

2M11.2751.8

Université de Montréal

11310394  
v.015

# **Sauvegarde permanente du myocarde reperfusé par l'énoxaparine**

Par

Caroline Nickner

Département de Pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en pathologie et biologie cellulaire

Octobre, 1999

© Caroline Nickner, 1999



3m 11 4721.8

W  
4  
U58  
2000  
V.015

Université de Montréal

Service de renseignements du registre

requis par l'élaboration

Par

Gérard Rivest

Département de Psychologie et Biologie Cellulaire

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la suite des études en vue de

l'obtention du grade de

Maîtrise en Sciences (M.Sc.)

en Psychologie et Biologie Cellulaire

Oct. 1982

1982



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Sauvegarde permanente du myocarde  
reperfusé par l'énoxaparine**

présenté par :

Caroline Nickner

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr Tack Ki Leung .....Président rapporteur**

**Dr Jean-Gilles Latour ..... Directeur de recherche**

**Dr Yahye Merhi ..... Membre du jury**

Mémoire accepté le :

## Sommaire

L'ischémie engendrée par l'occlusion aiguë d'une artère coronaire compromet rapidement la survie du myocarde dans la région privée de circulation sanguine. La reperfusion du myocarde limite l'étendue des dommages ; cependant, plusieurs études expérimentales ont démontré que le retour du flot sanguin dans le tissu ischémique provoque des dommages supplémentaires importants. Plusieurs travaux visent à établir des moyens thérapeutiques pour prévenir ces lésions de reperfusion et réduire l'étendue de l'infarctus. Dans une étude antérieure, l'énoxaparine, une héparine de bas poids moléculaire, a réduit la taille de l'infarctus de 55% dans un modèle canin d'ischémie (90 min) / reperfusion (6 hres) et le mécanisme de cette cardioprotection a été corrélé avec une réduction des lésions de reperfusion et plus précisément avec une diminution de l'accumulation de plaquettes et de neutrophiles dans le myocarde.

Le but de cette présente étude était de déterminer si la cardioprotection exercée par l'énoxaparine est transitoire ou permanente. A cette fin, la période de reperfusion a été prolongée à 72 heures, suivant une occlusion coronarienne de 90 minutes chez le chien. L'étude comportait deux groupes de chiens, soit le groupe traité où l'énoxaparine (1.25 mg/kg) était administrée par voie intraveineuse 5 minutes avant le début de la reperfusion et de manière constante par voie sous-cutanée jusqu'à la fin de l'expérience et le groupe témoin où la saline remplaçait l'énoxaparine.

Les débits collatéraux mesurés avec des microsphères radioactives n'ont pas été significativement différents entre le groupe témoin et le groupe traité, ni

dans les différentes zones du myocarde ni de façon transmurale ( $0.084 \pm 0.02$  et  $0.100 \pm 0.02$  mL/min/g respectivement). La zone à risque mesurée par la perfusion de colorant était similaire dans les deux groupes et impliquait environ 43% du ventricule gauche. Une réduction de l'infarctus mesuré par histochimie (coloration au chlorure de triphényltétrazolium ; TTZ) et exprimé en fonction de la zone à risque était réduit de 9.8% entre les deux groupes (témoin ;  $52.64 \pm 3.88$  vs traité ;  $47.49 \pm 5.74$  %). Toutefois, si l'analyse était effectuée chez les chiens présentant un débit collatéral transmurale supérieur à 0.08 mL/min/g, une réduction significative ( $p < 0.05$ ) de 32.3 % de la taille de l'infarctus (% de la zone à risque) était observée dans le groupe traité [témoin (n=6) ;  $48.19 \pm 4.04$  vs traité (n=6) ;  $32.54 \pm 4.2$ ]. Cette réduction a été confirmée par une analyse de covariance effectuée entre la taille de l'infarctus et le débit collatéral transmurale.

Aucun marqueur plasmatique de la nécrose myocardique (CK, CK-MB et troponine I) n'a démontré une réduction de leur libération chez les chiens traités à l'énoxaparine comparativement aux chiens témoins. Ainsi, dans ce modèle chirurgical, la réduction de la taille de l'infarctus chez le groupe traité n'a pas été confirmée avec une diminution de la libération de ces marqueurs de la nécrose.

En conclusion, l'énoxaparine administrée avant le début de la reperfusion chez les chiens présentant un débit collatéral significatif ( $>0.08$  mL/min/g) a réduit de 32.5 % la taille de l'infarctus ( $p < 0.05$ ) comparativement au groupe témoin après 72 heures de reperfusion. Ces résultats confirment la nature soutenue ou permanente de la cardioprotection exercée par l'énoxaparine.

## Table des matières

<b>IDENTIFICATION DES MEMBRES DU JURY .....</b>	<b>i</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>ii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX, FIGURES, GRAPHIQUES ET RÉACTIONS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE</b>	
<b>CHAPITRE 1 : ISCHÉMIE ET REPERFUSION MYOCARDIQUE</b>	
<i>1.1 Introduction .....</i>	<b>3</b>
<i>1.2 Ischémie myocardique et infarctus .....</i>	<b>4</b>
<i>1.2.1 Changements biochimiques survenant lors de la période ischémique .....</i>	<b>4</b>
<i>1.2.2 Altérations cellulaires consécutives à l'ischémie .....</i>	<b>8</b>
<i>1.3 Les marqueurs plasmatiques de la nécrose cellulaire .....</i>	<b>13</b>
<i>1.4 L'apoptose dans l'infarctus du myocarde .....</i>	<b>17</b>
<i>1.5 Progression de l'infarctus .....</i>	<b>20</b>
<i>1.5.1 Influence du débit collatéral sur la taille de l'infarctus .....</i>	<b>21</b>
<i>1.5.2 Influence de la taille de la zone à risque .....</i>	<b>23</b>
<i>1.5.3 Influence de la demande métabolique .....</i>	<b>23</b>
<i>1.6 Physiopathologie des lésions de reperfusion .....</i>	<b>26</b>
<i>1.6.1 Implication des radicaux libres dans les lésions de reperfusion .....</i>	<b>29</b>
<i>a) Le métabolisme des catécholamines .....</i>	<b>29</b>
<i>b) Les mitochondries .....</i>	<b>29</b>
<i>c) Les leucocytes accumulés dans le tissu myocardique .....</i>	<b>30</b>
<i>d) La xanthine oxydase .....</i>	<b>30</b>
<i>e) Le monoxyde d'azote .....</i>	<b>35</b>
<i>f) La peroxydation des lipides membrannaires .....</i>	<b>35</b>
<i>1.6.2 Rôle des neutrophiles dans les lésions de reperfusion .....</i>	<b>38</b>
<i>a) Les sélectines .....</i>	<b>39</b>

b) <i>Les intégrines et les immunoglobulines</i> .....	41
1.6.2.1 <i>Recrutement des neutrophiles dans le myocarde reperfusé</i> .....	42
1.6.2.2 <i>Les médiateurs cytotoxiques libérés par les neutrophiles</i> .....	45
1.6.2.3 <i>Traitement visant à réduire l'effet cytotoxique des neutrophiles</i> .....	48
1.6.3 <i>Rôle des plaquettes dans les lésions de reperfusion</i> .....	50
1.6.4 <i>Rôle de la microcirculation</i> .....	54
1.7 <i>Conclusion</i> .....	57
<b>CHAPITRE 2 : PROTECTION MYOCARDIQUE EN COURS D'ISCHÉMIE-REPERFUSION PAR DES AGENTS ANTITRHOMBOTIQUES</b>	
2.1 <i>Introduction</i> .....	59
2.2 <i>La réocclusion coronarienne</i> .....	60
2.3 <i>Les microthrombus et les lésions de reperfusion</i> .....	62
2.4 <i>Les héparines dans les lésions de reperfusion</i> .....	64
2.4.1 <i>Activités anticoagulantes des héparines</i> .....	67
2.4.2 <i>Autres propriétés des héparines et protection myocardique</i> .....	70
2.5 <i>Traitements anti-plaquettaire</i> .....	76
2.5.1 <i>Mécanismes d'action de l'aspirine</i> .....	77
2.5.2 <i>Inhibiteurs de la glycoprotéine GPIIb/IIIa plaquettaire</i> .....	80
2.6 <i>Conclusion</i> .....	81
<b>PARTIE 2 : CONTRIBUTION ORIGINALE</b>	
<b>CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODE</b>	
3.1 <i>Introduction</i> .....	83
3.2 <i>Études Animales</i> .....	84
3.2.1 <i>Chirurgie</i> .....	84
3.2.2 <i>Groupes expérimentaux</i> .....	86
3.2.3 <i>Mesure des débits myocardiques</i> .....	86
3.2.4 <i>Évaluation de la taille de l'infarctus et de la zone à risque</i> .....	88
3.2.5 <i>Mesure des créatines kinases (CK et CK-MB) et de la troponine I</i> .....	89
3.2.6 <i>Test de coagulation (aPTT) et activité anti-Xa</i> .....	90
3.2.7 <i>Analyses statistiques</i> .....	91

<b>CHAPITRE 4 : RÉSULTATS</b>	
4.1 <i>Caractéristiques et données hématologiques des groupes étudiés</i> .....	92
4.2 <i>Données hémodynamiques</i> .....	96
4.3 <i>Débits régionaux et collatéraux</i> .....	97
4.4 <i>Zone hémorragique</i> .....	97
4.5 <i>Zone à risque et taille de l'infarctus</i> .....	98
4.6 <i>Activité des créatines kinases plasmatiques</i> .....	99
4.6.1 <i>Créatine kinase</i> .....	99
4.6.2 <i>Isoenzyme CK-MB</i> .....	101
4.7 <i>Troponine I</i> .....	103
4.8 <i>Les tests de coagulation</i> .....	106
4.8.1 <i>Temps de thromboplastine partiellement activée (aPTT)</i> .....	106
4.8.2 <i>Activité anti-Xa</i> .....	106
<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION</b> .....	122
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	129
<b>ANNEXE</b> .....	162
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	164

## Liste des figures, tableaux, graphiques et réactions

Figure 1.1 : La phosphorylation oxydative et le métabolisme des acides gras libres	5
Figure 1.2 : Énumération sommaire des changements ultrastructuraux en fonction de la durée de l'ischémie	12
Figure 1.3 : Physiopathologie des lésions de reperfusion	28
Figure 1.4 : Formation de l'anion superoxyde par la xanthine oxydase survenant pendant l'ischémie-reperfusion	31
Figure 1.5 : Interaction entre les neutrophiles et l'endothélium dans les phénomènes de roulement, d'adhésion et d'agrégation	45
Figure 2.1 : Structure chimique de l'énoxaparine	65
Figure 2.2 : Cascade de coagulation	68
Réaction 1 : Phosphorylation de l'ATP catalysée par la créatine kinase	14
Réaction 2 : Activité de la xanthine déhydrogénase	32
Réaction 3 : Activité de la xanthine oxydase	32
Réaction 4 : Réaction de Fenton	34
Équation 1 : Exemple de calcul des débits myocardiques à partir de microsphères	87
Tableau 2.1 : Avantages d'utilisation des HBPM comparativement à l'héparine lors d'angine instable	66
Tableau 4.1 : Description des groupes expérimentaux	93
Tableau 4.2 : Paramètres de base des chiens étudiés	94
Tableau 4.3 : Compte de globules blancs au cours de l'expérience	108
Tableau 4.4 : Compte plaquettaire au cours de l'expérience	108

Tableau 4.5 : Pourcentage d'hématocrite au cours de l'expérience	109
Tableau 4.6 : Hémoglobine au cours de l'expérience	109
Tableau 4.7 : Activité de la créatine kinase plasmatique	117
Tableau 4.8 : Activité de la créatine kinase MB	118
Tableau 4.9 : Dosage de la troponine I	119
Tableau 4.10 : Temps de thromboplastine partiellement activé mesuré au cours de l'expérience	120
Tableau 4.11 : Dosage de l'activité anti-Xa mesurée au cours de l'expérience	121
Graphique 4.1 : Les données hémodynamiques pour tous les chiens étudiés	110
Graphique 4.2 : Débit sanguin mesuré dans le tissu myocardique pour tous les chiens étudiés	111
Graphique 4.3 : Pourcentage d'hémorragie dans le tissu myocardique pour l'ensemble des chiens	112
Graphique 4.4 : Pourcentage du tissu myocardique infarci pour l'ensemble des chiens étudiés	113
Graphique 4.5 : Corrélation entre la taille de l'infarctus et le débit collatéral transmural chez les chiens témoins et traités à l'énoxaparine	114
	115
Graphique 4.6 : Pourcentage du tissu myocardique infarci chez les chiens ayant un débit collatéral supérieur	115
Graphique 4.7 : Corrélation entre la taille de l'infarctus et le débit collatéral transmural ( $>0.08$ mL/min/g) chez les chiens témoins et traités à l'énoxaparine	116

**Liste des abréviations :**

ADN : acide désoxyribonucléique

ACDAG : Artère coronaire descendante antérieure gauche

ADP : Adénosine 5'-diphosphate

AMP : Adénosine 5'-monophosphate

aPTT : Temps de thromboplastine partiellement activée

ASA : Acide acétylsalicylique

ATIII: Antithrombine III

ATP : Adénosine 5'-triphosphate

BE : Bleu d'Évens

CCPA : Conseil Canadien de protection des animaux

CIIH : Cofacteur II de l'héparine

CK : Créatine kinase

CoA : Coenzyme A

CP : Créatine phosphate

Crp : Protéine régulatrice du complément

DFX : Déferoxamine

EDRF : Facteur relaxant dérivé de l'endothélium

EGF : Facteur de croissance de l'épiderme

ESL-1 : ligand-1 de la E-sélectine

Fxa : Facteur Xa

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GP : glycoprotéine

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

HBPM : Héparine de bas poids moléculaire

IFN-gamma : Interféron-gamma

IL : Interleukine

iNOS : Synthase inductible de l'oxyde nitrique

Kda : Kilo Dalton

LPS : Lipopolysaccharides

LT : Leucotriène

MPO : Myélopéroxydase

NAD : Nicotine adénine dinucléotide

NO : Monoxyde d'azote

O<sup>2-</sup> : Anion superoxyde

OH : Radical hydroxyle

PAF : Facteur activateur des plaquettes

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PG : Prostaglandine

PMN : Polymorphonucléaire

PSGL-1 : P-sélectine glycoprotéine ligand-1

rt-PA : Facteur recombinant du plasminogène tissulaire

Slex : Sialyl Lewis X

SOD : Superoxyde dismutase

TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale  $\alpha$

TTZ : Chlorure de triphényltétrazolium

TX : Thromboxane

XD : Xanthine déhydrogénase

## Introduction

Lorsqu'un thrombus se forme à la surface d'une plaque athéromateuse, l'occlusion d'une artère coronaire peut survenir et causer une ischémie aiguë du myocarde mettant en péril la survie du tissu dans le territoire cible.

La thrombolyse et l'angioplastie rétablissent la circulation sanguine dans ces artères occluses, limitant l'étendue des dommages myocardiques et le taux de mortalité. Cependant, plusieurs études expérimentales ont démontré que le retour du flot sanguin dans le tissu ischémique provoque des dommages supplémentaires au myocarde, limitant sa sauvegarde. La production et la libération d'agents cytotoxiques par les neutrophiles et les plaquettes recrutés au site de reperfusion conjointement à une défaillance microcirculatoire seraient à l'origine des lésions de reperfusion.

Plusieurs travaux ont cherché à élucider la physiopathologie complexe des lésions de reperfusion dans le but de développer des agents cardioprotecteurs aptes à prévenir ces lésions et à réduire l'étendue de l'infarctus. Parmi ceux-ci, une héparine de bas poids moléculaire, l'énoxaparine, a démontré son efficacité à réduire la taille de l'infarctus dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion de brève durée. Cette cardioprotection était associée à une réduction importante du nombre de plaquettes et de neutrophiles séquestrés dans le foyer infarci. Ces deux types cellulaires ont été identifiés comme des intervenants majeurs dans les lésions post-ischémiques

du myocarde.

La présente étude a pour but de déterminer si la cardioprotection exercée par l'énoxaparine est transitoire ou permanente. A cette fin, la période de reperfusion a été prolongée à 72 heures par opposition à 6 heures, suivant une occlusion coronarienne de 90 minutes chez le chien. Nos résultats indiquent que l'énoxaparine réduit l'étendue de l'infarctus, seulement chez les animaux présentant un flux collatéral significatif ( $> 0.08$  ml/min/g de myocarde). Ces résultats indiquent que la cardioprotection exercée par l'énoxaparine est de caractère soutenu ou permanent.

## Partie 1 : Revue de littérature

### Chapitre 1

#### Ischémie et reperfusion myocardique

##### 1.1 Introduction

L'ischémie engendrée par l'occlusion aiguë d'une artère coronaire compromet rapidement la survie du myocarde dans la région privée de circulation sanguine. Toutefois, la capacité du myocarde à résister à la période ischémique varie d'une espèce à l'autre, selon l'activité métabolique du cœur et la présence d'un flot collatéral responsable d'un gradient ischémique dans la paroi ventriculaire, la région endocardique étant plus ischémique que la région épocardique.

Des études expérimentales chez le chien ont largement contribué aux connaissances actuelles de la physiopathologie de l'infarctus et des lésions de reperfusion. Chez cette espèce, la reperfusion du myocarde, suivant une occlusion d'une durée maximale de 20 minutes, se traduit par une récupération totale des myocytes compromis <sup>1</sup>. Par contre, le prolongement de la période ischémique au-delà de 20 minutes cause des dommages irréversibles au myocarde le plus sévèrement touché par l'ischémie, et favorise l'élargissement de la taille ultime de l'infarctus à tout le territoire compromis <sup>2,3</sup>. La reperfusion, soit par des moyens pharmacologiques ou chirurgicaux, est nécessaire à la survie du myocarde. Plusieurs études multicentriques ont

démontré l'impact du traitement thrombolytique sur la fonction ventriculaire gauche et la réduction de la mortalité à court et moyen terme <sup>4,5</sup>. Les bénéfices de la reperfusion sont cependant atténués par un ensemble de phénomènes qui limitent ou compromettent la sauvegarde des cardiomyocytes qui n'ont pas subis des dommages irréversibles au moment de la reperfusion <sup>6</sup>. Les atteintes réversibles comprennent des changements cellulaires pouvant être renversés lors du retour sanguin, contrairement aux lésions irréversibles, trop sévères qui ne permettent pas la sauvegarde du tissu. Ainsi, cet endommagement post-ischémique, appelé lésions de reperfusion, contribue de façon significative à l'établissement de la taille ultime de l'infarctus <sup>7</sup>.

