissue to induce cell death.

Adenosine and A_{2A} adenosine receptor agonists exert protective effects against reperfusion injury^{9–23} (for reviews see Vinten-Johansen et al²⁴ and Headrick et al²⁵). A_{2A} adenosine receptor stimulation during the first 2 hours of reperfusion reduces both infarct size and apoptosis¹⁸ via mechanisms involving reduction of caspase-3 activity and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activation.²² Whether this beneficial effect is sustained or delays cell death as observed with other therapeutic agents^{26,27} remains unknown.

A_{2A} adenosine receptors are G_s protein-coupled receptors that generate cAMP and activate PKA. The cAMP response element binding protein (CREB) is a transcription factor activated by PKA via phosphorylation on serine-133 in response to cAMP generation (for reviews see Shaywitz and Greenberg²⁸ and Montminy²⁹), such as occurs during A_{2A} adenosine receptor stimulation. CREB significance in a model of postischemic cardioprotection is yet to be resolved, but it may reduce apoptosis as observed in vitro with PC12 cells.

One possible mechanism explaining A_{2A}-mediated myocardial protection would be that CREB activation could lead to increased expression of protective genes and proteins³⁰ such as heat shock proteins (Hsp). Hsp are ubiquitously expressed proteins involved in protein chaperoning for adequate folding of other proteins.^{31,32} Hsp27 and Hsp70 are 2 major Hsp involved in cardiac protection. Ischemia^{33,34} and reperfusion³⁵ can modify Hsp levels. Overexpression of Hsp70 in the intact heart³⁶ and overexpression of Hsp27 in isolated cardiomyocytes^{37,38} or the heart³⁹ confer resistance to ischemia-reperfusion injury, thereby demonstrating a potential role of these Hsp in cardioprotective processes.

Received for publication December 9, 2004; accepted January 19, 2005.

From the *Centre de Biomédecine, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Québec, Canada; †Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; and ‡Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Supported by the Heart & Stroke Foundation of Québec.

Reprints: Dr. Guy Rousseau, PhD, Centre de Biomédecine, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, 5400 boulevard Gouin Ouest, Montréal, Québec H4J 1C5, Canada [redacted]

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

Thus, this study was designed to determine (1) if the beneficial effect of A_{2A} adenosine receptors in postischemic cardioprotection is sustained, and (2) the relationships among A_{2A} adenosine receptor stimulation, cardioprotection, and changes in signal transduction.

METHODS

Materials

All chemicals were obtained from Sigma (St Louis, MO) unless specified. 2-*p*-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine hydrochloride (CGS21680) is from Tocris (1063; Bristol, UK). Leupeptin and microcystin LR were from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Anti-Hsp27 (C-20; sc-1048) was from Santa-Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA). Anti-CREB (06-863) and anti-phospho-CREB (06-519) are from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-Hsp70 (Ab-3; RB-080-A0) is from Neomarkers (Fremont, CA). Anti-phospho-Akt (9271), anti-Akt (9272), and antirabbit antibodies (7074) are from Cell Signaling (Beverly, MA). Tween 20 was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, Canada). Dimethylsulfoxide (DMSO), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), and sodium chloride were from Laboratoire MAT (Beauport, Canada). Lowry protein assay reagents were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Enhanced chemiluminescence reagents were from Perkin-Elmer (Markham, Ontario).

Experimental Groups and Protocols

Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, Québec) weighing between 350 and 450 g were handled in compliance with procedures of the local Animal Care Committee.

Protocol A

Rats were randomly assigned to the following groups: (1) control group receiving vehicle (DMSO), (2) early-treated group (early) where CGS21680 (A_{2A} adenosine receptor agonist) was administered 5 minutes before beginning of reperfusion (0.2 µg/kg/min) into the jugular vein, and (3) late-treated group (late), where the same treatment was instituted 5 minutes after the beginning of reperfusion. Treatments were administered for 120 minutes. The dosage of CGS21680 was chosen in accordance with pilot study data and those obtained in previous studies.^{18,22} Animals were sacrificed after 72 hours of reperfusion. Six to 10 hearts/group were used for infarct sizing and area at risk measurements, and 4 hearts/groups were rapidly frozen without infarct sizing for Western blotting.

Protocol B

Rats were randomly assigned to the following groups: (1) control group, (2) early group, and (3) late group. Animals were sacrificed after 15 minutes of reperfusion, and treatments were administered until sacrifice. Four hearts/group were rapidly frozen for Western blotting.