Dans ce chapitre, nous décrivons dans un premier temps les altérations cellulaires secondaires à l'ischémie et les différents marqueurs utilisés dans l'identification de la nécrose cellulaire. Puis, les événements liés à la progression de l'infarctus en insistant sur les principaux facteurs influençant la taille de l'infarctus. Nous exposerons la physiopathologie des lésions de reperfusion dont l'implication des radicaux libres, des neutrophiles, des plaquettes au niveau de la microcirculation dans le développement de celles-ci.

## **1.2 Ischémie myocardique et infarctus**

### **1.2.1 Changements biochimiques survenant lors de la période ischémique**

Dans des conditions aérobiques normales, les cardiomyocytes utilisent les acides gras, le glucose ainsi que les acides aminés afin de produire de

l'énergie (adénosine triphosphate ; ATP et créatine phosphate ; CP) par un processus de phosphorylation oxydative <sup>8</sup> (figure 1.1).

Le métabolisme des glucides s'effectue via la glycolyse et le cycle de Krebs et mène à l'oxydation complète des glucides en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et ATP. Par contre, lors de l'ischémie, l'oxygène n'étant plus disponible pour l'acceptation des électrons produits par la chaîne respiratoire, le métabolisme des glucides résulte alors en la production de lactate. L'augmentation rapide de la concentration intracellulaire d'acide lactique jumelée à une diminution du pH et à une accumulation des métabolites, inhibent la glycolyse réduisant la production d'ATP dans la cellule <sup>9</sup>. Une étude a démontré, suite à une période ischémique de 15 minutes, une réduction de 50% de la concentration d'ATP sub-endocardique et malgré 72 heures de reperfusion, une diminution de 24% était toujours observée pour ne revenir à des concentrations normales qu'après 7 jours. Ce phénomène a également cours, mais moins sévère, dans la région sous-épicardique <sup>10</sup>.

**Figure 1.1 : La phosphorylation oxydative et le métabolisme des acides gras libres (Hillis L.D. et Braunwald E., New England Journal of Medecine, 5 mai 1977)**

Plusieurs enzymes intervenant dans le cycle de Krebs augmentent leur activité pendant la période ischémique afin de compenser la diminution d'énergie <sup>8,11</sup>. L'hexokinase enzyme qui catalyse la conversion du glucose en glucose-6-phosphate, la phosphorylase kinase enzyme qui régit la conversion de la phosphorylase b (forme inactive) en phosphorylase a (forme active) qui est responsable de la conversion du glycogène en glucose-1-phosphate, et la phosphofructokinase qui catalyse la conversion du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-diphosphate, voient leur activité accrue suite à une déprivation en ATP et en créatine kinase ainsi que par une augmentation d'AMP, d'ADP et de phosphates inorganiques <sup>8</sup>. Toutes ces réactions contribuent à préserver la viabilité de la cellule. Cependant, elles ne sont biochimiquement actives que pour une courte période. En effet, peu de temps après le début de l'ischémie, il y a une diminution de la glycolyse et la concentration en acide lactique s'accroît suite à l'activation de la glycolyse anaérobie <sup>9</sup>. L'accumulation de lactate inhibe certaines enzymes indispensables à la glycolyse, telle la phosphofructokinase, qui entraîne l'accumulation de glucose-6-phosphate qui inhibe l'hexokinase. La phosphorylase kinase est également inhibée, ce qui freine la dégradation du glycogène. L'activité catalytique de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase est aussi diminuée, limitant la dégradation du 3-phosphoglyceraldéhyde en 1,3-diphosphoglycerate, interrompant le cycle de Krebs. Ainsi l'accumulation d'acide lactique inhibe la glycolyse et par le fait même, la production d'ATP et ce même si les substrats sont présents en

grande quantité <sup>9</sup>.

Conjointement avec le glucose, les acides gras intracellulaires constituent le substrat préférentiel pour la production d'énergie de la cellule en conditions normales. Les acides gras incorporés dans la cellule myocardique participent à la biosynthèse des triglycérides ou des esters acyls contenant le coenzyme A qui sont transportés du cytosol vers les mitochondries par la carnitine palmitoyl-CoA transférase en vue de leur  $\beta$ -oxydation. La  $\beta$ -oxydation des acides gras libres inhibe la glycolyse via une augmentation de glucose-6-phosphate, qui inhibe l'hexokinase et diminue l'utilisation des glucides <sup>8</sup>. En conditions ischémiques, le métabolisme des acides gras est largement modifié : la  $\beta$ -oxydation des acides gras se trouve diminuée par l'absence d'oxygène, l'augmentation du rapport NADH/NAD et la réduction de la concentration en flavoprotéines <sup>11</sup>. De plus, une augmentation de l'acyl-CoA via une perte d'activité de la carnitine palmitoyl-CoA transférase favorise l'estérification des acides gras libres en triglycérides <sup>11</sup>. Les lipides constituent la source énergétique la plus concentrée de l'organisme. Le rendement énergétique de leur catabolisme est approximativement le double de celui de la dégradation du glucose ou des protéines, c'est-à-dire 38 kJ/g de lipides par comparaison à 17 kJ/g de glucides ou de protéines. La réduction de l'activité  $\beta$ -oxydante des acides gras est un facteurs important dans la baisse d'énergie observée en condition anaérobique.

Le déséquilibre entre l'apport et la demande énergétique entraîne donc

une baisse du pH intracellulaire et une accumulation de catabolites comme le phosphate inorganique. Ces deux conséquences, associées à la déplétion d'ATP, entraînent une baisse de la contractilité cardiaque ainsi qu'une perte de l'intégrité et des fonctions membranaires dans les régions ischémiques du myocarde <sup>12</sup>.

### **1.2.2 Altérations cellulaires consécutives à l'ischémie**

Plusieurs études décrivent les changements ultrastructuraux des myocytes résultant d'une période ischémique brève ou prolongée (figure 1.2). Ces travaux démontrent bien que les cardiomyocytes de chien privés d'un apport sanguin pour une période allant jusqu'à 20 minutes, présentent des changements cellulaires modérés qui peuvent être renversés lors de la reperfusion <sup>3,13</sup>. Les lésions réversibles qu'entraîne cette courte période ischémique se caractérisent par une augmentation du volume des tubules et des mitochondries conjointement avec une dispersion ou une margination de la chromatine nucléaire <sup>3,13</sup>. Le nombre de granules de glycogène des myocytes est réduit. À ce stade, quelques minutes de reperfusion du tissu ischémique rend ces modifications sublétales non détectables <sup>1</sup>.

Lorsque l'occlusion se prolonge au-delà de 20 minutes, des lésions cellulaires plus importantes surviennent dans le tissu ischémique telle que de l'œdème intra-cytoplasmique et intra-mitochondriale <sup>2,3,13</sup>. Cette augmentation du volume cellulaire est due à des changements progressifs du métabolisme menant à la détérioration de la composition, de la structure et de

la fonction membranaire cellulaire. Ces altérations se traduisent par un déséquilibre au niveau des fluides et des électrolytes avec une perte de  $K^+$  et de  $Mg^{2+}$  en plus d'une accumulation intracellulaire d'eau, de  $Na^+$ , de  $Cl^-$ , de  $H^+$  (acidose), et de  $Ca^{2+}$  14. Une augmentation de la perméabilité membranaire provoque également la libération plasmatique de plusieurs constituants intracytoplasmiques, comme des enzymes, des co-facteurs et des ions 15,16. Quelques marqueurs de la nécrose cellulaire ont ainsi été identifiés dans le plasma et des méthodes ont été mises au point afin de mesurer ces marqueurs. Parmi ceux-ci, le dosage des créatines kinases et des troponines représentent un outil fiable dans le diagnostic de l'infarctus aigu du myocarde. Des corps denses et amorphes composés de lipides et de protéines dénaturées s'accumulent à l'intérieur de la matrice mitochondriale suite à une rupture des crêtes et membranes externes mitochondriales 2,3. L'endothélium des vaisseaux coronaires subit également des dommages qui sont plus marqués dans la région sub-endocardique suite à 60 minutes d'occlusion 17. Des lésions microvasculaires sévères et diffuses sont observées après 3 heures d'ischémie 18. Elles sont caractérisées principalement par la disparition de vésicules pinocytiques, l'apparition des foyers d'hémorragie et des dépôts intra et extravasculaires de fibrine 17.

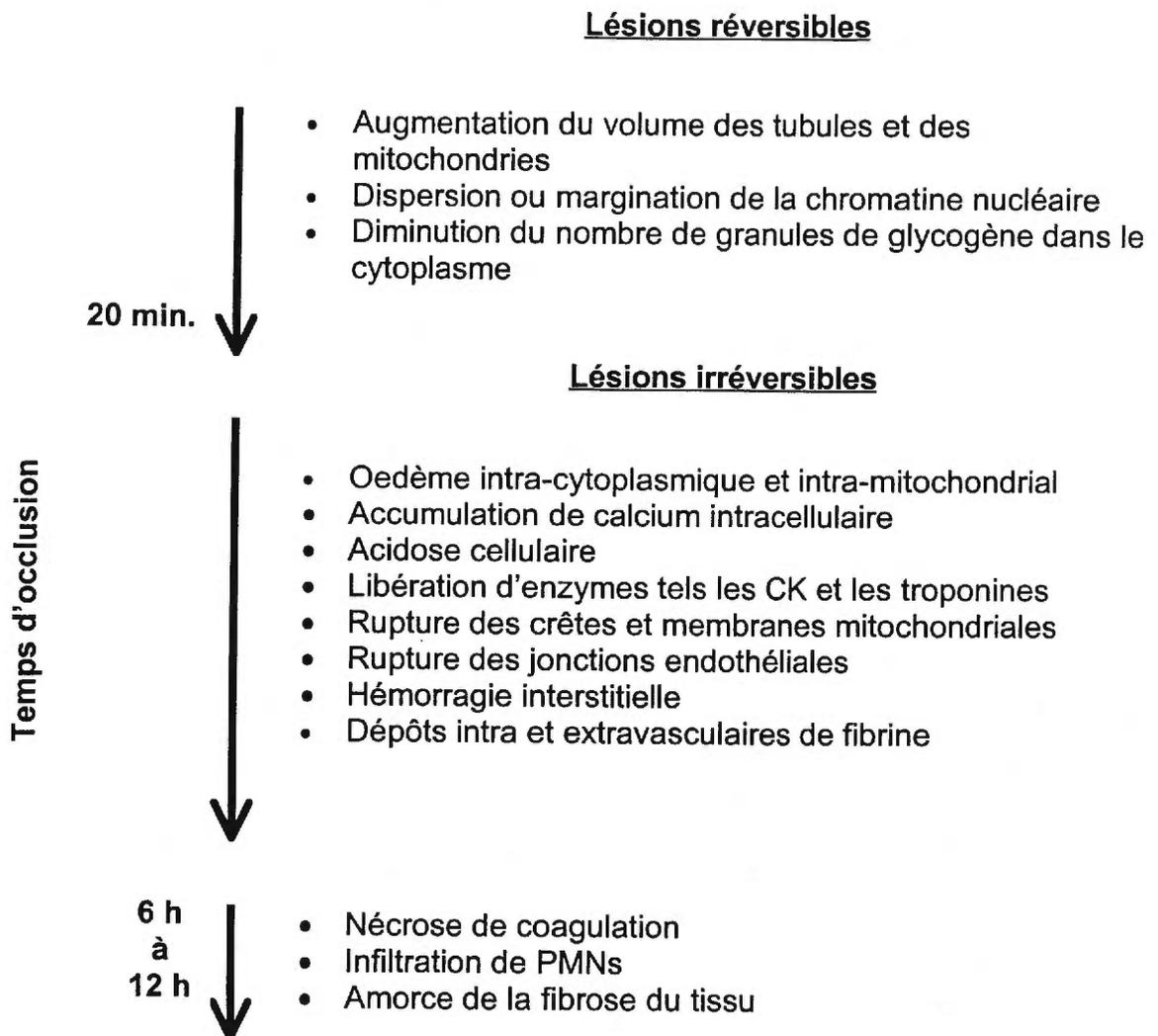
En absence de reperfusion, il y a apparition de nécrose de coagulation caractérisée par la perte du noyau, la dissolution ou la condensation des phospholipides mitochondriales et la disparition des myofilaments des bandes Z

et I<sup>19</sup>. L'infiltration d'éosinophiles et de polymorphonucléaires (PMNs) s'amorce entre 6 et 12 heures d'ischémie<sup>20</sup> et le tissu nécrosé est progressivement remplacé par du tissu cicatriciel<sup>21</sup>. Si il y a reperfusion après une période ischémique qui se prolonge au-delà de 20 minutes, les dommages ultrastructuraux sont accentués résultant en une supercontraction des cellules musculaires et conduisant à la rupture du sarcolemme et des myofibrilles des myocytes. L'examen histologique révèle une hyperplasie ou de l'œdème cellulaire excessif avec une rupture et une disparition des mitochondries en plus d'une formation de granules denses intramitochondriaux constitués de calcium et de phosphate<sup>13,22,23</sup>. L'ensemble de ces événements mène à la nécrose en bandes de contraction secondaire à un influx massif de calcium extracellulaire « calcium paradox » à travers la membrane altérée et une accumulation de calcium intra-mitochondriale<sup>2,3</sup>. Les bandes de contraction apparaissent seulement lorsque les cellules myocardiques deviennent nécrosées en cours de reperfusion et sont dues à un regroupement des sarcomères préalablement séparés par une rupture myofibrillaire<sup>2,3</sup>.

En résumé, les cardiomyocytes démontrent des changements biochimiques et ultrastructuraux précoces lors de la période ischémique. Si le débit sanguin coronaire est rapidement rétabli (en deçà de 20 minutes), les myocytes manifestant des lésions réversibles peuvent retrouver une structure et une fonction normales après un certain temps. Un prolongement excessif de la période ischémique entraîne des lésions irréversibles qui surviennent lorsque le

niveau de phosphates à haute énergie atteint un seuil insuffisant au maintien de l'intégrité structurale de la cellule <sup>1</sup>. Ces lésions provoquent la mort cellulaire la cicatrisation du tissu.

**Figure 1.2 : Énumération sommaire des changements ultrastructuraux en fonction de la durée de l'ischémie**



### 1.3 Les marqueurs plasmatiques de la nécrose cellulaire

La perte de l'intégrité membranaire lors d'atteintes cellulaires mène à la libération d'enzymes cytoplasmiques. Parmi celles-ci, deux principaux types de marqueurs plasmatiques de la nécrose ont été identifiés jusqu'à maintenant : les créatines kinases, dont l'isoenzyme MB est plus spécifique au myocarde, et les troponines I et T. Ces marqueurs sont utiles dans l'évaluation des dommages myocardiques observés suite à une période d'ischémie et de reperfusion.

La créatine kinase (CK) est composée de deux sous-unités, soit la sous-unité B (cerveau) et la sous-unité M (muscle). Trois différentes combinaisons sont possibles : CK-BB retrouvée majoritairement dans le cerveau, la prostate et les poumons; CK-MM retrouvée principalement dans les muscles squelettiques et le muscle cardiaque; CK-MB qui représente la forme majeure du muscle cardiaque (15% des CK myocardiques) et retrouvée, à moindre degré, dans le muscle squelettique (<5%). Plusieurs études démontrent une préférence envers l'utilisation d'un dosage de l'isomère MB de la CK, ceci étant attribuable à sa plus grande spécificité pour le muscle cardiaque <sup>24,25</sup>. La créatine kinase est retrouvée dans le cytosol des cellules musculaires où elle catalyse la phosphorylation de l'ATP (réaction 1). Au début d'une activité musculaire intense, l'ATP emmagasiné dans les muscles actifs est consommé en 6 secondes. Par la suite, un système supplémentaire de production rapide de l'ATP se met en marche, en attendant que les voies métaboliques s'adaptent à l'augmentation soudaine de la demande en ATP. La réaction qui a lieu alors

couple l'ADP (produit de l'hydrolyse de l'ATP) avec la créatine phosphate (CP), un composé à haute énergie emmagasiné dans les muscles. Globalement, il en résulte un transfert presque instantané d'énergie et d'un groupe phosphate vers l'ADP qui devient de l'ATP 26.

**Réaction 1 : Phosphorylation de l'ATP catalysée par la créatine kinase :**

**Créatine kinase**



Une perte d'intégrité de la membrane plasmique survenant lors de la nécrose cellulaire, induit le déversement du contenu cytoplasmique dans le milieu interstitiel et subséquent, par diffusion, dans l'espace intravasculaire et lymphatique. Le dosage de ce composé dans le sérum est donc en relation directe avec la nécrose cellulaire myocardique 27.

La troponine est un constituant des myofibrilles qui joue un rôle dans la contraction du muscle cardiaque. Deux formes de troponine cardiaque peuvent être dosées dans le sérum, soit la troponine T associée à des fonctions de régulation et la troponine I liée à la tropomyosine et responsable de l'inhibition de la contraction musculaire. Lorsque les cardiomyocytes sont endommagés, ces composantes se détachent des cellules et peuvent diffuser dans la circulation sanguine. Les troponines T et I sont sensibles et spécifiques pour l'identification

des patients présentant des symptômes d'ischémie aiguë 28,29. La troponine I semble toutefois posséder quelques avantages sur la troponine T, car des anticorps spécifiques à 99% pour la troponine I cardiaque ont été développés contre une séquence de 26 acides aminés de sa région N-terminale 30,31.

Le dosage plasmatique de ces protéines cytosoliques est utilisé afin de déceler la présence d'infarctus, d'évaluer qualitativement sa masse et de documenter la reperfusion myocardique. Les mesures des troponines cardiaques I et T 28,29 ainsi que des créatines kinases 27 se sont avérées efficaces dans le dépistage de l'infarctus du myocarde et des lésions plus subtiles du myocarde comme les myocardites, les lésions de reperfusion et celles causées par une chirurgie cardiaque 25,32. Les principaux avantages concernant l'utilisation du dosage de ces marqueurs consistent en leur quantification rapide (moins de 20 minutes) ainsi qu'à leur simplicité d'exécution, car il peut être effectué à la maison, dans les salles d'urgence et les ambulances.