In vivo Surgical Procedure

Anesthesia was induced with ketamine/xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg, respectively) and maintained with isoflurane

(1%). Animals were intubated and placed on a small-animal respirator to maintain ventilation. Body temperature was monitored during surgery using a rectal probe. A catheter was inserted into the jugular vein for systemic administration of pharmacological agents. A PE-50 tube connected to a pressure transducer was inserted into the right carotid to measure arterial pressure throughout surgery. Electrodes were placed on paws to record ECG and heart rate. A left thoracotomy was performed, and the left anterior descending coronary artery was occluded using a 4-0 silk suture with a plastic snare. Ischemia was confirmed by ST segment alterations and ventricular epicardial cyanosis. After 40 minutes of occlusion (ischemia), the ligature was loosened, and the myocardial tissue was reperfused. Reperfusion was confirmed by the disappearance of cyanosis. For protocol A, the thorax was closed after 15–30 minutes of reperfusion, and, following administration of the pharmacological agent, the animals were returned to their cages. Antibiotic (15,000 IU penicillin G) and analgesic (2 mg/kg of butorphanol) therapies were instituted subsequent to surgery for all animals. For protocol B, the thorax remained open until the end of the reperfusion period (15 minutes).

Following the reperfusion period, the animals were sacrificed, and their hearts were rapidly excised. For 1 set of experiments (protocol A), hearts were used exclusively for infarct sizing and area at risk measurements. For the other set of experiments (protocol A and B), hearts were used for Western blotting without infarct sizing and area-at-risk measurements.

Infarct Sizing and Area at Risk Measurement

Infarct size and area at risk were determined as described previously.²² Briefly, at the end of the reperfusion period, the heart was removed, and the left anterior descending coronary artery was occluded at the same site. To determine the area at risk (AR), Evans blue (0.5%) was infused into the aorta by retrograde perfusion. The heart was frozen (–80°C for 5 minutes) and then sliced into 4–5 transverse sections of 2 mm. Each section was stained at 37°C for 5 minutes in a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (TTC 1%, pH 7.4) to determine the area of necrosis (I). Myocardial infarction was expressed as a percentage of necrosis of the AR (I/AR). Moreover, AR was expressed as a percentage of left ventricle (LV) area (AR/LV).

Western Blotting

Protein samples were prepared from snap-frozen left ventricular tissue, as described previously.²² Briefly, ischemic and nonischemic cardiac tissue samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 20 mM β-glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, 5 mM DTT, 1 µM microcystin LR, and 1% Triton X-100). The homogenate was incubated for 30 minutes at 4°C and centrifuged for 15 minutes at 10,000 × g at 4°C. The protein content was then assessed using the Lowry method (Bio-Rad). Aliquots of 50–150 µg of protein were subjected to 10–15% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis on a mini-gel apparatus (Bio-Rad). Transfer was performed with

a Trans-Blot SD semidry transfer cell (Bio-Rad) on Protran nitrocellulose membrane (Mandel, Montréal, Québec). Protein transfer efficiency was assessed using Ponceau red S dye. Nonspecific sites were blocked using 5% nonfat dry milk in TBS-T (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20), and membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibody (diluted 1:1000–2500 in 5% nonfat dry milk into TBS-T). Subsequently, membranes were washed and incubated for 45 minutes at room temperature with the secondary antibody (diluted 1:5000 in 5% nonfat dry milk into TBS-T) conjugated to horseradish peroxidase. Membranes were washed and exposed on a Scientific Imaging Film (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario) or on a Kodak ImageStation 440CF using Enhanced Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario). Band intensities were analyzed using Kodak 1D v3.5.5 Scientific Imaging Software. Appropriate controls were evaluated for phosphorylated proteins by reprobating the same membrane with the total protein antibody.

Ischemic region protein phosphorylation and expression results are expressed as a percentage of data derived from the nonischemic region (NI). This was done to normalize and reduce interanimal variability.

Statistics

Results are expressed as mean (± SE of the mean). Data were evaluated using one-way analysis of variance, followed by a Bonferroni post-hoc test. Mortality rates during reperfusion were evaluated with a χ² statistical test. *P* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Physiologic and Hemodynamic Parameters

Body and heart weights as well as heart-to-body-weight ratio did not differ between groups (Table 1). Heart rates and mean arterial blood pressures monitored during surgery were similar between groups (Table 2). The A_{2A} agonist did not exert any significant hemodynamic effect as mean arterial pressure and heart rate remained stable and similar between groups. Rectal temperature was 37 ± 0°C during the surgical procedures.

TABLE 1. Animal Body and Heart Weights Before Surgery (Basal) and at the End of 72 Hours of Reperfusion

	Basal	At 72 Hours of Reperfusion
BW (g)		
Control	388.0 ± 10.3	366.4 ± 9.8
Early	384.8 ± 8.1	358.5 ± 9.9
Late	389.5 ± 7.3	367.8 ± 9.8
HW (g)		
Control		1.38 ± 0.06
Early		1.45 ± 0.06
Late		1.34 ± 0.00
HW/BW		
Control		0.0038 ± 0.0001
Early		0.0041 ± 0.0002
Late		0.0037 ± 0.0001

Parameters are similar between groups (BW, body weight; HW, heart weight; n = 10–12/group).