Certaines études qualifient la créatine kinase MB (CK-MB) comme le meilleur standard dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde, attribuable à sa spécificité pour le muscle cardiaque. Sa libération a été corrélée avec les dommages cellulaires irréversibles 33,34 et l'estimation de la taille de l'infarctus basée sur la libération de CK ou CK-MB s'est avérée fiable 35. Une étude effectuée chez des patients admis suite à un infarctus aigu de myocarde, démontre une corrélation significative ( $r = 0.83$ ) entre la taille de l'infarctus mesurée par le dosage de CK-MB et celle déterminée par autopsie 35. Par

contre, les CK-MB sont peu spécifiques car elles se retrouvent non seulement dans les cellules du myocarde, mais aussi au niveau du muscle squelettique. Une augmentation de ce marqueur peut également être observée lors d'un traumatisme musculaire ou encore suite à une opération chirurgicale. À titre d'exemple, les taux de CK-MB dosés chez des marathoniens après une compétition, atteignent des seuils 26 fois plus élevés que ceux mesurés lors d'une nécrose myocardique massive <sup>36</sup>.

Le dosage des troponines I et T a également été identifié comme spécifique de la nécrose cardiaque suite à un infarctus du myocarde. Une étude démontre que les concentrations de troponine I et de troponine T sont significativement plus élevées chez les patients ayant eu une occlusion coronarienne comparativement aux sujets sains (respectivement de  $72.1 \pm 15.8$  vs  $20.4 \pm 3.2$  pg/mL et de  $0.21 \pm 0.6$  vs  $0.0005 \pm 0.002$  ng/mL) <sup>37,38</sup>. Contrairement aux CK-MB, la troponine I n'est pas exprimée suite à une atteinte du muscle squelettique chez l'humain <sup>39</sup>. Chez des patients présentant des symptômes d'occlusion coronarienne, le dosage de la troponine T s'est avérée plus spécifique que celui des CK-MB dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde <sup>40</sup> et dans la prédiction de la sévérité des dommages myocardiques <sup>41</sup>.

Le dosage des créatines kinases et des troponines T et I s'est avéré efficace dans la documentation de la reperfusion myocardique chez le chien et l'humain <sup>32,42</sup>. La reperfusion rapide du myocarde chez l'humain produit une

élévation de ces marqueurs de façon précoce comparativement aux patients reperfusés après un délai supérieur à 5.5 heures ou souffrant d'une occlusion permanente <sup>43</sup>. L'efficacité de la reperfusion peut être estimée en dosant les marqueurs de la nécrose. Une reperfusion adéquate peut se traduire par une augmentation de la quantité de CK mesurée dans le sérum, ceci étant témoin d'une transition rapide du marqueur du myocarde nécrosé vers la circulation sanguine <sup>44</sup>. Par contre, des études expérimentales servant à vérifier cette hypothèse ont démontré des résultats contradictoires. Chez le chien, par exemple, la reperfusion mène à une diminution <sup>45</sup> aussi bien qu'à une augmentation <sup>46</sup> de la libération des CK. Cette divergence entre les observations peut être en relation avec l'importance du réseau de circulation collatérale présent dans le myocarde <sup>47</sup>.

En résumé, les créatines kinases et les troponines sont utiles dans l'évaluation des dommages myocardiques suivant une période d'ischémie-reperfusion. Le dosage des CK-MB semble plus spécifique du myocarde que les CK. Cependant, leur présence dans le muscle squelettique diminue leur efficacité lors de l'évaluation des dommages myocardiques <sup>36</sup>. Le dosage des troponines I et T semble un moyen plus fiable car contrairement aux CK et CK-MB, elles n'ont pas été détectées suivant des atteintes du muscle squelettique <sup>39</sup>.

#### **1.4 L'apoptose dans l'infarctus du myocarde**

La dualité entre l'apoptose et la nécrose lors d'infarctus du myocarde

suscite un intérêt grandissant. L'apoptose a initialement été caractérisée comme un phénomène physiologique compensatoire dans le processus de la mitose, au cours duquel des signaux internes activent la mort cellulaire programmée. L'apoptose a ensuite été reconnue comme un processus pouvant également être induit par des stimuli externes, autant physiologiques que pathologiques 48,49. Morphologiquement, l'apoptose est caractérisée par un processus de pycnose (rétraction du noyau par condensation de la chromatine et séparation de celle-ci en corps pycnotiques entourés d'une enveloppe nucléaire intacte), par une condensation du cytoplasme et un rétrécissement de la cellule qui mène à une fragmentation nucléaire et cellulaire. Ces corps apoptotiques sont éliminés et dégradés rapidement par les cellules adjacentes par un processus phagocytaire effectué majoritairement par les macrophages et ceci sans réaction inflammatoire. 14,50.

La mort cellulaire par nécrose a clairement été associée aux phénomènes d'ischémie-reperfusion qui est un mode de dégénérescence cellulaire auquel vient s'ajouter l'apoptose mise en évidence au cours des phases précoces et tardives suite à une occlusion coronarienne. Les cardiomyocytes possèdent la machinerie génétique nécessaire à l'induction de la mort cellulaire programmée, ce qui laisse croire que l'apoptose peut être impliquée au niveau des lésions de reperfusion. Des travaux dans un modèle expérimental chez le rat démontrent qu'une occlusion coronarienne de 2 heures active le phénomène de l'apoptose et que le nombre de cardiomyocytes entraînés dans la mort cellulaire programmée

excède de beaucoup celui des cellules nécrosées pour un période allant jusqu'à 6 heures d'ischémie <sup>51</sup>. Une seconde étude effectuée par le même groupe, démontre que la nécrose cellulaire constitue la cause majeure des dommages cellulaires secondaires à l'ischémie dans une proportion de 52 fois plus élevée à celle de l'apoptose pour le ventricule gauche et par 33 fois pour le septum interventriculaire <sup>52</sup>. Ce débat concernant le mécanisme qui contribue le plus à la mort cellulaire lors de l'ischémie myocardique n'est donc pas résolu et des études à venir devront élucider cette question.

De récentes études suggèrent que la reperfusion du muscle cardiaque induit ou accélère la mort cellulaire programmée. La reperfusion réduit la progression de l'apoptose dans le tissu ischémique et paradoxalement, accélère l'apoptose à l'intérieur du tissu non récupérable, c'est-à-dire irréversiblement atteint, ce qui fut démontré par Fliss chez le rat <sup>53</sup>. Une étude semblable effectuée chez le lapin suggère que l'apoptose peut être une conséquence spécifique des lésions de reperfusion sur les myocytes <sup>54</sup>. Une récente étude utilisant un inhibiteur de caspases, enzymes identifiées dans l'activation de l'apoptose, a démontré une diminution de la taille de l'infarctus d'environ 21% associée à une réduction de l'apoptose de l'ordre de 72% <sup>55</sup>. Ces travaux suggèrent que les lésions de reperfusion peuvent être partiellement causées par la mort cellulaire programmée.

L'identification des événements déclencheurs de l'apoptose dans l'ischémie-reperfusion suscite un intérêt grandissant. Parmi ces nouvelles

découvertes, le système du complément semble jouer un rôle dans l'apoptose myocardique suite à la reperfusion. Les composantes C5a et C5b-9 de la voie terminale du complément sont des médiateurs clefs entraînant des dommages tissulaires. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les composantes C5a et C5b-9 inhibent significativement l'apoptose et la nécrose cellulaire et réduisent l'infiltration par les PMNs <sup>56</sup>. D'autres travaux ont identifié le stress oxydatif induit par l'ischémie et la reperfusion comme facteur capable de déclencher l'apoptose. Sur des cardiomyocytes de rat, l'induction du stress oxydatif s'est révélé un événement initiateur de la fragmentation de l'ADN et de l'activation des caspases <sup>57</sup>.

L'apoptose a été identifiée dans le myocarde suite à l'ischémie <sup>51</sup> et la reperfusion <sup>54</sup>. Cependant, le lien entre la quantité d'apoptose et de nécrose cellulaire et la taille ultime de l'infarctus n'a pas été déterminé.

### **1.5 Progression de l'infarctus**

L'infarctus ne survient pas instantanément dans tout le territoire à risque suite à l'occlusion complète d'une artère coronaire. En effet, l'infarctus du myocarde se propage de manière progressive, à l'image d'un front de vague partant du sub-endocarde vers le sous-épicode <sup>58</sup>. Plusieurs facteurs sont responsables de l'étendue ultime de la taille de l'infarctus : le débit collatéral, la taille de la zone à risque ainsi que le métabolisme cellulaire.

### 1.5.1 Influence du débit collatéral sur la taille de l'infarctus :

L'occlusion d'une coronaire chez le chien entraîne une chute du débit sanguin de l'ordre de 80 à 90% dans le territoire perfusé par cette artère <sup>59</sup>. Le flot résiduel est appelé flot collatéral. La circulation collatérale permet la perfusion du tissu ischémique via un réseau d'embranchements secondaires appelés anastomoses. Sous l'influence du gradient de pression, induit suite à l'obstruction d'un vaisseau sanguin principal, ces artérioles peuvent devenir fonctionnelles ou s'ouvrir <sup>60</sup>. L'existence de cet apport sanguin est déterminant dans la sévérité de l'infarctus, car la vascularisation du tissu ischémique par ces artères permet un apport énergétique capable de retarder ou de prévenir la nécrose des cardiomyocytes ayant subi une période ischémique. Chez plusieurs modèles expérimentaux, une grande variabilité de la taille ultime de l'infarctus a été notée malgré un site d'occlusion coronarien identique. Une étude du myocarde ischémique chez le chien a démontré une augmentation du débit collatéral à 24 heures d'occlusion et qui devient plus marquée à 96 heures, suggérant la formation et/ou le recrutement des vaisseaux collatéraux <sup>61</sup>. Chez d'autres espèces, comme le porc et le primate, la circulation collatérale est peu développée <sup>62</sup>, constituant un apport négligeable dans la région ischémique. En absence de reperfusion, la taille de l'infarctus dans ces modèles se rapproche de la taille de la zone à risque, qui est la région dépourvue de circulation sanguine lors d'une occlusion coronarienne <sup>63</sup>. Contrairement au chien, l'infarctus chez le lapin apparaît premièrement dans la

région médiane du myocarde et progresse graduellement à la fois vers l'endocarde et l'épicarde <sup>64</sup>. À l'opposé, le cobaye ne présente aucune zone d'hypoperfusion suite à l'occlusion permanente d'une artère coronaire majeure en raison du débit collatéral abondant <sup>62</sup>. Le chien se situe entre ces deux extrêmes puisque la taille de l'infarctus constitue environ 55% de la zone à risque suivant une occlusion coronarienne de 90 minutes <sup>65</sup>.

Le débit collatéral est donc extrêmement variable, selon les espèces animales et une relation de proportionnalité inverse a été établie entre la taille de l'infarctus et le développement du réseau collatéral lors d'une occlusion permanente <sup>61,66</sup>. Une étude comparant plusieurs modèles expérimentaux (le porc, le chien et l'humain), a démontré que les espèces avec circulation collatérale développée peuvent tolérer un temps d'ischémie allant jusqu'à 4 heures avec récupération complète de la fonction suivant la reperfusion, tandis que celles sans circulation collatérale tolèrent un maximum d'une heure d'ischémie <sup>67</sup>. Dans ces travaux, l'influence de la reperfusion sur la taille de l'infarctus n'a cependant pas été évaluée.

La distribution du réseau de vaisseaux collatéraux n'est pas uniforme dans toute l'épaisseur du myocarde. Des études réalisées chez le chien ont démontré qu'il s'existe un gradient de circulation collatérale de l'endocarde vers l'épicarde, la région sub-endocarde recevant environ 30 à 50% du débit sous-épicardique <sup>19,58</sup>. La pression de perfusion, la résistance extra-vasculaire, la taille de la zone à risque ainsi que le calibre, le nombre et la localisation des

vaisseaux collatéraux ont été identifiés comme des facteurs déterminants du débit coronaire lors d'une occlusion aiguë chez les chiens <sup>68</sup>.

### **1.5.2 Influence de la taille de la zone à risque :**

La superficie de la zone ischémique, nommée zone à risque, représente également un déterminant de la taille ultime de l'infarctus et varie grandement selon le modèle expérimental, ainsi que chez l'humain. Par exemple, lors de l'évaluation de la taille de la zone à risque par la perfusion de technetium-99m hexakis-2-méthoxyisobutyl isonitrile (99mTc-MIBI) avant le début de la reperfusion, Christian et al <sup>69</sup> ont mesuré des zones à risque allant de 2 à 73% du ventricule gauche chez l'humain. Dans cette étude, les régions à risque inférieures à 20% de la masse ventriculaire gauche ne présentent aucune zone infarctée. Par contre, plus la région à risque devient étendue, plus la taille de l'infarctus est élevée. D'autres études ont réussi à mesurer des zones nécrosées à l'intérieur de zones à risque inférieures à 20% <sup>70</sup>. Chez le chien, une forte corrélation a été démontrée entre la taille de la zone à risque et la taille de l'infarctus <sup>71,72</sup>. Lors d'une étude où l'artère interventriculaire était occluse pendant 1.5, 4 et 24 heures, une corrélation de 85% a été démontrée entre la taille de l'infarctus et celle de la zone à risque <sup>73</sup>.

### **1.5.3 Influence de la demande métabolique :**

La demande métabolique reflète le besoin énergétique du myocarde nécessaire à son fonctionnement et constitue un troisième facteur déterminant de la taille de l'infarctus et est variable d'une espèce à l'autre. Une étude

effectuée chez le chien démontre une réduction rapide des phosphates à hautes énergie lors d'une occlusion coronarienne <sup>74</sup>. La quantité de créatine phosphate est rapidement diminuée dans les trois premières minutes de l'ischémie et l'ATP intracellulaire est diminuée de 35% à 15 minutes et de plus de 90% à 40 minutes d'ischémie comparativement aux conditions normales de perfusion sanguine.

Plusieurs facteurs interviennent dans l'établissement de la taille de l'infarctus et ceux-ci sont responsables de la propagation du front de l'onde partant de l'endocarde vers l'épicarde. La durée de la période ischémique a un impact direct sur les altérations cellulaires survenant au niveau des myocytes chez le chien. Une occlusion de l'artère coronaire interventriculaire ou de l'artère circonflexe d'une durée inférieure à 15 minutes ne produit aucune lésion irréversible et les cardiomyocytes ischémiques retrouvent une structure et une fonction normales suite à la reperfusion. Par contre, si la période ischémique dure plus de 15 minutes, plusieurs cellules cardiaques de la région sub-endocardique seront alors entraînées dans un processus de mort cellulaire produisant des foyers diffus de nécrose <sup>75</sup>. Une occlusion coronarienne de 40 à 60 minutes provoque des lésions irréversibles sur une grande étendue de la région endocardique <sup>19</sup>, épargnant les régions mésocardiques et épocardiques. La vulnérabilité de la région sub-endocardique à l'ischémie peut s'expliquer par un apport sanguin moindre en l'absence de circulation collatérale <sup>19,58</sup> et/ou d'une demande métabolique plus élevée associée à la tension de la paroi et au

besoin en oxygène plus important <sup>76</sup>. En effet, la force compressive extravasculaire exercée par la pression ventriculaire pendant la systole est plus élevée dans la zone sub-endocardique comparativement à la zone sous-épicaire. Pour cette raison, le débit coronaire lors de la systole est grandement réduit à l'intérieur de cette région. Dans des conditions normales chez le chien, le ratio du débit coronaire est de 1.25 : 1 de l'endocarde vers l'épicarde. La combinaison de la mise en tension de la paroi ventriculaire (résistance) alliée à une augmentation de la demande métabolique se traduit par une réduction du débit sanguin coronaire dans la région sub-endocardique. De plus, il semble que la réponse vasodilatatrice des vaisseaux sub-endocardiques soit réduite. Ces deux phénomènes peuvent expliquer la susceptibilité du sub-endocarde aux dommages ischémiques. Lorsque l'occlusion coronarienne se prolonge de 6 et 24 heures, les dommages atteignent une distribution transmurale sans récupération possible lors de la reperfusion <sup>19,58</sup>.

De façon générale, une occlusion coronarienne d'une durée supérieure à 3 heures chez le chien provoque des lésions ischémiques qui ne récupéreront que dans une faible proportion lors de la reperfusion <sup>59</sup>. Aussi, outre la durée de l'ischémie, la sévérité de l'ischémie est un facteur important dans les lésions du myocarde. Les bénéfices de la reperfusion ne sont limités qu'aux cellules ayant subi des dommages qui ne sont pas irréversibles. De plus, un tissu présentant un débit collatéral suffisant pourra récupérer lors de la reperfusion par rapport à

un autre ayant un débit collatéral plus faible.

### **1.6 Physiopathologie des lésions de reperfusion**

La reperfusion précoce d'une artère coronaire subitement occluse représente jusqu'à maintenant la méthode la plus efficace de limiter la taille de l'infarctus. Toutefois, il est reconnu que la reperfusion est accompagnée de manifestations post-ischémiques aux conséquences délétères sur les cellules, que l'on nomme lésions de reperfusion <sup>6</sup>. L'accroissement de la taille de l'infarctus au cours de la reperfusion est cependant difficile à mesurer parce qu'il est difficile de distinguer entre la mort cellulaire survenant suite à la reperfusion des dommages subis pendant l'ischémie. Plusieurs études ont clairement identifié les lésions de reperfusion comme un phénomène indépendant de l'ischémie. En effet, une large proportion des cellules exposées à une période ischémique de 90 minutes sont encore viables mais perdent leur viabilité lors des premières heures de reperfusion <sup>7</sup>. Les lésions de reperfusion sont donc associées à des événements nocifs secondaires au rétablissement du flot sanguin et peuvent être atténuées par l'administration de divers agents avant la reperfusion myocardique.

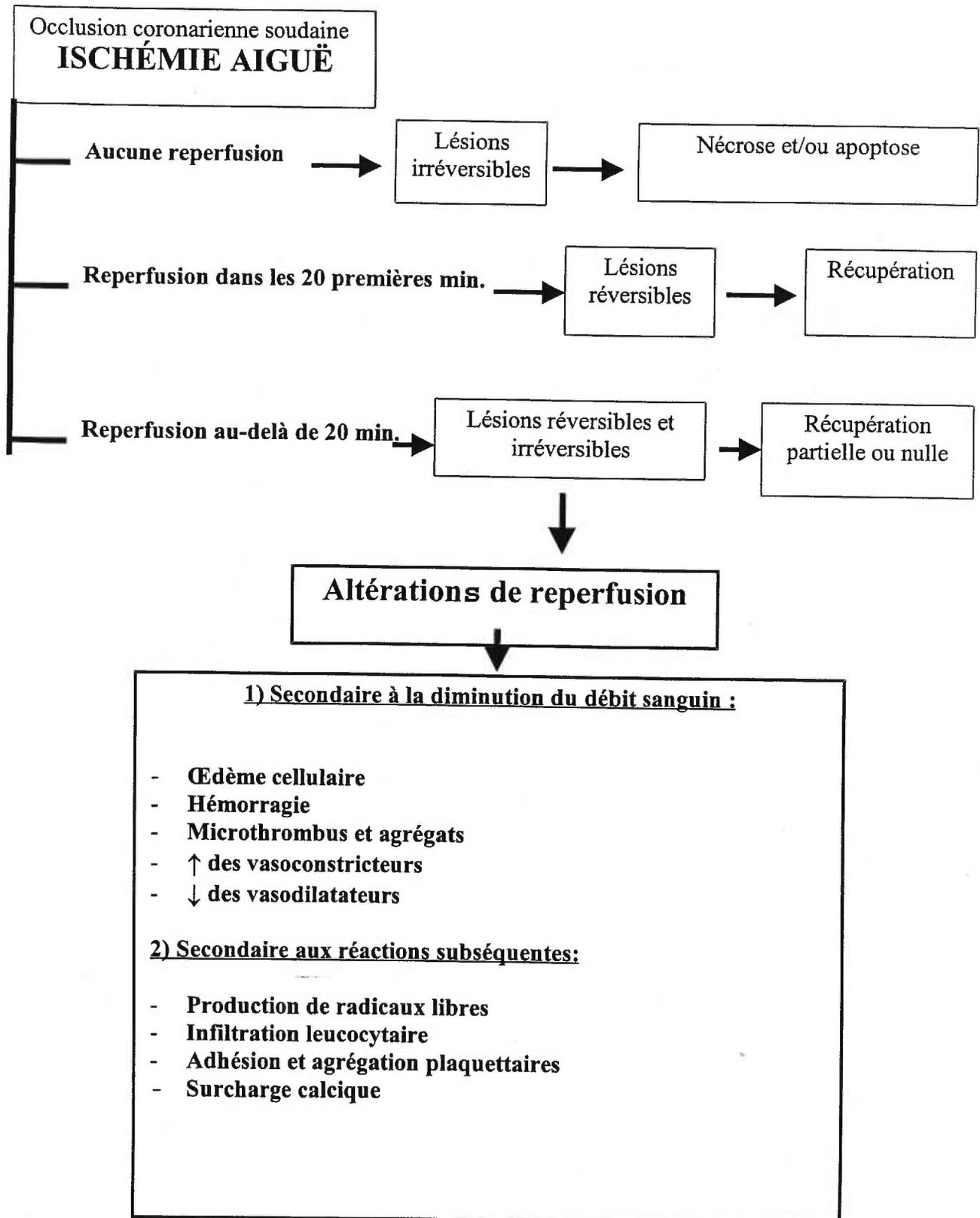
Les mécanismes des lésions de reperfusion sont complexes et restent controversés malgré les nombreux travaux effectués dans ce domaine. Plusieurs événements cliniques ont été observés suite à la reperfusion du myocarde. Ceux-ci comprennent principalement les arythmies cardiaques <sup>77</sup>, la sidération myocardique ou « stunning » <sup>78,79</sup> et les dommages de la microcirculation (le phénomène de non-reperfusion « no-reflow phenomenon » <sup>80</sup>. Tel que décrit

précédemment, la présence de nécrose en bandes de contraction est une des caractéristiques ultrastructurales présente dans le myocarde reperfusé <sup>81</sup>.

Expérimentalement, les dommages de reperfusion sont regroupés en deux catégories (figure 1.3). La première implique la diminution du débit sanguin causé par des dommages au niveau de la microcirculation, la compression des vaisseaux sanguins due à l'hémorragie, l'oedème et l'hypercontraction du muscle cardiaque, l'obstruction de la microcirculation par des microthrombus et des éléments sanguins, la libération d'agents vasoconstricteurs couplée ou non à l'arrêt de la synthèse et de la libération, ou encore à l'inhibition métabolique d'agents vasorelaxants. L'autre regroupe des réactions causant des dommages au tissu vasculaire et myocardique, telles la surcharge calcique, la libération de substances cytotoxiques comme les radicaux libres dérivés de l'oxygène et les enzymes protéolytiques libérés par le tissu compromis et l'accumulation des neutrophiles dans le territoire ischémique reperfusé qui est responsable de l'accélération du processus inflammatoire <sup>82</sup>.

Au cours des prochaines sections, nous traiterons de l'influence des radicaux libres dans la formation des lésions de reperfusion et l'implication des neutrophiles, des plaquettes et de la microcirculation dans ce processus.

Figure 1.3 : Physiopathologie des lésions de reperfusion



### 1.6.1 Implication des radicaux libres dans les lésions de reperfusion

Un radical libre est caractérisé par son nombre impair d'électrons à la surface de son orbitale externe <sup>83</sup>. Cette configuration rend la molécule instable et prête à réagir avec toutes autres molécules stables afin de partager ou de transférer son électron non pairé. Le but de ces réactions est de former un doublet électronique et ainsi abaisser le niveau énergétique de l'atome tout en acquérant une plus grande stabilité. Cette réactivité est vite transmise d'une molécule à l'autre et présente des dangers considérables pour les cellules lorsque les radicaux libres se retrouvent en nombre excessif. Les radicaux libres retrouvés dans le myocarde ischémique proviennent essentiellement de cinq sources : a) le métabolisme des catécholamines, b) les mitochondries, c) les leucocytes accumulés dans le tissu, d) la xanthine oxydase et e) l'oxyde nitrique (*nitric oxide*; NO) <sup>84,85</sup>.

#### a) Le métabolisme des catécholamines

Les nerfs sympathiques présents dans la région ischémique du myocarde libèrent de la norépinéphrine suite aux stimuli ischémiques <sup>86</sup>. L'oxydation de ces catécholamines génère des anions superoxydes capables de produire des altérations cellulaires.

#### b) Les mitochondries

Les mitochondries représentent une source normale de radicaux libres. Environ 2% de l'oxygène servant au transport des électrons dans les mitochondries peut être transformée en anions superoxydes <sup>87</sup>. La production

de ces anions étant faible en conditions normales car le système de défense anti-oxydant présent dans le tissu environnant empêche la propagation des radicaux libres. Par contre, au cours de conditions ischémiques, il se produit une perturbation du système de défense naturelle <sup>88</sup> qui entraîne une plus grande production de radicaux libres causant des dommages cellulaires.

### **c) Les leucocytes accumulés dans le tissu myocardique**

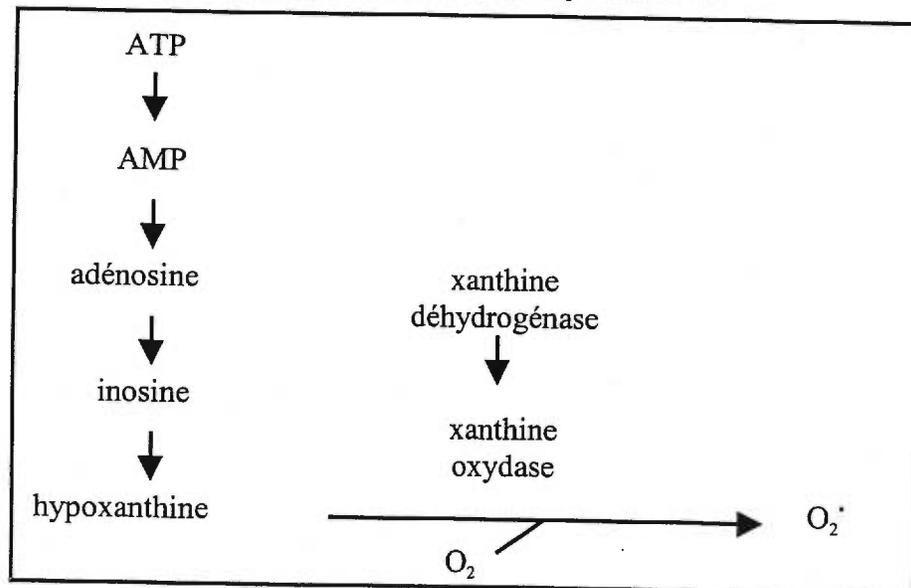
Les neutrophiles contribuent, dans des proportions plus importantes que les catécholamines ou les mitochondries, à la production de radicaux libres. Ils possèdent à la surface de leur membrane une NADPH oxydase capable de produire des anions superoxydes qui servent à la destruction des micro-organismes phagocytés <sup>89</sup>. Ces anions superoxydes amplifient la réponse inflammatoire en activant des agents chimiotactiques présents dans le liquide extracellulaire.

### **d) La xanthine oxydase**

La xanthine oxydase a également été identifiée comme une source potentielle de radicaux libres <sup>90</sup>. L'utilisation de l'adénosine triphosphate (ATP) dans le tissu ischémique entraîne une augmentation de la production d'adénosine monophosphate (AMP) qui est catabolisée en adénosine, en inosine et finalement en hypoxanthine <sup>74</sup> (figure 1.4). Suite à la déplétion d'ATP, le dysfonctionnement des pompes ioniques cause une élévation de la concentration calcique intra-cellulaire. La xanthine déshydrogénase (XD) (EC 1.1.1.204) (voir réaction 2) se convertit en xanthine oxydase (XO) (EC 1.1.3.22)

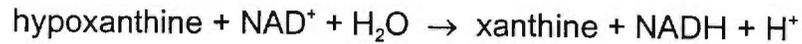
(voir réaction 3) par clivage d'un peptide de 20 kDa via une protéase à dépendance calcique (possiblement l'élastase des PMN <sup>91</sup>) et une oxydation de groupement sulfhydryls, ce qui entraînent la formation de ponts disulfures et une baisse d'affinité pour la  $\text{NAD}^+$  comme accepteur d'électrons <sup>92,93</sup>. De plus, l'augmentation des niveaux d'hypoxanthine et de xanthine d'ue à une forte dégradation des nucléotides d'adénine en période d'ischémie, couplée à la surcharge calcique favorise la conversion de la XD en XO <sup>94</sup>. L'activité de la XD est donc réduite suite à l'ischémie et entraîne une oxydation qui réduit l'oxygène produit et mène à la libération de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

**Figure 1.4 : Formation de l'anion superoxyde par la xanthine oxydase survenant pendant l'ischémie-reperfusion.**

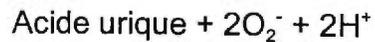
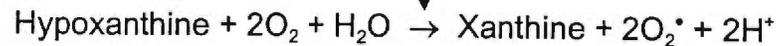


**Réaction 2 : Activité de la xanthine déhydrogénase**

xanthine déhydrogénase

**Réaction 3 : Activité de la xanthine oxydase**

xanthine oxydase



En résumé, le changement d'affinité pour l'accepteur d'électrons ( $\text{NAD}^+$  vers  $\text{l'O}_2$ ) de la XO survient simultanément avec une accumulation de ses substrats (hypoxanthine et xanthine). Le retablisement de la circulation sanguine fournit une importante source d'oxygène qui modifie l'équilibre de la réaction dans le sens d'une production de radicaux libres. La reperfusion provoque un accroissement important de la production de radicaux oxygénés et par conséquent, une destruction massive du tissu. Des travaux ont démontré qu'une période d'occlusion coronarienne de 30 minutes chez le chien, induit une augmentation de 300% de la concentration de xanthine oxydase dans le territoire ischémique <sup>95</sup>. La xanthine oxydase est une source importante de

radicaux libres chez le chien et le chat dans un modèle d'ischémie-reperfusion, justifiant donc l'utilisation d'anti-oxydants ou d'inhibiteurs de la XO comme stratégie thérapeutique <sup>96</sup>. L'administration d'un inhibiteur de l'adénosine dans un modèle de cœur de rat isolé ayant subi une période d'ischémie-reperfusion réduit la production de radicaux superoxydes de 68% et préserve la fonction cardiaque <sup>97</sup>. Une approche thérapeutique intéressante à envisager afin de réduire les lésions myocardiques lors de la reperfusion serait de développer des inhibiteurs puissants de la xanthine oxydase tel que l'allopurinol <sup>98,99</sup>. Cependant, l'implication réelle de la xanthine oxydase dans la production de radicaux libres dans les tissus reperfusés est remise en question, par des études contradictoires mais aussi par l'absence de xanthine oxydase dans le myocarde humain <sup>99-101</sup>.

En plus de la production de superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), la réaction avec la xanthine oxydase amène la formation de peroxyde d'hydrogène par l'intervention de superoxyde dismutase (SOD), un anti-oxydant cellulaire naturel. Le peroxyde d'hydrogène peut ensuite réagir avec le superoxyde ou encore participer à la réaction de Fenton en présence de fer chélateur pour donner un radical  $\bullet OH$  qui est encore plus réactif et contribue aux dommages cellulaires <sup>102</sup> (voir réaction 4). L'hémorragie observée à la reperfusion du myocarde ischémique constitue une source de libération de fer (hémoglobine) dans le tissu par la lyse des globules rouges. La deferoxamine (DFX), un chélateur de fer, atténue la dysfonction myocardique sur le cœur isolé de rat à

la suite d'ischémie-reperfusion <sup>103</sup>. Une autre source de radicaux hydroxyles représente un facteur additionnel dans les dommages de reperfusion attribués à l'induction du stress oxydatif.

**Réaction 4 : Réaction de Fenton**



### e) Le monoxyde d'azote

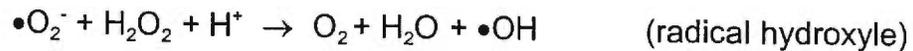
Le monoxyde d'azote (NO) constitue une autre source productrice de radicaux libres. Ce dernier possède un électron non pairé sur son orbital externe le rendant instable. Le NO est normalement peu réactif, cependant en présence d'anions superoxydes, le NO est converti en peroxyde d'azote, un oxydant très réactif <sup>104</sup>. Des travaux démontrent que l'inhibition de la production de NO réduit les lésions de reperfusion en diminuant la production de l'anion peroxyde d'azote et améliore la fonction cardiaque <sup>105</sup>. Cependant, plusieurs travaux indiquent que le NO possède aussi des effets cardioprotecteurs et ce sujet est discuté dans une section ultérieure.

### f) La peroxydation des lipides membranaires.

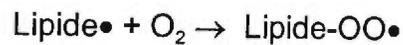
Plusieurs expériences ont démontré que l'ischémie-reperfusion entraîne une production de radicaux libres dans le myocarde <sup>106,107</sup> et peut causer la mort cellulaire dans les modèles d'ischémie-reperfusion par la peroxydation lipidique.

Le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ) est le plus puissant des radicaux libres dérivés de l'oxygène et est responsable de l'inhibition enzymatique et de la dégradation des phospholipides membranaires. Ce radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ) est généré à partir de l'anion superoxyde ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) comme le démontrent les réactions suivantes :

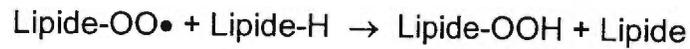




Le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ) peut attaquer les chaînes lipidiques membranaires insaturées et induire la formation de radicaux lipidiques peroxydes selon les équations suivantes :



Ces radicaux peroxydes nouvellement formés provoquent la propagation de la réaction en chaîne en enlevant un atome d'hydrogène à une autre molécule d'acide gras insaturés.



La peroxydation des lipides représente un mécanisme important dans les lésions cellulaires car elle provoque l'altération structurelle des membranes qui entraîne une augmentation de la perméabilité et de la fluidité membranaire et une perte de son intégrité, modifiant ainsi ses échanges biochimiques et ses capacités de défense 108,109.

Les cellules possèdent des mécanismes naturels de défense comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathione peroxydase 110 en plus d'autres anti-oxydants comme la vitamine E, l'acide ascorbique et la cystéine 111. Par contre, ces mécanismes de défense semblent inefficaces dans des conditions ischémiques et lors de la reperfusion. Plusieurs travaux

ont été effectués dans le but de démontrer le rôle de ces différentes enzymes et agents anti-oxydants dans la réduction des dommages myocardiques subis en cours d'ischémie et durant la reperfusion. Par exemple, l'administration d'une superoxyde dismutase recombinée en début de reperfusion réduit d'environ 36% de la taille de l'infarctus chez le chien <sup>112</sup>. L'administration d'un analogue de la vitamine E au moment de l'occlusion chez le rat diminue la taille de l'infarctus de 22.3% par le biais de son action anti-oxydante <sup>113</sup>. Une thérapie avec un nouvel anti-oxydant de type dihydroquinoline (MTDQ-DA) atténue les dommages myocardiques lorsque administrée pendant l'ischémie et la reperfusion chez le chien, en diminuant la déposition de calcium dans les mitochondries, en inhibant la rupture des membranes intramitochondriales et en diminuant la formation des bandes de contraction <sup>114</sup>. Chez le rat, l'administration d'anti-oxydants tels la desferrioxamine, la superoxyde dismutase et la catalase lors de la période ischémique de 45 minutes, réduit de l'œdème cellulaire et préserve l'intégrité de l'endothélium et de la lame limitante élastique interne <sup>62</sup>.

Les radicaux libres produits et libérés dans le tissu ischémique sont des médiateurs cytotoxiques impliqués dans les lésions de reperfusion <sup>106,107</sup>. Ils peuvent être produits par plusieurs cellules, dont les neutrophiles présents dans le tissu ischémique. Voyons les étapes menant à la l'induction des lésions de reperfusion par les neutrophiles.

### 1.6.2 Rôle des neutrophiles dans les lésions de reperfusion

La relation entre l'inflammation et l'infarctus aigu du myocarde a été mise en évidence il y a plus de 50 ans par Mallory et coll <sup>115</sup> par la mise en évidence de cellules polymorphonucléaires (PMNs) 24 heures après une occlusion coronarienne. L'infiltration des neutrophiles dans le territoire ischémique pendant la reperfusion a ensuite été soulignée par Sommers et Jennings en 1964 <sup>116</sup>. Les neutrophiles sont responsables de l'élimination des cellules endommagées suite à une période d'ischémie-reperfusion et semblent contribuer à la destruction des myocytes qui ne sont pas endommagés de façon irréversibles <sup>117,118</sup>. Les modifications tissulaires subséquentes à la nécrose sont, entre autre, consécutives aux propriétés d'adhésion, d'agrégation, de chimiotactisme et de phagocytose des PMNs. Plusieurs médiateurs cytotoxiques tels les radicaux libres dérivés de l'oxygène et l'exocytose d'enzymes protéolytiques, dont les protéases élastase et cathepsine G, les métabolites de l'acide arachidonique et le PAF sont libérés par les PMNs activés et induisent l'augmentation et de l'extension des dommages myocardiques dus à l'ischémie-reperfusion.