Eight rats died during ischemia (2 rats for the control group, 3 for the early group, and 3 for the late group), and 10 during reperfusion (2 rats for the control group, 4 rats for the early group, and 4 rats for the late group); they were excluded from this study. Mortality rates during reperfusion were similar in all groups (χ² = 1.038; *P* = 0.595).

Infarct Size and Area at Risk

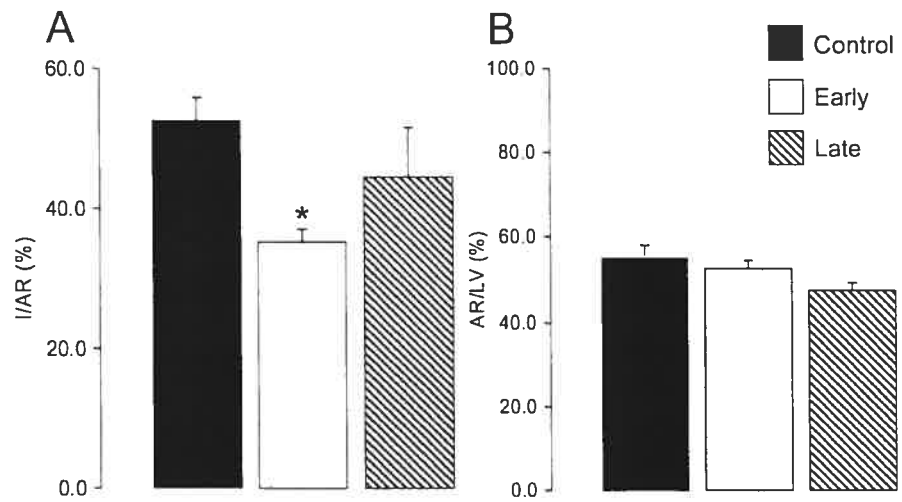
Infarct size, expressed as a percentage of the area at risk (I/AR; Fig. 1A), was significantly reduced in the early (35.2 ± 1.9%) compared with control group (52.5 ± 3.4%) after 72 hours of reperfusion. In the late group, infarct size was not reduced significantly (44.5 ± 7.1%). Area at risk (AR), expressed as a percentage of the total left ventricle (LV) area and representing approximately 50% of the LV area (Fig. 1B), was similar between groups. These results demonstrate that sustained myocardial protection by A_{2A} adenosine receptor activation after 72 hours of reperfusion is afforded only if the drug administration is instituted before the beginning of reperfusion.

TABLE 2. Heart Rates and Mean Arterial Blood Pressure During Surgical Procedures

	Basal	Ischemia			Reperfusion			
		0 min	20 min	40 min	0 min	20 min	40 min	120 min
HR (bpm)								
Control	249 ± 7	254 ± 10	248 ± 6	234 ± 5	232 ± 4	245 ± 6	235 ± 6	238 ± 8
Early	243 ± 6	248 ± 7	250 ± 9	233 ± 6	231 ± 6	231 ± 6	243 ± 6	236 ± 8
Late	248 ± 6	251 ± 8	245 ± 7	247 ± 5	249 ± 6	248 ± 4	247 ± 3	247 ± 5
MABP (mm Hg)								
Control	73.3 ± 6.0	75.0 ± 12.6	70.0 ± 6.0	70.0 ± 2.9	68.3 ± 1.7	69.0 ± 4.6	73.3 ± 4.4	72.3 ± 5.4
Early	73.3 ± 6.0	70.0 ± 7.6	65.0 ± 5.8	66.7 ± 4.4	61.0 ± 2.1	56.7 ± 7.3	53.3 ± 4.4	76.7 ± 9.3
Late	80.0 ± 0.0	81.7 ± 10.1	68.0 ± 3.8	67.3 ± 2.7	68.3 ± 6.0	64.0 ± 3.8	62.3 ± 6.7	75.7 ± 9.9

No significant change between groups was observed in either heart rates or mean arterial blood pressures (HR, heart rate; MABP, mean arterial blood pressure; bpm, beat per minute; n = 13–15/group).

FIGURE 1. A, Infarct size (I) expressed as a percentage of the area at risk (AR) showed a marked reduction in the early group as compared with control group. However, no significant reduction was observed in the late group. B, Area at risk (AR) expressed as a percentage of the left ventricle (LV) was similar between groups (n = 6–10; *P < 0.05 versus control group).



Protein Expression

Akt

Protocol A

Akt activation was assessed by phosphorylation levels via Western blotting. Results show a significant Akt phosphorylation augmentation in the presence of the agonist for the early (118.4 ± 20.2%) and late groups (95.8 ± 15.8%) compared with control (32.8 ± 6.3%; Fig. 2A), whereas no differences were identified between the 2 former groups. Total

Akt expression was similar between groups (Fig. 2B). Moreover, a significant increase in Akt activation ratio (phosphorylated levels to total content) was observed in the presence of CGS21680. Indeed, when compared with control (40.2 ± 4.0%), this ratio was significantly elevated in the late group (118.1 ± 16.4%; Fig. 2C). Similarly, the same ratio was enhanced significantly in the early group (121.8 ± 17.6%), with no differences compared with the late group. Hence, Akt was significantly activated after 72 hours of reperfusion in both the early and late groups.