Le phénomène de diapédèse des neutrophiles dans le tissu reperfusé a été décrit par plusieurs groupes d'études <sup>119,120</sup>. L'extravasation des neutrophiles comporte des étapes précises incluant le roulement, l'adhésion et la transmigration des neutrophiles à travers la paroi endothéliale. Tous ces événements sont dépendants des molécules d'adhésion retrouvées à la surface

des neutrophiles, des plaquettes et des cellules endothéliales. Les molécules d'adhésion exprimées constitutivement ou suite à l'activation cellulaire se regroupent au sein de 3 grandes familles; les sélectines, les intégrines et les immunoglobulines.

**a) Les sélectines:**

La famille des sélectines se compose de 3 membres : la L-sélectine 121, la E-sélectine 122 et la P-sélectine 123. Elles sont toutes constituée d'un domaine lectine NH<sub>2</sub> terminal, suivi d'un domaine EGF-like (*Epidermal Growth Factor*) et de plusieurs répétitions de régions consensus (*CRp-like, Complement Regulatory proteins*). Les sélectines sont capables de lier le calcium et constituent les principaux médiateurs de l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium et/ou aux plaquettes activées 122-124.

La L-sélectine est exprimée de manière constitutive à la surface des leucocytes. Suite à une stimulation par différentes substances comme les cytokines, le phorbol ester, le fMLP et le C5a, la L-sélectine est clivée, expliquant une diminution de son expression sur la membrane des leucocytes 125,126. La P-sélectine se retrouve à la fois à l'intérieur des granules  $\alpha$  des plaquettes et des corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. La P-sélectine est rapidement exprimée à la surface de celles-ci suite à leur activation par différents agonistes tels la thrombine, la thromboxane A<sub>2</sub>, le facteur activateur des plaquettes (*platelet-activating factor* ; PAF) et les radicaux libres 127. L'expression maximale est atteinte entre 5 et 10 minutes et est suivie d'une

diminution, 30 minutes suivant la stimulation <sup>128</sup>. Deux à quatre heures suivant l'activation cellulaire par le TNF $\alpha$  et l'interleukine-1 (IL-1) on observe une augmentation de l'expression de la P-sélectine sur les cellules endothéliales par la synthèse protéique *de novo* [129; 130; 131]. La E-sélectine est exprimée à la surface des cellules endothéliales suivant une stimulation par les cytokines, les lipopolysaccharides (LPS) ou le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) <sup>132</sup>. L'expression de la E-sélectine exige une synthèse protéique *de novo* qui s'effectue tardivement (4 à 6 heures suivant l'activation cellulaire) et retourne à des niveaux physiologiques après 10 à 12 heures. La E-sélectine est responsable du roulement tardif des neutrophiles <sup>133</sup>.

Les trois sélectines reconnaissent des ligands sialylés et fucosylés, plus particulièrement le sialyl Lewis<sup>x</sup> (Sle<sup>x</sup>, CD15s) <sup>134,135</sup> qui se retrouve en abondance à la surface des neutrophiles, des monocytes et en plus faible quantité sur les lymphocytes <sup>136</sup>. Les sélectines reconnaissent également le ligand glycoprotéique de la P-sélectine (*P-selectin glycoprotein ligand-1*; PSGL-1) exprimé de manière constitutive sur les leucocytes <sup>137,138</sup>. Seule la E-sélectine reconnaît un ligand glycoconjugué retrouvé sur les leucocytes : le ESL-1 (*E-selectin ligand 1*) <sup>139</sup>. Le CD34 (à la surface de l'endothélium) et le GlyCAM-1 (molécule sécrétée), tous glycoconjugués représentent des ligands reconnus par la L-sélectine <sup>140-142</sup>

## b) Les intégrines et les immunoglobulines

Les membres de la famille des intégrines impliqués dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales sont les  $\beta_1$  et  $\beta_2$  intégrines. Elles sont formées de chaînes  $\alpha$  distinctes liées de façon non covalente à une chaîne bêta commune. Les intégrines sont subdivisées en sous-classes selon leur sous-unités  $\beta$ . Il y a les  $\beta_1$ -intégrines aussi connues sous le nom de VLA 120, les  $\beta_2$ -intégrines en association avec trois différentes sous-unités alpha ( $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$  et  $\alpha_X$ ) soit les trois complexes CD11/CD18 exprimé par les leucocytes (220) et finalement les  $\beta_3$ -intégrines ou cytoadhésines parmi les quelles nous ne retrouvons que deux membres soit  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) et  $\alpha_v\beta_3$  toutes deux exprimées par les plaquettes 143.

Les complexes CD11/CD18 sont exprimés seulement à la surface des leucocytes 144 sous trois différentes formes : CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1) et le CD11c/CD18 (p150/95). Elles sont constituées d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique, ce qui leur conférerait une fonction de pont moléculaire entre le milieu extracellulaire et le cytosquelette de la cellule. Les intégrines sont surtout impliquées dans les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire. Elles reconnaissent une variété de ligands divisés en trois classes : les protéines de la matrice extracellulaire, les protéines plasmatiques et les molécules d'adhésion.

Les  $\beta_1$ -intégrines lient la molécule d'adhésion vasculaire (VCAM-1) et le

fragment de la fibronectine, le CS-1 <sup>120</sup>. Les  $\beta$ 2-intégrines reconnaissent majoritairement des protéines faisant partie de la famille des immunoglobulines. Le CD11a/CD18 lie les molécules d'adhésion intercellulaires ICAM-1 (CD54) et ICAM-2 (CD102); CD11b/CD18 reconnaît ICAM-1 et les protéines C3bi, le fibrinogène et le facteur X <sup>120</sup>. Les intégrines GPIIb/IIIa deviennent aptes à lier différents substrats comme le fibrinogène, la fibronectine et le facteur de von Willebrand seulement suite à leur activation <sup>145</sup>.

Les membres de la superfamille des immunoglobulines, impliqués dans l'adhésion leucocytes-endothélium, comprennent ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, MadCAM-1 et la molécule d'adhésion des plaquettes et de l'endothélium (PECAM-1). PECAM-1 est une molécule d'adhésion retrouvée à la surface des cellules endothéliales, des plaquettes et des leucocytes. Elle est exprimée constitutivement par les cellules endothéliales aux jonctions cellulaires et s'est avérée importante dans le processus de diapédèse des PMNs et des monocytes à travers l'endothélium <sup>146,147</sup>. VCAM-1, ICAM-1 et ICAM-2 sont constitutivement exprimées à la surface des cellules endothéliales <sup>148,149</sup>.

#### **1.6.2.1 Recrutement des neutrophiles dans le myocarde reperfusé**

L'endothélium et les plaquettes participent activement au recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation. Après une période d'ischémie et de reperfusion, l'endothélium tapissant les vaisseaux présents dans la région ischémique se retrouve partiellement ou complètement détaché de la matrice sous endothéliale <sup>17</sup>. La matrice sous-endothéliale, où sont présents le facteur

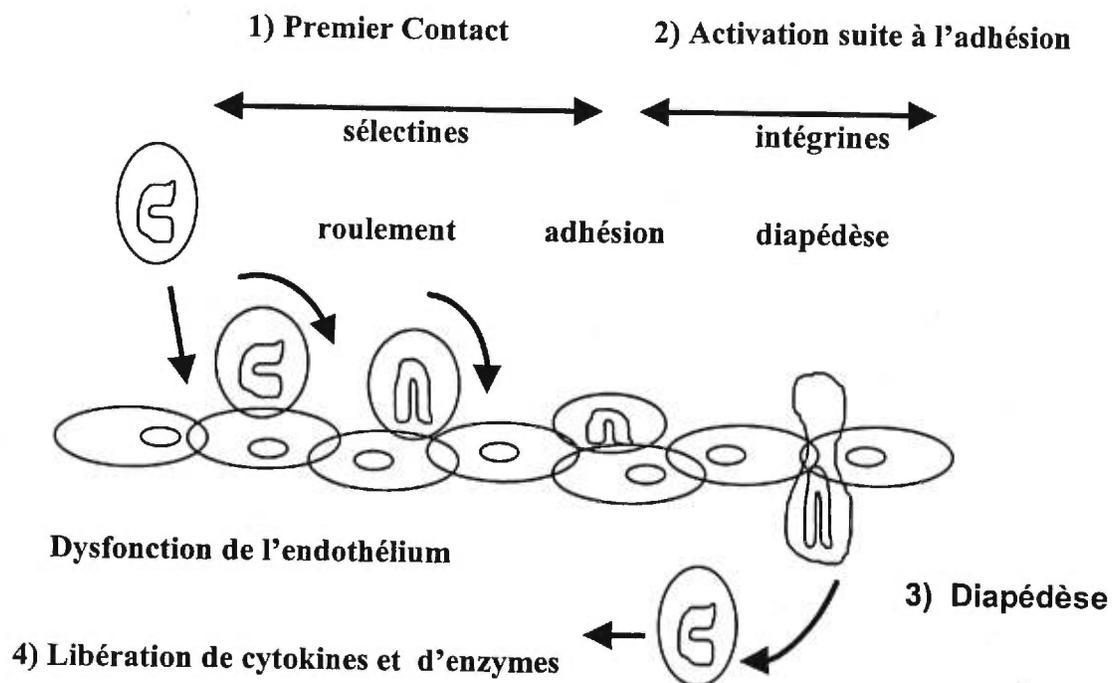
von Willebrand et le collagène, entrent alors en contact avec les plaquettes et initient l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles au site endommagé <sup>150</sup>.

Des observations *in vivo* sur des veinules post-capillaires ont identifié plusieurs phases distinctes se produisant lors de la diapédèse des neutrophiles à travers de l'endothélium (figure 1.5) <sup>119,120</sup>. Différents stimuli inflammatoires, tels les facteurs chimiotactiques du système du complément <sup>151</sup> et les cytokines libérées par les myocytes hypoxiques <sup>152</sup> entraînent l'activation et l'expression de plusieurs molécules d'adhésion à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales. Le contact aléatoire des leucocytes circulants avec l'endothélium favorise les interactions entre les sélectines leucocytaires (L-sélectine) et endothéliales (P- et E-sélectines) avec leurs ligands respectifs (Sle<sup>x</sup>, PSGL-1) ; un phénomène appelé roulement leucocytaire. Par la suite, l'adhésion ferme entre les deux types cellulaires survient, étape médiée par l'interaction des intégrines leucocytaires avec leurs contre-récepteurs endothéliaux, les immunoglobulines. Finalement, la transmigration des leucocytes du compartiment vasculaire vers le site d'inflammation tissulaire est amorcée et est dépendante des intégrines et des immunoglobulines.

La cinétique d'accumulation des neutrophiles à l'intérieur du tissu varie selon le rétablissement ou non de la circulation sanguine <sup>59</sup>. Dans cette étude chez le chien, une augmentation de 80% de l'infiltration neutrophilique a été observée après la reperfusion comparativement aux artères occluses de manière

permanente, et cette infiltration était préférentiellement retrouvée dans la région sub-endocardique (ratio d'accumulation des neutrophiles dans la région nécrosée / la région non-ischémique ; 27 :5). De plus, les neutrophiles pénètrent le tissu post-ischémique majoritairement au cours de la première heure de la reperfusion <sup>153</sup> et l'infiltration se poursuit pendant les 6 premières heures <sup>154</sup>. Dans un modèle chez le rat, l'administration de la cyclosporine-A, un immunosuppresseur spécifique des lymphocytes effectuée pendant la période d'ischémie (20 min.) et de reperfusion (5 hres), semble démontrer une cardioprotection. En effet, une réduction de la nécrose myocardique ainsi qu'une diminution de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) dans la zone à risque et la zone nécrosée, une réduction de la concentration des créatines kinases dans le sérum, une augmentation de la contractilité myocardique, une réduction du taux de TNF-alpha et de l'ARN messenger de la cytokine cardiaque, et une diminution de l'expression d'ICAM dans le myocarde compromis ont été observés dans le groupe traité à la cyclosporine-A <sup>155</sup>.

**Figure 1.5 : Interactions entre les neutrophiles et l'endothélium dans les phénomènes de roulement, d'adhésion et d'agrégation :**



### 1.6.2.2 Les médiateurs cytotoxiques libérés par les neutrophiles

Les neutrophiles activés sont responsables de la libération de médiateurs cytotoxiques provoquant des dommages aux cardiomyocytes et aux cellules endothéliales avoisinantes. La formation et la libération de radicaux libres dérivés de l'oxygène, d'enzymes lysosomiales et de métabolites lipidiques dérivés des neutrophiles sont des phénomènes délétères secondaires à la présence de neutrophiles dans le tissu post-ischémique.

La libération de radicaux libres survient suite à la phagocytose du tissu

infarci par les neutrophiles et requiert de l'énergie, ce qui entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène et conséquemment une production d'anions superoxydes ( $O_2^-$ ) 156. Libérés des granules intracellulaires des neutrophiles activés, deux de ces anions réagissent ensuite ensemble pour former le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) 157 158. Les neutrophiles libèrent également de la myéloperoxydase (MPO), une enzyme contenue dans les granules azurophiles des neutrophiles 159. Cette enzyme catalyse la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les dérivés halogénés (principalement l'ion chlorure) qui résulte en la formation de l'acide hypochlorique, un oxydant très puissant 118. La génération de radicaux libres par les neutrophiles, cause d'importants dommages dont l'acide hypochlorique serait le principal médiateur 118,160.

La dégranulation des neutrophiles lors de leur activation libère dans le milieu tissulaire plusieurs enzymes protéolytiques dont l'élastase et la cathepsine G qui sont deux protéases à sérine 118. L'élastase représente un des principaux médiateurs cytotoxiques des neutrophiles 161 par l'induction de plusieurs mécanismes. Elle convertit la xanthine déshydrogénase des cellules endothéliales en xanthine oxydase 162, elle inhibe la fonction plaquettaire en hydrolysant les récepteurs de la thrombine 163 et provoque la synthèse de la prostacycline ( $PGI_2$ ) 164. L'élastase agit également en accélérant la fibrinolyse par l'activation de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 165. Dans un

modèle *in vivo* d'ischémie-reperfusion myocardique chez le chien, l'inhibition pharmacologique de l'élastase par l'eglin et le L658,758 atténue de 62% l'infiltration des neutrophiles <sup>166</sup>, préserve la fonction endothéliale et réduit la taille de l'infarctus de 68% <sup>167</sup>. La cathepsine G, libérée des granules azurophiles des neutrophiles, médie l'agrégation plaquettaire par le biais des GPIIb/IIIa <sup>168</sup>. L'inhibition de la cathepsine G lors de l'ischémie-reperfusion par le LEX-032 a démontré un effet cardioprotecteur. Cependant nous ne sommes pas en mesure de déterminer le pouvoir ultime de la cathepsine G par l'inhibition de celle-ci via le LEX-032, étant donné qu'il exerce simultanément un effet inhibiteur sur l'élastase <sup>167,169</sup>.

Les principaux métabolites lipidiques dérivés des neutrophiles sont le PAF (*Platelet-activating factor*) <sup>170</sup>, les prostaglandines, la thromboxane A<sub>2</sub> <sup>171</sup> ainsi que les leucotriènes (LT), comme le LTB<sub>4</sub> <sup>172</sup>. Le PAF est un médiateur pro-inflammatoire très puissant synthétisé suite à l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> des neutrophiles <sup>170</sup>. Le PAF stimule l'agrégation des neutrophiles <sup>173</sup> et des plaquettes <sup>174</sup>, induit la dégranulation des neutrophiles, leur adhésion et le chimiotactisme <sup>175</sup>. Les antagonistes des récepteurs du PAF (WEB 2086 ou BN 52021) réduisent de 37% le degré d'adhésion et de 72% la diapédèse des neutrophiles au niveau des veinules mésentériques ayant subi une période d'ischémie-reperfusion <sup>176</sup>.

Les prostaglandines et la thromboxane A<sub>2</sub> sont générées par le

métabolisme de l'acide arachidonique via la voie de la cyclo-oxygénase 171. Les leucotriènes sont produits également par le métabolisme de l'acide arachidonique, la synthèse de ceux-ci est dépendante de la lipoxygénase 172. Le leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) est un facteur chimiotactique très puissant qui favorise l'adhésion et la diapédèse des neutrophiles et augmente la perméabilité membranaire 177. L'administration d'un inhibiteur de la synthèse du LTB<sub>4</sub> prévient l'augmentation de sa teneur tissulaire et diminue l'adhésion des neutrophiles et maintient la barrière microcirculatoire 178.

### **1.6.2.3 Traitements visant à réduire l'effet cytotoxique des neutrophiles**

Les étapes menant à l'infiltration des leucocytes décrites précédemment, sont nécessaires aux dommages du tissu inflammé lors de la reperfusion. Dans le but de réduire les lésions de reperfusion, plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes fonctionnels des sélectines et de leur ligand ont été développés et administrés avant le début de la reperfusion. Par exemple, des travaux utilisant des anticorps dirigés contre la L-sélectine 179 et la E-sélectine 180 ont démontré une réduction respective de 43.8% et 62.1% de la taille de l'infarctus 181. L'administration *in vivo* d'une sélectine synthétique capable d'interagir avec la P-sélectine en milieu *in vitro* a réduit d'environ 55% la taille de l'infarctus chez le rat 182. L'absence du gène de la P-sélectine chez la souris s'est aussi montrée efficace dans l'abolition du recrutement des leucocytes suite à leur activation par le peroxyde d'hydrogène,

la thrombine et en situation d'ischémie-reperfusion 183,184. Le blocage de l'interaction entre le ligand de la P-sélectine retrouvé à la surface des neutrophiles (PSGL-1) et la P-sélectine réduit la taille d'infarctus en situation d'ischémie-reperfusion 185. L'administration d'une métalloprotéinase, la mocoarhagin, dans un modèle d'ischémie (20 min) et de reperfusion (45 min) chez le rat, a réduit l'infiltration de polymorphonucléaires (PMNs) dans le myocarde médié par la liaison du PSGL-1 avec la P-sélectine endothéliale et a préservé les fonctions cardiaques 186. Une forme soluble de PSGL-1 administré avant la reperfusion dans un modèle félin d'ischémie (90 min) et de reperfusion (270 min) réduit significativement la taille de l'infarctus ( $16 \pm 3$  vs  $42 \pm 7$  % : % de la zone à risque), diminue la libération de créatines kinases plasmatique et préserve la relaxation dépendante de l'endothélium des artère coronaire 187.

Des études ont démontré que le blocage des interactions dépendantes des intégrines leucocytaires avec leur contre-récepteur membre de la famille des immunoglobulines réduit les dommages associés à l'ischémie-reperfusion dans différents modèles. Un anticorps dirigé contre la  $\beta_2$  intégrine (CD18) atténue les lésions de reperfusion au niveau du myocarde, du foie, du cerveau et des muscles squelettiques 188. Dans ces modèles, l'interaction de l'anticorps avec le récepteur CD18 diminue conjointement la migration de PMNs dans le tissu reperfusé au site de lésion. Un anticorps dirigé contre MAC-1, administré chez le chien, a réduit de 46% la taille de l'infarctus 189. Des travaux utilisant un

anticorps dirigé contre CD18 dans un modèle félin d'ischémie-reperfusion a démontré la préservation de la réponse endothéliale par des agents vasodilatateurs associée à une réduction de la taille de l'infarctus (30.8% chez les témoins comparativement à 2% chez les traités (% de la zone à risque) <sup>190</sup>. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre PECAM-1 suivant une période d'ischémie-reperfusion chez le chat, a également diminué l'importance des lésions de reperfusion d'environ 59% et entraîné la réduction de la libération des CK jusqu'à 2 heures de reperfusion <sup>191</sup>.

Les neutrophiles contribuent de manière importante aux phénomènes liés aux lésions de reperfusion. De par leur capacité à produire des médiateurs cytotoxiques menant aux lésions irréversibles du tissu myocardique reperfusé, l'infiltration des neutrophiles médiée par plusieurs molécules d'adhésion de la famille des intégrines et des immunoglobulines constitue une étape cruciale dans la progression des lésions de reperfusion. L'inhibition de l'infiltration neutrophilique dans le myocarde reperfusé par des anticorps dirigés contre les molécules d'adhésion responsables de l'infiltration des PMNs peut réduire la taille de l'infarctus. Ces résultats démontrent bien l'importance des neutrophiles dans les lésions de reperfusion.

### **1.6.3 Rôle des plaquettes dans les lésions de reperfusion**

Outre une infiltration leucocytaire, plusieurs études ont démontré une accumulation de plaquettes dans le myocarde reperfusé <sup>192,193</sup> sans toutefois clairement démontrer leur rôle dans l'induction des lésions de reperfusion. Par

exemple, deux modèles d'ischémie-reperfusion thrombocytopeniques, avec et sans sténose critique résiduelle, ont démontré des résultats opposés. Aucune réduction de la taille de l'infarctus n'a été observée dans le modèle sans sténose critique <sup>194,195</sup> contrairement à une réduction de 28.6% en présence d'une sténose critique <sup>196</sup>. Une sténose critique, est un rétrécissement de la lumière d'un vaisseau de plus de 70% de sa surface causé par la présence d'une plaque athéromateuse et se retrouve chez plus de 75% des patients ayant subi une thrombolyse <sup>197</sup>. Elle est associée à l'activation plaquettaire <sup>198</sup> et plusieurs études démontrent que la sténose critique augmente la taille de l'infarctus après une période de reperfusion de 24 heures <sup>199-201</sup>. Dans des conditions expérimentales, la reperfusion du myocarde en présence d'une sténose critique entraîne une augmentation de la taille de l'infarctus d'environ 40% comparativement à un modèle reperfusé en absence de sténose critique (infarctus/zone à risque (%)) <sup>196</sup>.

La reperfusion favorise la séquestration des plaquettes dans les régions ischémiques du myocarde <sup>202</sup>. Suite à une période ischémique de 6 heures, la reperfusion provoque une augmentation de 695% de l'accumulation des plaquettes comparativement à 214% pour le groupe témoin non reperfusé <sup>203</sup>.

L'activation plaquettaire peut être induite par l'augmentation des forces de cisaillement, au site de la sténose, ainsi que la libération massive d'agents vasoactifs au site d'inflammation <sup>204,205</sup>. L'activation plaquettaire se traduit en l'expression de plusieurs molécules d'adhésion telle la P-sélectine et entraîne un

changement de conformation des récepteurs membranaires GPIIb/IIIa, récepteurs liant le fibrinogène 206. La liaison entre la GPIIb/IIIa et le fibrinogène est responsable de la formation d'agrégats plaquettaires qui participent de manière significative au phénomène de réocclusion coronarienne 207 . Plusieurs études ont démontré les bienfaits de l'utilisation des inhibiteurs de la glycoprotéine GPIIb/IIIa en combinaison avec une thérapie fibrinolytique. En résumé, ces études démontrent que les doses utilisées lors d'une thérapie fibrinolytique peuvent être substantiellement réduites de 50%, par l'administration conjointe d'inhibiteur des GPIIb/IIIa 208,209.

L'activation plaquettaire induit également la génération de radicaux oxygène 210,211 en plus d'une libération de médiateurs proinflammatoires tels que la thromboxane A<sub>2</sub>, la sérotonine, le facteur 4 des plaquettes (*platelet factor 4* ; PF4) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor*, PDGF) 212,213. Tous ces facteurs contribuent à l'amplification de la réponse inflammatoire et par conséquent à la majoration des dommages myocardiques. Le PAF a été identifié comme agent responsable de la réduction du débit collatéral causé par une vasoconstriction dépendante de la thromboxane A<sub>2</sub> 214.

Les plaquettes modulent l'adhésion des neutrophiles à la matrice sous-endothéliale via la P-sélectine. L'induction d'une thrombocytopénie chez le porc présentant des dommages vasculaires, réduit de façon significative le nombre de neutrophiles adhérents à la paroi artérielle 215. Cependant, les

neutrophiles sont capables d'adhérer aux parois vasculaires endommagées ou dysfonctionnelles indépendamment des plaquettes, ce qui explique leur adhésion à l'endothélium dans des conditions thrombocytopéniques. Plusieurs études ont identifié des interactions entre les plaquettes et les neutrophiles dans la modulation de leur recrutement existant. De récents travaux indiquent que les plaquettes et les neutrophiles agissent en synergie dans l'induction de la dysfonction cardiaque secondaire à la reperfusion myocardique, suggérant un rôle important de la P-sélectine 216. Ainsi, les neutrophiles accentuent l'agrégation et l'activation des plaquettes qui favorisent à leur tour l'accumulation et la migration transendothéliale des neutrophiles 217. L'accumulation des plaquettes dans le myocarde reperfusé serait dépendante du recrutement préalable des neutrophiles. Une étude démontre qu'une neutropénie entraîne une diminution de la séquestration des plaquettes dans toutes les régions du cœur 193. L'énoxaparine, une héparine de bas poids moléculaire, capable d'inhiber la liaison des plaquettes avec les neutrophiles, a démontré dans un modèle d'ischémie-reperfusion une réduction de la taille de l'infarctus d'environ 50% associée à une diminution des lésions de reperfusion 218. Cette même étude démontre une réduction de l'infiltration des neutrophiles de plus de 80% à l'intérieur du myocarde de chien après reperfusion comparativement au groupe témoin.

Les plaquettes semblent donc intervenir dans les phénomènes responsables des lésions de reperfusion. La présence d'une sténose critique

serait favorable à leur activation et à leur implication dans l'établissement de l'infarctus. L'activation plaquettaire induit la formation d'agrégats participant à la réocclusion coronarienne observée suite à la reperfusion. Les plaquettes sont également responsables de la libération de radicaux libres, de médiateurs proinflammatoires et modulent en partie l'infiltration leucocytaire dans le myocarde reperfusé. L'inhibition du recrutement plaquettaire pourrait être bénéfique dans la prévention des lésions de reperfusion.

#### **1.6.4 Le rôle de la microcirculation**

L'endothélium normal contribue à la régulation local du tonus vasculaire et au maintien d'une surface non thrombogénique. L'endothélium agit comme une barrière sélective contrôlant la perméabilité membranaire (transport des solutés et macromolécules), et aide au métabolisme de plusieurs facteurs circulants ou générés localement, il régularise la prolifération des cellules musculaires lisses et module l'adhésion et la diapédèse des neutrophiles, monocytes et lymphocytes. Ces propriétés sont basées sur l'habileté des cellules endothéliales à capter les stimuli humoraux et hémodynamiques et sont dépendantes de trois mécanismes fondamentaux : 1) la sécrétion de facteurs dérivés de l'endothélium, 2) l'expression de molécule d'adhésion à leur surface, de protéines de liaisons et d'enzymes et 3) leur changement de forme. L'endothélium libère plusieurs facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Le principal agent relaxant libéré de l'endothélium a été identifié par Furchgott and Zawadzki<sup>219</sup>, il s'agit de l'oxide nitrique (NO), un puissant médiateur de la relaxation dépendante de

l'endothélium. Plusieurs médiateurs peuvent produire la libération du NO par leur récepteur endothélial spécifique. Les substances endogènes comme les catécholamines, la vasopressine et les autacoïdes générés dans la paroi vasculaire comme la bradykinine et l'histamine, ou des médiateurs libérés par les plaquettes tels la sérotonine, l'adénosine diphosphate (ADP) ou produits pendant la coagulation comme la thrombine <sup>220-222</sup>. La prostacycline, qui est un produit majeur de la cyclooxygénase vasculaire, est formée principalement au niveau des cellules endothéliales mais aussi dans la média et l'adventice en réponse aux forces de cisaillement, à l'hypoxie et à plusieurs médiateurs qui entraînent la libération du NO. La prostacycline entraîne la relaxation du muscle lisse vasculaire en activant l'adénylate cyclase et en augmentant la production de 3'-5'adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique). Dans la plupart des vaisseaux, la contribution de la prostacycline à la relaxation est dépendante de l'endothélium est négligeable, et ses effets sont essentiellement additifs à ceux du NO. Cependant, les deux substances agissent en synergie pour inhiber l'aggrégation plaquettaire <sup>223</sup>.

Le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire entraîne l'activation de plusieurs facteurs médiant les phénomènes inhérents à une période d'ischémie-reperfusion. Les fonctions vasomotrices sont réduites et se traduisent en une diminution du pouvoir vasorelaxant et une augmentation de la réponse vasoconstrictrice. L'endothélium devient favorable à la formation de thrombose vasculaire. L'expression de plusieurs molécules d'adhésion comme les

sélectines et les intégrines suite à l'activation cellulaire favorise l'adhésion des neutrophiles et des plaquettes, ceci médiant l'infiltration de ces cellules dans le tissu myocardique et la destruction associée à leur recrutement dans la zone ischémique. La rupture des jonctions serrées (Gap junctions) entre les cellules endothéliales provoque également une augmentation de l'infiltration cellulaire dans le tissu myocardique menant à une destruction massive du myocarde.

Le phénomène de non reperfusion (*no-reflow*) est une des conséquences du dysfonctionnement endothélial qui s'établit graduellement. Il est caractérisé par une perfusion myocardique inadéquate se produisant suivant le rétablissement de la circulation sanguine. Certains mécanismes ont été proposés afin d'expliquer ce phénomène. L'inhibition de la synthèse de d'oxyde nitrique (NO) par l'endothélium, un puissant vasodilatateur et la formation d'agrégats de neutrophiles et de plaquettes menant à une occlusion des micro-vaisseaux sont les plus fréquemment mentionnés. Ces mécanismes atténuent les bienfaits de la reperfusion en provoquant une diminution du débit sanguin dans le tissu revascularisé.

Une diminution dans la libération du monoxyde d'azote (NO), un facteur relaxant de l'endothélium (*endothelium-derived relaxing factor* ; EDRF) a été démontré au sein du myocarde suite à la reperfusion <sup>224,225</sup>. Cette baisse de production en EDRF suite à l'atteinte cellulaire est considérable puisque cet agent est non seulement un puissant vasodilatateur coronaire, mais aussi un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et de l'expression de la P-sélectine <sup>226</sup>, de l'adhésion

des neutrophiles et des plaquettes à l'endothélium <sup>227</sup> ainsi qu'un inhibiteur de la production d'anions superoxydes <sup>228</sup>. Plusieurs études ont démontré une cardioprotection associée à l'administration de précurseur du NO. Une d'entre elle démontre une réduction des dommages myocardiques associés avec une diminution des lésions de reperfusion <sup>229</sup>.

Une hypothèse qui a reçu beaucoup d'attention est la formation de bouchons leucocytaires identifiée dans la zone de non reperfusion <sup>230</sup>. Des agents pharmacologiques modifiant l'activité des neutrophiles a démontré une atténuation de l'ampleur de la non reperfusion <sup>231,232</sup>. La déplétion leucocytaire en situation d'ischémie-reperfusion a démontré une efficacité de reperfusion de plus de 95% des capillaires du territoire ischémique, suggérant une implication des neutrophiles dans les phénomènes de non-reperfusion <sup>233</sup>.

Dans une étude effectuée par De Lorgeril <sup>234</sup>, les dommages leucocytes-dépendants ne semblent pas être médiés par la variation du débit coronaire lors de la période ischémique (2 hres) et de la période de reperfusion (6 hres) lors d'une leucopénie.

## **1.7 Conclusion**

En terminant, les lésions de reperfusion sont dûes à des interactions entre plusieurs composantes tels les neutrophiles, les plaquettes et l'endothélium vasculaire. Les plaquettes représentent une source importante de médiateurs qui modulent l'activité des neutrophiles et, inversement, certains facteurs libérés par les neutrophiles influencent la fonction plaquettaire <sup>235</sup>. L'endothélium est

également une source de médiateurs intervenant dans la vasoconstriction et la vasodilatation, qui jouent un rôle dans l'activation des neutrophiles et des plaquettes et l'efficacité de la reperfusion. La fonction et l'intégrité du myocarde suite à une période d'ischémie-reperfusion sont dépendantes des interactions entre ces trois constituants. Ainsi, l'administration d'agents capables d'intervenir sur la fonction des neutrophiles et des plaquettes au moment de la reperfusion peut réduire les conséquences délétères de celle-ci. Au cours du prochain chapitre, la protection myocardique en cours de reperfusion via des agents anticoagulants et anti-plaquettaires sera exposée.

## Chapitre 2

### Protection myocardique en cours d'ischémie-reperfusion par des agents antithrombotiques.

#### 2.1 Introduction

Il est bien établi que le rétablissement précoce de la circulation sanguine suite à une occlusion coronaire réduit l'étendue de la nécrose et augmente le taux de survie suite à un infarctus aigu <sup>5</sup>. La stratégie pharmacologique, par l'administration d'agents thrombolytiques, ou encore l'intervention mécanique, par l'angioplastie, sont les deux principales approches utilisées afin de rétablir la circulation sanguine à l'intérieur du myocarde reperfusé. Il est important dans ces conditions de prévenir la réocclusion du vaisseau concerné, car cet événement constitue la principale complication observée suite à la thrombolyse et à l'angioplastie <sup>236,237</sup>. À cette fin, divers agents antithrombotiques, antiplaquettaires et anticoagulants sont utilisés <sup>238-240</sup>. Si plusieurs études ont documenté les effets bénéfiques relatifs de ces derniers dans de telles conditions, nous ignorons si ces derniers exercent un effet bénéfique pour prévenir les lésions de reperfusion.

Dans ce chapitre, nous allons revoir les données expérimentales portant sur le rôle potentiel de la formation de microthromboses dans la vasculature reperfusée en fonction de la défaillance microcirculatoire et de la progression de la nécrose dans les premières heures suivant la reperfusion. Les effets cardioprotecteurs de certains antithrombotiques tels les héparines et les

antiplaquettaires seront par la suite documentés.

## **2.2 La réocclusion coronarienne**

La formation de plaques athérosclérotiques à l'intérieur de la surface des vaisseaux coronaires provoque l'occlusion <sup>241</sup>. L'athérosclérose est un phénomène multifactoriel qui se caractérise par la prolifération du muscle lisse vasculaire vers l'intima des artères atteintes. La forme avancée des lésions athérosclérotiques est basée sur trois processus biochimiques fondamentaux. Premièrement, la prolifération intimale des cellules musculaires lisses associée à une accumulation du nombre de macrophages et le lymphocytes T, deuxièmement, la prolifération de certaines composantes du tissu conjonctif tels le collagène, les fibres élastiques ainsi que les protéoglycans et troisièmement, l'accumulation de lipides, principalement sous forme d'esters de cholestérol et de cholestérol libre dans les cellules et le tissu conjonctif. À l'origine, la thrombose a été identifiée comme un des phénomènes importants dans l'initiation et la progression des lésions athérosclérotiques. Il est maintenant établi que la thrombose joue plusieurs rôles. Une des implications cliniques importantes est la formation de thrombus aux sites de lésions athérosclérotiques existants qui conduit rapidement à une diminution de la lumière du vaisseau associée à une augmentation de la lésion. Une des complications majeures de l'athérosclérose est la rupture des plaques sévères. Les plaques ainsi formées agissent comme surfaces auxquelles adhèrent les plaquettes favorisant l'occlusion coronarienne par la formation de thrombus. Ce phénomène est associé à l'angine instable

ainsi qu'à l'infarctus du myocarde.

Comme nous l'avons vu précédemment, la reperfusion dans les plus brefs délais du tissu myocardique ischémique limite la taille de l'infarctus. Plusieurs études cliniques dans le domaine de la pharmacologie de la reperfusion ont initialement concentré leurs efforts dans l'utilisation d'agents thrombolytiques intraveineux et intracoronaires 242,243. Depuis ce temps, la thérapie thrombolytique intraveineuse administrée dans de brefs délais a démontré une réduction des dommages myocardiques, une augmentation de la fonction ventriculaire et a réduit le taux de mortalité chez les patients atteints d'un infarctus aigu du myocarde 244,245. Les agents thrombolytiques les plus utilisés sont la streptokinase, l'urokinase et l'activateur du plasminogène tissulaire (recombinant tissue-type plasminogen activator ; rt-PA). La streptokinase et l'urokinase agissent en activant la fibrinolyse dans la circulation systémique et induisent conséquemment une lyse qui prédispose au saignement de manière généralisée 246. Le rt-PA est un composant du système fibrinolytique endogène de l'humain différent de la streptokinase et de l'urokinase. Il constitue une protéase sérine formant un complexe stable avec le plasminogène et la fibrine 247. Le rt-PA entraîne une génération rapide de plasmine localisée au site d'occlusion qui mène à la protéolyse de la fibrine et éventuellement à la lyse du thrombus obstruant l'artère coronaire 248.