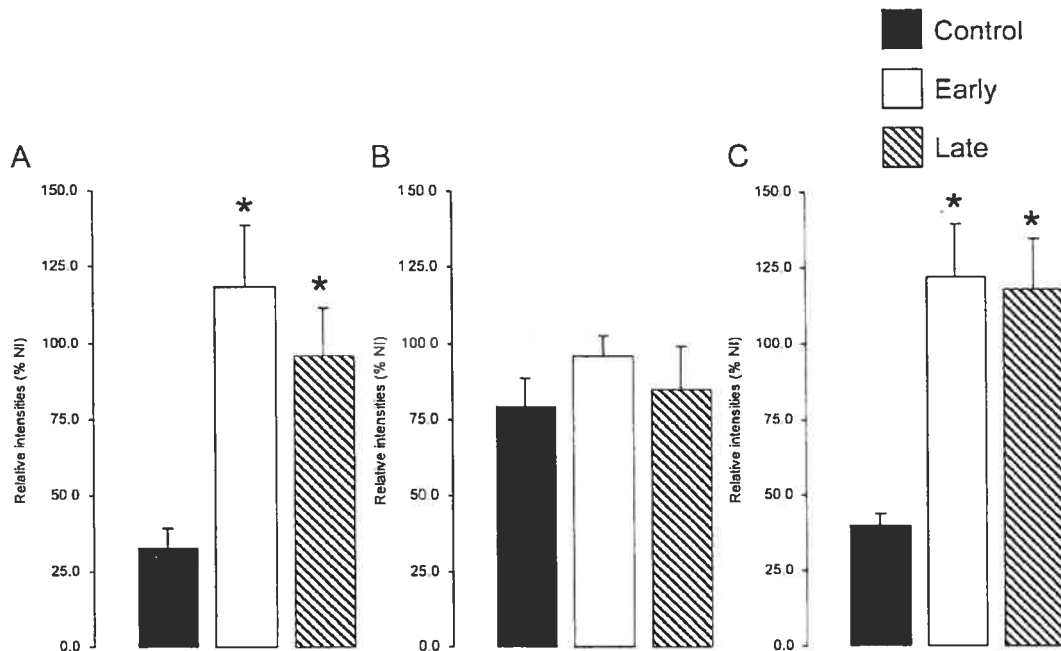


FIGURE 2. A, Akt phosphorylation assessed by Western blotting after 72 hours of reperfusion. Phosphorylation was significantly enhanced in the early and late groups. B, Total Akt protein content assessed by Western blotting was similar between groups. C, Phosphorylated to total protein content ratio in both early and late groups was significantly enhanced after 72 hours of reperfusion (n = 4/group; *P < 0.05 versus control group; NI, nonischemic region).

Protocol B

Phosphorylation status of Akt was enhanced significantly after 15 minutes of reperfusion in the early group (508.6 ± 143.7%) but not in the late group (219.9 ± 65.4%) when compared with the control group (80.8 ± 25.8%, Fig. 3A). Similarly, phosphorylated to total protein content ratio was enhanced in the early group (642.0 ± 143.8%) but not in the late group (215.3 ± 65.5%) compared with control (112.5 ± 31.2%, Fig. 3C). Total Akt protein content did not differ between groups (Fig. 3B). Therefore, Akt was significantly activated in the early group after 15 minutes of reperfusion.

CREB

Protocol A

CREB activation was measured via its phosphorylation level. Neither the phosphorylation level (control, 107.0 ± 5.0%; early, 100.2 ± 7.7%; late, 104.9 ± 22.6%) nor the total content (control, 105.1 ± 10.9%; early, 118.3 ± 24.2%; late, 109.8 ± 29.0%) were altered after 72 hours of reperfusion. Moreover, the ratio of the phosphorylated form to total content (control, 104.4 ± 6.7%; early, 97.7 ± 21.9%; late, 102.4 ± 21.4%) was similar between groups at 72 hours of reperfusion. Thus, CREB activation was similar between groups after 72 hours of reperfusion.

Protocol B

Pharmacological treatment with the A_{2A} agonist significantly enhanced CREB phosphorylation status (Fig. 4A) from 34.5 ± 7.6% for the control group to 104.0 ± 12.6% for the early and 99.6 ± 2.8% for the late group. Total CREB content did not differ among the groups (Fig. 4B). Similarly, phosphorylated to total protein content (Fig. 4C) was significantly enhanced in both early (98.4 ± 8.3%) and late (107.0 ± 6.5%) groups in contrast to the control group

(38.5 ± 9.0%). Hence, CREB was significantly activated in both the early and late groups after 15 minutes of reperfusion.

Hsp27 and Hsp70

Protocol A

Following 72 hours of reperfusion, we observed an enhanced Hsp27 protein content following A_{2A} agonist administration regardless of administration moment. Indeed, when compared with the control group (82.1 ± 8.5%), Hsp27 content was significantly elevated in the early (197.2 ± 27.7%) and late groups (203.8 ± 36.8%; Fig. 5A). No differences were observed between the latter 2 groups. On the other hand, the pharmacological intervention did not influence Hsp70 protein content (Fig. 5B), which was found to be similar in the different experimental groups after 72 hours of reperfusion (control, 70.9 ± 22.7%; early, 50.4 ± 9.2%; late, 57.0 ± 12.5%). Thus, Hsp27 content was enhanced in both the early and late groups after 72 hours of reperfusion, whereas Hsp70 was not affected.

Protocol B

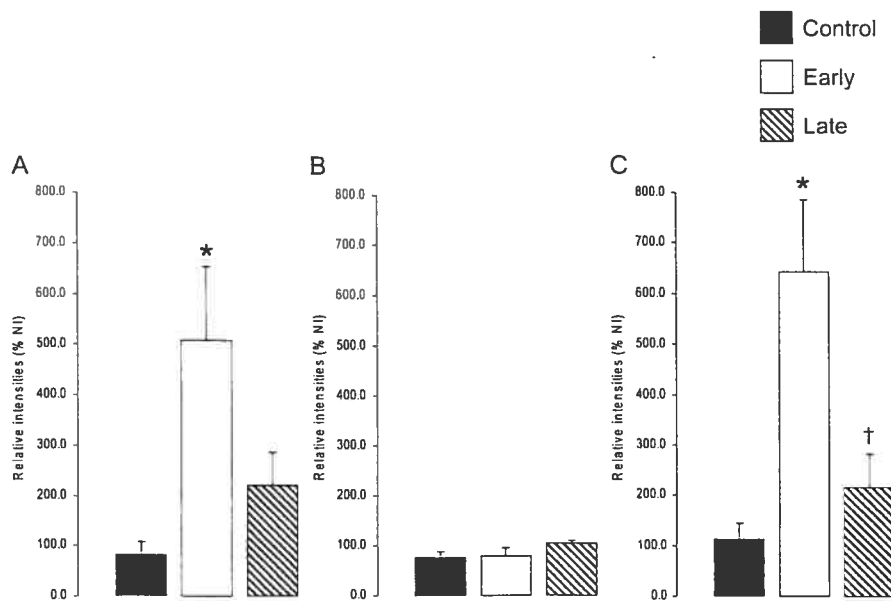
Hsp27 protein expression levels after 15 minutes of reperfusion did not differ between groups (control, 31.0 ± 4.2%; early, 70.7 ± 19.4%; late, 56.4 ± 22.8%). Likewise, Hsp70 protein levels were similar between groups after the same reperfusion period (control, 89.7 ± 12.0%; early, 100.3 ± 29.0%; late, 90.5 ± 9.3%). Therefore, after 15 minutes of reperfusion, Hsp27 and Hsp70 protein content is not different between groups.

DISCUSSION

Infarct Size Reduction

The present study demonstrates that myocardial protection afforded by A_{2A} adenosine receptor stimulation initiated

FIGURE 3. A, Akt phosphorylation assessed by Western blotting after 15 minutes of reperfusion. Phosphorylation was significantly enhanced only in the early group. B, Total Akt protein content assessed by Western blotting was similar between groups. C, Phosphorylated to total protein content ratio only in the early groups was significantly enhanced after 15 minutes of reperfusion (n = 4/group; *P < 0.05 versus control group, †P < 0.05 versus early group; NI, nonischemic region).