Il y a aucun doute sur l'efficacité de l'administration précoce de ces agents dans le but de dissoudre le ou les caillots responsable (s) de l'ischémie. Par

contre, la sauvegarde du myocarde peut être compromise par certaines complications comme la réocclusion coronarienne ou par une sténose coronarienne résiduelle sévère qui peut limiter le débit coronaire, empêcher le rétablissement de la fonction myocardique et augmenter le risque de réocclusion<sup>249</sup>. Cependant, les mécanismes responsables de la réocclusion lors de la thérapie thrombolytique n'ont pas clairement été identifiés. Par contre, une étude *in vitro* a observé une activation plaquettaire via une expression de la P-sélectine par le rt-PA et l'urokinase<sup>250</sup>. Ceci suggère donc que la thérapie thrombolytique pourrait favoriser la réocclusion observée suite à l'administration de ces agents thrombolytiques.

### **2.3 Les microthrombus et les lésions de reperfusion**

La réocclusion d'une artère recanalisée et la formation de microthrombus dans le myocarde reperfusé sont des phénomènes distincts présents lors de la période de reperfusion. La reperfusion, comme nous l'avons décrit précédemment, induit des lésions subséquentes au retour sanguin et à la réoxygénation du tissu ischémique. Le phénomène de non reperfusion (no-reflow) a été décrit comme l'un des phénomènes importants dans les lésions de reperfusion<sup>82</sup>. Il est le résultat final d'une série de réactions complexes menant à une défaillance de la microcirculation. La formation de microthrombus et d'agrégats plaquettaires a été décrite en association avec les lésions vasculaires au cours de la reperfusion et peut être responsable de micro-zones de non reperfusion diffuses à l'intérieur du myocarde reperfusé<sup>251</sup>. La formation de

thrombus survient principalement aux sites vasculaires endommagés riches en lipides ou à l'intérieur des tissus nécrosés avec présence de cellules inflammatoires <sup>252,253</sup>. Des variations du débit sanguin à l'intérieur de ces régions favorisent l'interaction de plusieurs types cellulaires. En résumé, les mécanismes qui sont probablement responsables du phénomène de non reperfusion sont les dommages et la compression de la microcirculation, l'obstruction des microvaisseaux par les microthrombus, les leucocytes et les erythrocytes, la vasoconstriction et la diminution d'agents vasorelaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) <sup>82</sup>. Plusieurs études effectuées dans le domaine de l'ischémie-reperfusion ont pour but de préserver l'intégrité et les fonctions de l'endothélium afin de prévenir les phénomènes de non reperfusion ainsi que les dommages de reperfusion.

Dans les modèles d'animaux reperfusés suivant une période d'occlusion temporaire, les microthrombus n'ont pas été identifiés comme des composantes responsables des lésions du myocarde reperfusé. Chez ces animaux, ni la streptokinase <sup>218</sup>, ni la thrombocytopenie <sup>194,195</sup> ont démontré d'influence sur la diminution de la taille de l'infarctus. Toutefois, ces résultats contredisent d'autres études démontrant une réduction de la taille de l'infarctus en présence de conditions hypercholestérolémiques <sup>254</sup> ou dans des modèles avec sténose critique résiduelle <sup>255</sup> maintenue pendant la période de reperfusion. Ces modèles reproduisent bien la situation de thrombolyse intracoronarienne chez les patients souffrant d'infarctus du myocarde. La présence d'une sténose critique

résiduelle induit une accumulation accrue des plaquettes dans le myocarde reperfusé ainsi qu'une augmentation de la taille de l'infarctus comparativement à une reperfusion sans sténose critique résiduelle <sup>196</sup>. En présence d'une sténose critique résiduelle, plusieurs travaux ont démontré une réduction de la taille de l'infarctus par l'induction de thrombocytopénie. Une taille de l'infarctus semblable a été observée en absence de sténose critique résiduelle. L'ischémie résultante de la formation de microthrombus peut jouer un rôle actif dans les lésions de reperfusion dans ces conditions et des mesures thérapeutiques dans le but de prévenir la formation d'agrégats plaquettaires et de microthrombus se doivent d'être développées.

Plusieurs travaux expérimentaux et cliniques suggèrent que la thérapie antiplaquettaire, soit par les inhibiteurs de la glycoprotéine IIb/IIIa (gpIIb/IIIa) et les agents anti-thrombines comme les héparines de bas poids moléculaire (HBPM), peuvent être plus efficace à empêcher la réocclusion coronarienne comparativement à la thrombolyse qui échoue dans 15 à 40% des cas <sup>256</sup>.

#### **2.4 Les héparines dans les lésions de reperfusion**

Les agents anticoagulants tels l'héparine et les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) sont très efficaces pendant la phase aiguë d'un infarctus du myocarde où ils sont administrés de façon conjointe avec un traitement thrombolytique afin de prévenir la réocclusion de l'artère reperfusée <sup>257</sup>. D'autres propriétés cardioprotectrices ont aussi été attribuées à l'héparine et l'énoxaparine, une HBPM, dans le contexte d'ischémie-reperfusion <sup>218,258,259</sup>.

L'héparine et les HBPM sont des glycosaminoglycanes composés d'un mélange de chaînes polysaccharidiques hétérogènes où alternent les résidus de D-glucosamine et d'acide uronique, soit l'acide gluconique ou iduronique (figure 2.1) <sup>260</sup>. Le poids moléculaire moyen de l'héparine non fractionnée se situe entre 12 et 15 kD tandis que l'HBPM est formé de chaînes de glycosaminoglycans variant de 4 à 6 kD. L'HPBM est produite à partir de différentes techniques de dépolymérisation de l'héparine via des procédés chimiques ou enzymatiques <sup>261</sup>. En raison des différences de fabrication, chaque HBPM possède des propriétés pharmacologiques et biochimiques distinctes. Commercialement, il existe plusieurs types d'HBPM dont la reviparine, la dalteparine, la certoparine, la parnaparine, la tinzaparine, la nadroparine et l'énoxaparine. Plusieurs études ont été consacrées au développement de nouvelles stratégies antithrombotiques dans le but de contourner les conséquences néfastes consécutives à l'administration de l'héparine non fractionnée. Les principaux désavantages de l'héparine sont son action de courte durée, sa faible biodisponibilité, sa réponse anticoagulante imprévisible, son risque d'induction d'une thrombocytopenie et de réactivation de la maladie suivant sa cessation. Les HBPM utilisées en situation d'angine instable, comparativement à l'héparine non fractionnée, apportent de nombreux avantages (tableau 2.1).

**Figure 2.1 : Structure chimique de l'énoxaparine :**

**n = 3-20**  
**G = Glucosamine**  
**U = Acide Uronique**

**Tableau 2.1 : Avantages d'utilisation des HBPM comparativement à l'héparine lors d'angine instable**

- 
- Une biodisponibilité presque complète lorsque administrée par voie sous-cutanée (> 90%)
  - Durée d'action anticoagulante plus prolongée résultant d'une administration sous-cutanée une ou deux fois par jour
  - Une liaison protéique plus faible : améliorant les prédictions de réponse anticoagulante dans leur pharmacocinétique
  - Réduction de l'induction d'une thrombocytopénie par l'héparine
  - Réduction du risque d'ostéoporose
  - Interaction moindre avec les plaquettes réduisant le risque d'hémorragie
  - La mesure d'un aPTT n'est pas obligatoire ; avantageux pour les urgences cardiovasculaires et les premiers soins
  - Convient aux traitements à domicile
  - Coûts réduits comparativement à l'héparine
- 

Tableau modifié à partir de H. Purcell and K.M. Fox : Current roles and future possibilities for low-molecular-weight heparins in unstable angina : European Heart Journal : 1998 :19 suppl K : K18-K23.

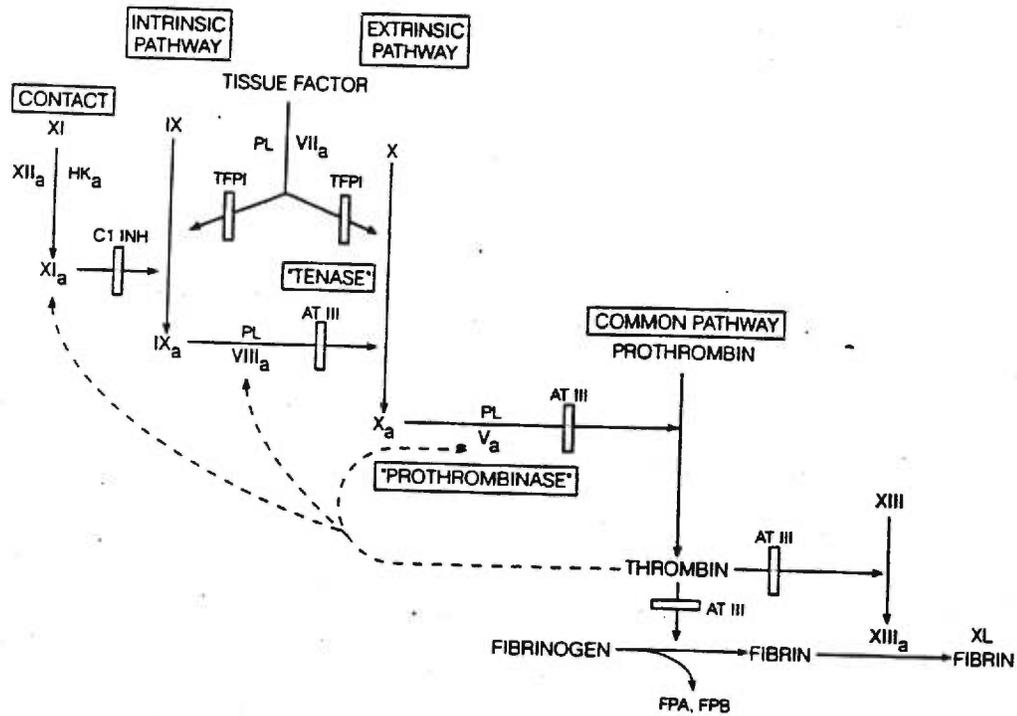
L'administration d'agents anticoagulants lors d'un infarctus du myocarde est fondée sur trois observations : (1) Ils préviennent et diminuent la progression de thrombus dans le réseau artériel (2) Ils empêchent la formation d'embolies systémiques (3) Ils réduisent les incidences de thromboses veineuses et d'embolies pulmonaires. Aujourd'hui, les anticoagulants sont reconnus comme des agents cardioprotecteurs en retardant la mortalité et la réocclusion chez les patients hospitalisés suite à un infarctus aigu du myocarde 262. Ces propriétés sont reliées à leurs effets anticoagulants, cependant plusieurs évidences semblent démontrer qu'elles seraient également dépendantes d'autres effets. Nous allons décrire dans les prochaines lignes les

actions liées et indépendantes de l'effet anticoagulant des héparines.

#### **2.4.1 Activités anticoagulantes des héparines**

Le système de la coagulation a comme principale fonction le maintien de l'hémostase. Cet équilibre assure une quantité de fibrine soluble suffisante dans le but de colmater une brèche vasculaire par la formation d'un caillot tout en évitant la formation inappropriée de thrombus. La formation finale d'un caillot résulte de plusieurs réactions en chaîne impliquant une série de facteurs et de co-facteurs qui agissent directement ou indirectement dans le but de réguler le niveau de thrombine, facteur qui transforme le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Deux différentes voies d'activation mènent à la production de fibrine ; la voie intrinsèque qui est initiée par le contact du sang avec le sous-endothélium ou l'endothélium modifié et la voie extrinsèque qui est initialisée par le contact du sang avec des facteurs tissulaires (facteur III, thromboplastine et thrombokine) sur la surface des cellules. Indépendamment du stimulus initial, le résultat commun est la production du facteur X activé (facteur Xa). En combinaison avec le facteur Va, le facteur Xa promet la conversion de la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa) (figure 2.2).

Figure 2.2 : Cascade de coagulation



TF : facteur tissulaire

PL : phospholipides plaquettaires

Hka : Kininogène de haut poids moléculaire

FPA : fibrinopeptide

XL : liens covalents entre différentes molécules de fibrine

C1 INH : inhibiteur de C1

TFPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire

Tiré de Colman et coll. (1994) *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. Philadelphia : J.B. Lippincott Company, 1994; 3-18.

Les agents anticoagulants agissent à plusieurs étapes dans la voie de la coagulation afin d'exercer leur pouvoir anticoagulant. L'héparine est en elle-même dépourvue d'activité anticoagulante, celle-ci agit principalement en synergie avec l'antithrombine III (AT III) dans le but d'inhiber plusieurs facteurs impliqués dans la coagulation <sup>263,264</sup>. La liaison de l'héparine avec l'ATIII produit un changement de conformation de l'ATIII qui optimise rapidement les propriétés inhibitrices d'un grand nombre de facteurs de la coagulation incluant la thrombine et les facteurs Xa, XIIa, XIa et IXa <sup>265</sup>. Les molécules d'héparine qui contiennent moins de 18 résidus de saccharide (PM < 5400) ne peuvent lier simultanément la thrombine et l'ATIII et ne peuvent donc catalyser l'inactivation de la thrombine. Cependant, les petits fragments d'héparine qui possèdent la séquence pentasaccharidique de haute affinité peuvent catalyser l'inactivation du FXa par l'ATIII <sup>266</sup>. L'activité anticoagulante de l'héparine est également attribuée à un second cofacteur plasmatique appelé cofacteur II de l'héparine (CIIH). L'activité anticoagulante du CIIH est spécifique à la thrombine et ne requiert aucune liaison avec l'ATIII <sup>267</sup>. Tout comme l'activité de l'ATIII, l'activation du CIIH nécessite une chaîne d'héparine possédant un minimum de 24 unités de monosaccharides <sup>268</sup>.

L'activité anticoagulante des HBPM est liée à l'inactivation du facteur X (facteur Xa) <sup>269,270</sup> et ne possède que peu d'activité antithrombine autre que celle associée à son action sur l'antithrombine III. Certaines études mentionnent que l'utilisation des HBPM est plus avantageuse comparativement à l'héparine

car ses conséquences hémorragiques sont moindre. Des résultats provenant d'expérimentations animales comparant les deux types d'héparines à des doses antithrombotiques équivalentes, suggèrent que l'hémorragie est moins fréquente avec l'HBPM comparativement à l'héparine <sup>271-273</sup>. Une autre étude effectuée chez des patients traités pour des thromboses veineuses, ne démontre aucune différence significative d'incidence hémorragique mineure entre les deux traitements, cependant une réduction significative du risque de saignements majeurs chez les patients traités avec les HBPM a été observée <sup>274</sup>.

#### **2.4.2 Autres propriétés des héparines et protection myocardique**

En plus de son activité anticoagulante, l'héparine possède d'autres propriétés qui lui confèrent un rôle dans la prévention du phénomène de réocclusion coronarienne et aident à la réduction des dommages myocardique suite à une période d'ischémie-reperfusion. À des doses supra thérapeutiques, l'héparine (60 000 unités) a démontré une réduction de 32% de la nécrose démontrée histologiquement ainsi qu'une réduction de la libération des créatines kinases de 39 à 24% pour des niveaux comparables d'élévation de segment S-T dans un modèle canin d'occlusion coronarienne <sup>258</sup>. Bien que le mécanisme d'action précis n'a pu être établi, la cardioprotection de l'héparine ne semble pas être dépendante de son activité anticoagulante.

Plusieurs interactions ont été observées suite à l'administration de l'héparine avant le début de la reperfusion suite à une occlusion coronarienne. La sauvegarde myocardique conférée par l'héparine a, entre autre, été attribuée à

sa liaison et son influence sur l'activité de nombreuses protéines comme le collagène, la fibronectine, la thrombospondine, l'antithrombine III <sup>275,276</sup>. Ces liaisons peuvent limiter la formation d'agrégats plaquettaires observée suite à une période d'ischémie-reperfusion et ainsi contribuer à la réduction des dommages myocardiques. L'héparine est également capable de lier l'élastase <sup>277</sup> ainsi que des composantes du complément <sup>278</sup> réduisant par conséquent leurs actions délétères sur les cellules du myocarde reperfusé. Dans des modèles d'ischémie-reperfusion myocardique *in vitro* (lapin) et *in vivo* (chien), l'héparine et le N-acétyl héparine (une molécule semblable à l'héparine dépourvue d'activité anticoagulante) ont démontré une cardioprotection liée à leur pouvoir inhibiteur de l'activation du complément suite aux conséquences ischémiques <sup>259,279</sup>. Le complément activé agit comme substance chimiotactique des neutrophiles dans la région du myocarde compromis <sup>151</sup> et possède une action catalytique par la formation d'un complexe capable d'attaquer les membranes cellulaires <sup>280</sup>. La modulation pharmacologique du système du complément peut constituer un des mécanismes atténuants les dommages induits par l'ischémie-reperfusion.

La sauvegarde du tissu myocardique est également dépendante de l'interaction de l'héparine avec plusieurs molécules d'adhésion exprimées à la surface des leucocytes et des plaquettes <sup>281,282</sup>. L'héparine contient 4 résidus ou plus capables d'inhiber la fonction de la L- et de la P-sélectine, inhibant ainsi le roulement initial des leucocytes sur l'endothélium. Plus précisément, l'héparine a été identifiée comme responsable de l'inhibition des liaisons entre la P-sélectine

et les PMNs <sup>283</sup>. L'interaction de l'héparine avec les récepteurs CD11b/CD18 a aussi été démontrée <sup>284 285</sup>, résultant en des propriétés anti-inflammatoires dûs à une réduction de la séquestration des leucocytes dans le tissu post-ischémique. Une réduction des dommages au cerveau dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat traité à l'héparine a été observée, et a été corrélée avec une diminution de l'infiltration leucocytaire dans le tissu <sup>286,287</sup>. Donc, les effets cardioprotecteurs de l'héparine sur la fonction post-ischémique pourrait être dépendante d'une inhibition des sélectines et/ou des intégrines.

L'interaction de l'héparine avec les molécules d'adhésion est en partie responsable de l'inhibition de la réaction inflammatoire. Selon une étude de Bonmann et coll <sup>288</sup>, l'héparine préviendrait les réactions inflammatoires en diminuant le pouvoir des cytokines à induire la synthèse d'oxide nitrique. Des cellules endothéliales de rat ont été isolées suivant une période d'ischémie cérébrale et mises en présence de l'interféron-gamma (IFN-gamma) et de l'interleukin-1 beta (IL-1beta) en présence ou non d'héparine. Un effet dose dépendent de l'héparine a été démontré en atténuant l'augmentation de l'expression de la libération de iNOS (la forme inductible de NO synthase) suite à une activation par ces cytokines.