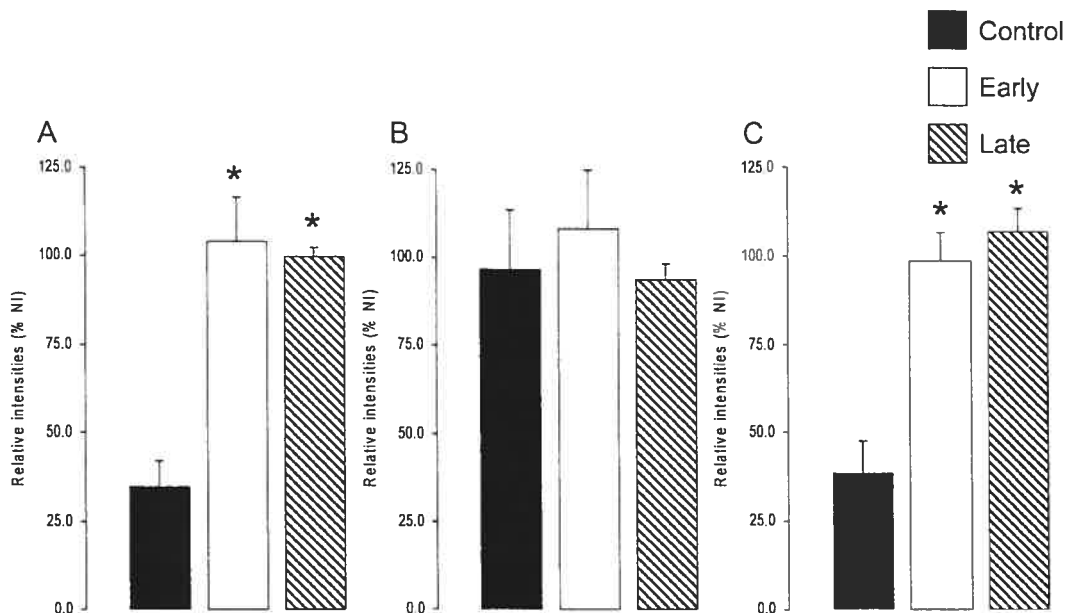


FIGURE 4. A, CREB phosphorylation assessed by Western blotting after 15 minutes of reperfusion. Phosphorylation was significantly enhanced in both early and late groups. B, Total CREB content assessed by Western blotting was similar between groups. C, Phosphorylated to total protein content ratio was significantly increased in the early and late groups (n = 4/group; *P < 0.05 versus control group; NI, nonischemic region).

before the beginning of the reperfusion period is sustained after 72 hours of reperfusion. Even though therapeutic interventions can be cardioprotective with 4–6 hours of reperfusion, some of these interventions only delay cell death because infarct size is similar between experimental groups regardless of the treatment with longer periods of reperfusion. Chambers et al,²⁶ employing a nonsteroidal antiinflammatory, flurbiprofen, that inhibits cyclooxygenases, and Simpson et al,²⁷

using the prostacyclin analogue iloprost, observed a loss of beneficial effects on infarct size with longer reperfusion periods. Our results indicate that A_{2A} adenosine receptor stimulation before the onset of reperfusion affords a sustained cardioprotection rather than delaying damage emergence.

Pharmacokinetic models suggest that there is not enough compound remaining in the circulation to exert pharmacological effects after 4 to 5 half-lives because the compound is

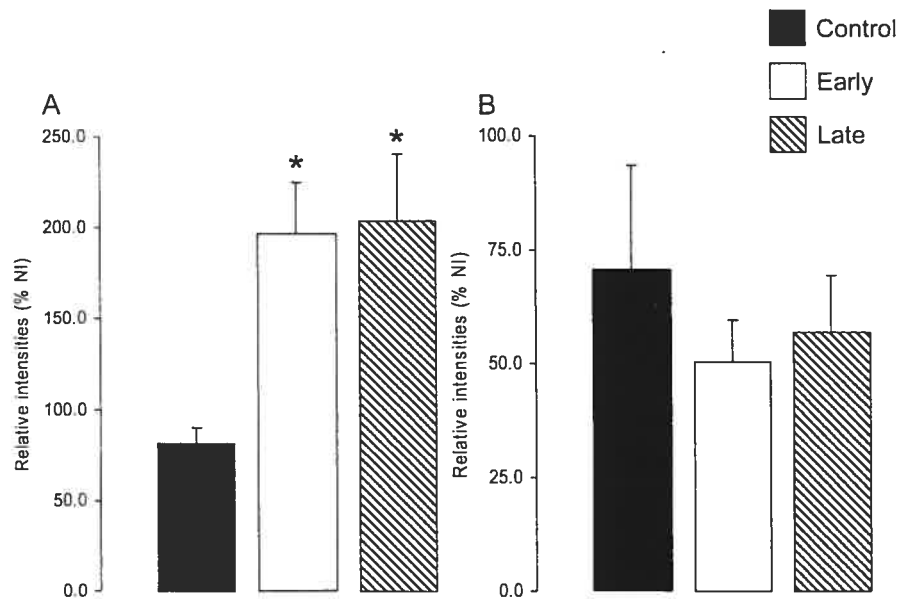


FIGURE 5. A, Hsp27 protein expression assessed by Western blotting after 72 hours of reperfusion. Significantly increased Hsp27 expression was observed in both early and late groups. B, Hsp70 protein expression, assessed by Western blotting after 72 hours of reperfusion, was not altered between groups (n = 4/group; *P < 0.05 versus control group; NI, nonischemic region).

biotransformed and rapidly eliminated.^{40,41} To resolve this issue in our model, we administered intravenously CGS21680 continuously over 2 hours. This compound possesses a plasma half-life of approximately 20 minutes.^{42,43} The 4- to 5-half-life period represents approximately 3 to 4 hours of reperfusion in the present protocol. Hence, there would be no more agonist in the circulation 72 hours after the onset of reperfusion. Thus, the reduction of infarct size observed presumably was caused by an effect induced by CGS21680 early in reperfusion.

Because A_{2A} adenosine receptor activation can produce vasodilation, it is possible that CGS21680 may have acted by reducing afterload during reperfusion. In the present study, we did not detect any change in hemodynamic parameters between groups. Data suggest that CGS21680 had no significant vasodilation effects in our model. Differences in experimental design for drug administration and in animal species may explain the fact that no vasodilation was observed in our protocol. Furthermore, it is interesting to note that when vasodilation is observed in cardioprotection models involving CGS21680,^{19,44} the drug imparts no cardioprotective effects. Hence, the protective effect is abolished in the presence of a hemodynamic effect.

Protein Expression and Activation

In the present study, rapid Akt activation was observed only in the early group after 15 minutes of reperfusion, with an intermediate value for the late group. This observation can be explained by the small, nonsignificant infarct-limiting effect of A_{2A} agonist therapy instituted just after the beginning of reperfusion. This corroborates the timing hypothesis that to induce significant cardioprotection, therapy must be started early in reperfusion. Furthermore, prosurvival kinases have to be rapidly activated to generate such cardioprotection. We previously showed that prosurvival PI3K activation is necessary to induce significant cardioprotection.²² Data reported herein corroborate and validate this hypothesis because Akt is a downstream effector of PI3K. Akt activation leads to infarct size reduction (reviewed by Hausenloy and Yellon⁴⁵). Surprisingly, Akt can still be activated after 72 hours of reperfusion. Even though infarct size was not reduced in the late group to the same extent as in the early group, Akt activation might represent the result of less cell death, reduced infarct size, and A_{2A} adenosine receptor activation. The exact mechanism whereby that occurs remains unknown. Further studies are needed to resolve this issue.

The present study reports that CREB activation in the early and late groups was significantly enhanced after 15 minutes of reperfusion and returned to control values after 72 hours. CREB is activated by G protein-coupled receptors producing cAMP, such as A_{2A} adenosine receptors. However, results suggest that CREB activation is not essential to elicit significant cardioprotection because only the early group showed significant infarct size reduction. Nevertheless, we cannot exclude CREB effect in myocardial protection, even though it may only be minor.

Recent studies suggest that CREB can also regulate Hsp gene transcription.⁴⁶ Enhanced Hsp27 expression observed in both the early and the late groups is in accord with that suggestion and could have played a cardioprotective role in

our model as in other models.^{38,39} As with CREB, Hsp27 appeared to play a minor cardioprotective role in our model because in the late group, Hsp27 expression was enhanced without any significant modification of infarct size. In our model, Hsp27 expression increased after a certain period of time following initiation of reperfusion, something that is essential for its transcription. In this context, it is not surprising that the cardioprotective Hsp27 role was minor because it is not overexpressed before the onset of ischemia-reperfusion. As a result of the effects of Hsp27 on protein folding, any increase in its expression may be beneficial on a long-term basis.

CONCLUSION

A_{2A} adenosine receptor stimulation following 40 minutes of ischemia and 72 hours of reperfusion results in sustained myocardial protection. This myocardial protection is observed only if the therapy is instituted before the onset of reperfusion. Concomitant with significant infarct size reduction, our results demonstrate that rapid Akt activation occurs after 15 minutes of reperfusion. Moreover, regardless of when the A_{2A} agonist therapy begins, Akt is still activated after 72 hours of reperfusion. On the other hand, CREB transcription factor is rapidly activated and fades after 72 hours of reperfusion. Because enhancement of Hsp27 expression was observed in both the early and late groups, it appears that some signaling pathways modulated by the pathology and the A_{2A} agonist are needed to increase its expression. This study demonstrated the sustained cardioprotective effect of A_{2A} adenosine receptor after 72 hours of reperfusion, which is accompanied by an early Akt activation, whereas CREB activation and Hsp27 expression seem to have only a minor cardioprotective effect in that model.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Dr Andrew Armour for critical reading of the manuscript, Diane Boucher for secretarial assistance, as well as Pierre Fortier and Caroline Bouchard for their technical expertise and assistance. M.B. is a scholar of the Fond de Recherche en Santé du Québec, Heart and Stroke Foundation of Québec, and Réseau de Santé Cardiovasculaire. G.R. is a scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec. The authors thank the Heart & Stroke Foundation of Québec for funding.

REFERENCES

1. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, et al. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. I. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977;56:786-794.
2. de Lorge M, Rousseau G, Basmadjian A, et al. Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1990;3:143-153.
3. Chatelain P, Latour JG, Tran D, et al. Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation*. 1987;75:1083-1090.
4. Rousseau G, Hébert D, Libersan D, et al. Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J*. 1993;125:1553-1563.

5. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, et al. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res*. 1984;54:277-285.
6. Wildenthal K. Lysosomal alterations in ischemic myocardium: result or cause of myocellular damage? *J Mol Cell Cardiol*. 1978;10:595-603.
7. Gottlieb RA, Bursleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1994;94:1621-1628.
8. Fliss H, Gattlinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*. 1996;79:949-956.
9. Schlack W, Schäfer M, Uebing A, et al. Adenosine A₂-receptor activation at reperfusion reduces infarct size and improves myocardial wall function in dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22:89-96.
10. Forman MB, Jackson EK. Adenosine therapy at reperfusion on myocardial infarct size. *Cardiovasc Res*. 1997;33:497-498.
11. Lozza G, Conti A, Ongini E, et al. Cardioprotective effects of adenosine A₁ and A_{2A} receptor agonists in the isolated rat heart. *Pharmacol Res*. 1997;35:57-64.
12. Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, et al. Adenosine A₂ receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280:301-309.
13. Cargnoni A, Ceconi C, Boraso A, et al. Role of A_{2A} receptor in the modulation of myocardial reperfusion damage. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;33:883-893.
14. Xu Z, Yang XM, Cohen MV, et al. Limitation of infarct size in rabbit hearts by the novel adenosine receptor agonist AMP 579 administered at reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:2339-2347.
15. Lasley RD, Jahania MS, Mentzer RM Jr. Beneficial effects of adenosine A_{2A} agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium. *Am J Physiol*. 2001;280:H1660-H1666.
16. Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata A, et al. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: The Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:1711-1720.
17. Xu Z, Downey JM, Cohen MV. AMP 579 reduces contracture and limits infarction in rabbit heart by activating adenosine A₂ receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38:474-481.
18. Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, et al. Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:57-68.
19. Kis A, Baxter GF, Yellon DM. Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A₁/A₂ receptor agonist: role of A_{2A} receptor and Erk1/2. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2003;17:415-425.
20. Peart JN, Flood A, Linden J, et al. Adenosine-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:117-129.
21. Xu Z, Downey JM, Cohen MV. Timing and duration of administration are crucial for antiinfarct effect of AMP 579 infused at reperfusion in rabbit heart. *Heart Dis*. 2003;5:368-371.
22. Boucher M, Pesant S, Falcao S, et al. Post-ischemic cardioprotection by A_{2A} adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;43:416-422.
23. Budde JM, Morris CD, Velez DA, et al. Reduction of infarct size and preservation of endothelial function by multidose intravenous adenosine during extended reperfusion. *J Surg Res*. 2004;116:104-115.
24. Vinten-Johansen J, Thourani VH, Ronson RS, et al. Broad-spectrum cardioprotection with adenosine. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:1942-1948.
25. Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol*. 2003;285:H1797-H1818.
26. Chambers DE, Yellon DM, Hearse DJ, et al. Effects of flubiprofen in altering the size of myocardial infarcts in dogs: reduction or delay? *Am J Cardiol*. 1983;51:884-890.
27. Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, et al. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. *Circ Res*. 1988;63:1070-1079.
28. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:821-861.
29. Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:807-822.
30. Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in heart. *J Clin Invest*. 1998;101:2415-2426.
31. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet*. 1988;22:631-677.
32. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res*. 2001;51:637-646.
33. Knowlton AA, Brecher P, Apstein CS. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. *J Clin Invest*. 1991;87:139-147.
34. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, et al. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*. 1993;88:1264-1272.
35. Nishizawa J, Nakai A, Higashi T, et al. Reperfusion causes significant activation of heat shock transcription factor 1 in ischemic rat heart. *Circulation*. 1996;94:2185-2192.
36. Marber MS, Mestrlil R, Chi SH, et al. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest*. 1995;95:1446-1456.
37. Martin JL, Mestrlil R, Hilal-Dandan R, et al. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation*. 1997;96:4343-4348.
38. Vander Heide RS. Increased expression of HSP27 protects canine myocytes from simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 2002;282:H935-H941.
39. Hollander JM, Martin JL, Belke DD, et al. Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and a nonphosphorylatable heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in a transgenic mouse model. *Circulation*. 2004;110:3544-3552.
40. Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology*. New York: McGraw-Hill, 2001.
41. Hardman JG, Limbird LE, Molinof PB, et al. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996.
42. Chovan JP, Zane PA, Grenberg GE. Automated-extraction, high-performance liquid chromatographic method and pharmacokinetics in rats of a highly A₂-selective adenosine agonist, CGS 21680. *J Chromatogr*. 1992;578:77-83.
43. Webb RL, Sills MA, Chovan JP, et al. CGS 21680: A potent selective adenosine A₂ receptor agonist. *Cardiovasc Drug Rev*. 1992;10:26-53.
44. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, et al. Intravenous pretreatment with A₁-selective analogues protects the heart against infarction. *Circulation*. 1992;85:659-665.
45. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. 2004;61:448-460.
46. Dawson VL, Dawson TM. Mechanisms of ischemic tolerance. In: Chan PH, ed. *Cerebrovascular Diseases, 22nd Princeton Conference*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, pp 58-71.