L'héparine exerce une protection de la fonction endothéliale en préservant ses capacités vasodilatatrices et joue un rôle dans la régulation de la production d'endothéline <sup>289,290</sup>. La préservation de la fonction endothéliale lors de l'ischémie-reperfusion par l'héparine serait en partie dépendente de la synthèse

d'oxide nitrique <sup>291</sup>. Dans une autre étude, l'héparine et une héparine non-anticoagulante préservait la relaxation dépendante de l'endothélium suite à une période d'ischémie et de reperfusion via des mécanismes partiellement dépendants de l'activation de la voie du NO-cGMP <sup>292,293</sup>. Cependant, des résultats opposés ont observé qu'avec de fortes doses d'héparine ont induit une réduction de 36% de la production d'oxyde nitrique (NO) comparativement au groupe témoin <sup>294</sup> sur des cellules endothéliales d'aorte bovine. Cette réduction a été associée à une inhibition moindre de l'activation plaquettaire comparativement aux témoins expliquant une partie de l'effet prothrombotique de l'héparine.

L'héparine est un composé glycosaminoglycan extrêmement acide contenu dans les granules des cellules mastocytes et libérées lors des réactions inflammatoires. Plusieurs observations suggèrent un rôle potentiel des héparines dans la protection du tissu contre les radicaux libres <sup>295</sup>. L'activité anti-oxydante serait présente à des pH acide. L'héparine possède une variété de groupes anioniques qui lui attribue des propriétés de liaison avec des cations (comme les métaux Cu(I) et Fe(II)) et conséquemment prévient leur réduction impliqué dans la génération de radicaux oxygène <sup>243</sup>. Une activité anti-oxydante dépendante de l'activité superoxyde dismutase a aussi été identifiée. *In vivo*, l'héparine entraîne l'activation de la SOD <sup>296</sup> en plus d'induire la libération de la superoxyde dismutase (SOD) <sup>297</sup>. De plus, des cellules endothéliales en culture ont été protégées des dommages causés par les radicaux oxygènes générés par

le système xanthine/xanthine oxydase <sup>298</sup>.

Peu d'études ont été réalisées afin d'évaluer le potentiel cardioprotecteur des héparines de bas poids moléculaire (HBPM) lors de l'ischémie-reperfusion. L'administration de celles-ci pourrait être avantageuse dans la réduction des lésions de reperfusion comparativement à l'héparine. Les HBPM sont entre autre incapables d'activer les plaquettes contrairement à l'héparine non fractionnée <sup>299</sup> et n'induisent pas la libération de TXA<sub>2</sub> <sup>208</sup>. Elles se lient aux leucocytes <sup>300</sup> et inhibent les sélectines <sup>282</sup>. Une étude portant sur la thrombolyse chez des patients présentant un infarctus du myocarde, a démontré que l'énoxaparine induit des conséquences hémorragiques moins sévères que celles observées chez les patients traités avec l'héparine <sup>301</sup>. De plus, les HBPM, au contraire des héparines standards, n'augmentent pas la perméabilité des vaisseaux sanguins<sup>302</sup> et n'induisent pas la production de médiateurs cytotoxiques tel l'anion superoxyde par les neutrophiles <sup>209</sup>. Les HBPM possèdent un niveau d'activité plus stable, car contrairement aux héparines, elles présentent une plus faible liaison avec les protéines plasmatiques <sup>303</sup>, leur conférant une plus grande biodisponibilité. A titre d'exemple, une biodisponibilité de 90% a été mesurée après une injection sous-cutanée d'énoxaparine comparativement à 30% pour l'héparine non fractionnée <sup>304</sup>.

Une étude comparant plusieurs agents antithrombotiques tels l'énoxaparine et l'héparine lors d'une thérapie thrombolytique par le rt-PA a démontré une

reperfusion plus efficace par l'énoxaparine <sup>305</sup>. Lors d'une thérapie antithrombotique comparant l'administration conjointe de l'énoxaparine et l'aspirine ou l'héparine non fractionnée avec l'aspirine chez les patients souffrant d'angine instable, l'incidence d'événements ischémiques s'est avérée réduite dans la première combinaison <sup>306</sup>.

Une étude effectuée dans notre laboratoire a servi à évaluer le potentiel cardioprotecteur de l'héparine et de l'énoxaparine ainsi que de la streptokinase, sur la taille de l'infarctus et l'accumulation des plaquettes et des neutrophiles dans le myocarde reperfusé <sup>218</sup>. Les résultats de cette étude ont démontré que l'administration d'un bolus d'énoxaparine avant le début et pendant la reperfusion réduit de 55% la taille de l'infarctus par rapport aux animaux témoins. Cet effet a été accompagné d'une inhibition du taux d'accumulation des plaquettes de 64% et des neutrophiles de 81% dans le myocarde reperfusé. Les mécanismes de la cardioprotection observée avec l'énoxaparine ne sont pas connus. Par contre, cette observation suggère que l'énoxaparine agit probablement sur des mécanismes responsables de l'adhésion entre les plaquettes et les neutrophiles, diminuant ainsi leur recrutement à l'intérieur du tissu reperfusé. En effet, lors d'une étude *in vitro* portant sur l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles en milieu physiologique, nous avons observé une inhibition de l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles qui pourrait être, en partie, dépendante d'une inhibition de la fonction de la P-sélectine et/ou des récepteurs de la P-sélectine sur les neutrophiles <sup>218</sup>.

## 2.5 Traitements anti-plaquettaires

L'activation des plaquettes par des agonistes tels la thrombine, le collagène et l'adénosine diphosphate (ADP) dans des situations de lésions vasculaires, mène à la formation d'agrégats plaquettaires capables d'empêcher une perte sanguine excessive au site de la lésion endothéliale <sup>307</sup>. Par contre, dans différentes conditions pathologiques, comme une rupture de plaques athéromateuses, les agrégats plaquettaires peuvent former des thrombus causant de multiples événements ischémiques cardiovasculaires incluant l'angine instable et l'infarctus du myocarde.

Lors de l'activation plaquettaire, plusieurs médiateurs de l'agrégation sont produits et libérés des plaquettes dans le but de produire et d'amplifier la réponse, dont la thromboxane  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>), la sérotonine et l'ADP qui induisent l'activation ou l'expression de plusieurs molécules d'adhésion impliquées dans l'ischémie-reperfusion. Les récepteurs GPIIb/IIIa sont responsables de la formation d'agrégats plaquettaires et également de l'adhésion des plaquettes aux leucocytes ainsi qu'à la paroi vasculaire endommagée. Le GPIIb/IIIa est un hétérodimère composé de 2 protéines transmembranaires liées de façon non covalente : Une sous-unités  $\alpha$  de 136-kd composée de chaînes lourdes et légères et une sous-unités  $\beta$  de 92-kd. On retrouve environ 50 000 à 80 000 récepteurs GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes non activées <sup>308</sup>. L'activation plaquettaire leur confère une forme active capable de lier le fibrinogène, la vitronectine, la fibronectine et le facteur von Willebrand. L'agrégation plaquettaire

est induite par la liaison du fibrinogène (une molécule bivalente) avec les récepteurs GPIIb/IIIa. Par exemple, l'activation plaquettaire induit un changement de conformation du récepteur GPIIb/IIIa qui devient actif et capable de lier le fibrinogène causant la formation d'agrégats plaquettaires. Dans le but d'inhiber les conséquences liées à l'activation plaquettaire, des traitements anti-plaquettaires ont été développés et sont fréquemment utilisés lors des phases aiguës, sub-aiguës et plus chroniques de symptômes coronariens. Ils sont principalement utilisés afin de prévenir la réocclusion de l'artère recanalisée et de réduire la mortalité et la morbidité des patients souffrants d'un infarctus aigu du myocarde <sup>238,309</sup>. Un des agents effectifs administré régulièrement aux patients afin de prévenir l'agrégation plaquettaire est l'aspirine (l'acide acétylsalicylique ; ASA) <sup>310</sup>. Plusieurs agonistes de l'agrégation plaquettaire peuvent aussi être utilisés. Les inhibiteurs des GPIIb/IIIa représentent maintenant une approche efficace servant à inhiber la formation d'agrégats plaquettaires.

Dans cette section, nous décrivons les propriétés de l'aspirine ainsi que des inhibiteurs des GPIIb/IIIa et leur rôle dans la cardioprotection en situation d'ischémie-reperfusion.

### **2.5.1 Mécanismes d'action de l'aspirine**

L'aspirine est principalement utilisée afin de prévenir la réocclusion d'une artère reperfusée et ainsi de diminuer l'apparition de nouveaux épisodes ischémiques <sup>238,311</sup>. L'activité anti-plaquettaire de l'aspirine dépend de son

pouvoir inhibiteur de la production de thromboxane  $A_2$ , un agoniste potentiel libéré des plaquettes activées. L'acétylation et conséquemment l'inactivation de la cyclo-oxygénase par l'aspirine empêche la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine  $G_2$ , une étape nécessaire à la formation de la thromboxane  $A_2$  312. Les plaquettes sont des cellules anucléées et conséquemment incapables de synthétiser de la cyclo-oxygénase supplémentaire, l'inhibition enzymatique est donc permanente et irréversible 310,313. La production de  $TXA_2$  dépend donc d'une éventuelle synthèse par de nouvelles plaquettes. L'effet anti-plaquettaire de l'ASA persiste donc pendant toute la vie des plaquettes affectées (8 à 10 jours) 314. La cyclo-oxygénase est aussi présente à l'intérieur des cellules endothéliales, ce qui explique l'inhibition concomitante de la synthèse de  $PGI_2$  endothéliale 315, un agent vasodilatateur et un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. Contrairement aux plaquettes, l'endothélium vasculaire peut resynthétiser la cyclo-oxygénase, expliquant la nécessité d'une dose d'ASA plus élevée pour inhiber la production de  $TXA_2$  314.

L'ASA possède également une activité anti-inflammatoire responsable de l'inhibition de la synthèse des PG 316. Le salicylate, principal médiateur de l'ASA, a été identifié comme agent inhibiteur de l'activation et de l'adhésion des neutrophiles 317. Le mécanisme d'action proposé est lié à la libération d'adénosine dans le milieu extracellulaire suite à l'hydrolyse de l'ATP. L'adénosine se liant aux récepteurs présents sur les neutrophiles induit le découplage de certains récepteurs des facteurs chimiotactiques 318. Le

salicylate provenant de l'ASA possède également un pouvoir antioxydant <sup>319</sup>.

L'administration de l'aspirine a démontré des résultats bénéfiques chez la majorité des patients présentant des symptômes d'ischémie coronarienne, incluant la prévention d'événements cardiaques primaires et secondaires <sup>310</sup>. Une étude effectuée sur des patients ayant subi un infarctus du myocarde non fatal, a démontré une réduction de 13% de la mortalité et une réduction de 31% du risque d'un second infarctus du myocarde non fatal chez des patients traités à l'aspirine <sup>310,320</sup>. Dans un modèle porcin d'ischémie-reperfusion, l'ASA a réduit la taille de l'infarctus d'environ 44% en cours de reperfusion d'une artère présentant des lésions intimaux <sup>255</sup>. Lors d'une étude effectuée dans notre laboratoire chez le chien, l'ASA administré avant la reperfusion n'a pas démontré de diminution de la taille de l'infarctus ni de l'accumulation des plaquettes dans le myocarde reperfusé <sup>218</sup>. Dans cette étude, l'administration de l'ASA simultanément avec l'énoxaparine a démontré la neutralisation de la cardioprotection associée à l'énoxaparine en termes de diminution de la taille de l'infarctus ainsi qu'au niveau de l'accumulation des plaquettes intramyocardiques, sans toutefois altérer la capacité de l'énoxaparine à atténuer l'accumulation des neutrophiles et la peroxydation lipidique. Ces résultats suggèrent donc que l'effet cardioprotecteur de l'énoxaparine est médié par des mécanismes sensibles à l'aspirine. Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les neutrophiles amplifient l'effet anti-agrégant de l'ASA sur les plaquettes <sup>251</sup>. Ils ont démontré que l'ASA stimulait la production monoxyde

d'azote (NO) des neutrophiles inhibant l'effet agrégant des plaquettes stimulées à la thrombine, l'ADP ou à l'épinéphrine. Cette propriété serait peut-être responsable du potentiel bénéfique de l'ASA lors d'infarctus du myocarde. L'administration de l'ASA à long terme chez des patients présentant un infarctus aigu du myocarde, a démontré une réduction de l'activation plaquettaire par une diminution de l'expression de la P-sélectine et de l'agrégation par l'ADP <sup>321</sup>. L'aspirine s'est également montrée efficace dans la prévention des baisses du débit résultant de la formation de thrombus plaquettaires au niveau de la sténose d'une artère coronaire reperfusée <sup>322,323</sup>.

L'aspirine présente donc des propriétés anti-plaquettaires dépendante de la cyclo-oxygénase, mais agit aussi sur plusieurs autres voies impliquées dans les dommages myocardiques suite à un épisode d'ischémie-reperfusion. L'inactivation de la réponse inflammatoire constitue une des stratégies exploitables lors des traitements visant à réduire les conséquences délétères de l'ischémie-reperfusion.

### **2.5.2 Inhibiteurs de la glycoprotéine GPIIb/IIIa plaquettaire**

Le récepteur GPIIb/IIIa, un récepteur membranaire de la famille des intégrines est responsable de l'agrégation plaquettaire. Ce récepteur spécifique des plaquettes entraîne la formation d'agrégats plaquettaires par l'intermédiaire du fibrinogène. Les récepteurs GPIIb/IIIa sont largement distribués à la surface des plaquettes (environ 50 000 par plaquette), cependant, la liaison

de ceux-ci au fibrinogène nécessite un changement de conformation produit suite à une stimulation plaquettaire par un agoniste tels l'ADP, la thrombine ou l'acide arachidonique (AA). Les GPIIb/IIIa représentent une cible thérapeutique prometteuse puisqu'ils sont indispensables à la formation d'agrégats plaquettaires. Un des avantages de cette thérapie consiste en l'inhibition de l'agrégation plaquettaire indépendamment de l'agoniste utilisé <sup>324,325</sup>. Sur le plan expérimental, l'utilisation d'antagonistes des GPIIb/IIIa prévient les variations cycliques du débit <sup>326</sup> et la réocclusion suite à la thrombolyse <sup>240,327</sup>. Le lamifiban, un inhibiteur spécifique des GPIIb/IIIa, a réduit significativement de 8.1% à 3.3% l'incidence d'épisodes ischémiques ainsi que la mortalité à court terme chez les patients souffrant d'angine instable <sup>309</sup>. L'administration des inhibiteurs des GPIIb/IIIa s'est également avérée bénéfique chez les patients ayant subi une angioplastie <sup>328,329</sup>. L'administration de Lamifiban dans un modèle d'ischémie-reperfusion canin a réduit de 48% le taux d'accumulation des plaquettes dans le myocarde reperfusé et diminué de 47% la taille de l'infarctus sans modifier l'accumulation des neutrophiles <sup>218</sup>. Ces résultats confirment donc l'importance des plaquettes dans le développement de l'infarctus du myocarde en cours de reperfusion.

## **2.6 Conclusion :**

La formation de microthrombus et d'agrégats plaquettaires a été décrite en association avec les lésions vasculaires au cours de la reperfusion et survient principalement aux sites vasculaires endommagés riches en lipides ou à

l'intérieur des tissus nécrosés avec présence de cellules inflammatoires 193,217. Les plaquettes accumulées aux sites de lésions libèrent des substances cytotoxiques comme des radicaux oxygènes 210,211 en plus des médiateurs proinflammatoires qui activent les leucocytes et amplifient les réactions délétères sur les cellules présentes dans le territoire compromis 204,205. L'administration d'agents antiplaquettaires comme les inhibiteurs des GPIIb/IIIa et les héparines de bas poids moléculaire sont efficaces dans la réduction des dommages médiés par les plaquettes. L'héparine et l'énoxaparine ont réduit les lésions de reperfusion par leurs interactions avec l'élastase 277, le système du complément 278, leur pouvoir antioxydant 243 et principalement, par leurs propriétés inhibitrices sur les molécules d'adhésion telles la P- et la L-sélectine 218,281,282.

## Partie 2 : Contribution originale

### Chapitre 3

#### Matériel et méthodes

##### 3.1 Introduction

Une étude effectuée dans notre laboratoire <sup>218</sup> a démontré que l'énoxaparine, une héparine de bas poids moléculaire, exerce un pouvoir cardioprotecteur dans un modèle canin d'ischémie (90 min.) et de reperfusion (6 hres). L'administration d'un bolus d'énoxaparine 5 minutes avant le début de la reperfusion suivie d'une perfusion continue, réduit de 55% la taille de l'infarctus comparativement aux animaux témoins. Cette cardioprotection est accompagnée d'une inhibition significative du taux d'accumulation des plaquettes et des neutrophiles dans le myocarde reperfusé. Ce phénomène apparaît relié à une inhibition de l'adhésion cellulaire dépendante de la P-sélectine par l'énoxaparine. Cette inhibition préviendrait les effets cytotoxiques associés aux plaquettes et aux neutrophiles ainsi que l'endommagement post-ischémique du myocarde sauvé par la reperfusion.

L'objectif de ce présent projet est de déterminer si l'effet cardioprotecteur de l'énoxaparine observé après une courte période de reperfusion (6 hres) est de caractère permanent. Dans ce but, nous avons étudié les effets cardioprotecteurs de l'énoxaparine dans un modèle où la reperfusion était prolongée à 72 heures.

## 3.2 Études Animales

### 3.2.1 Chirurgie

Des chiens de race fox-hound des deux sexes, pesant entre 18 et 30 kg ont été anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (30 mg/kg, i.v.), intubés et ventilés mécaniquement. Un électrocardiogramme (position II) a été enregistré et l'anesthésie a été maintenue pendant la chirurgie en administrant au besoin des doses additionnelles de pentobarbital. Sous des conditions stériles, deux cathéters servant aux prélèvements de sang artériel (artère fémorale droite) et veineux (veine saphène gauche) ont été insérés. Après l'injection de 0.1 mg/kg i.v. de bromide pancuronium, une thoracotomie gauche a ensuite été effectuée au cinquième espace intercostal. Le cœur a été par la suite maintenu dans un berceau réalisé avec le péricarde. Deux autres cathéters ont ensuite été introduits par l'oreillette gauche dans le ventricule gauche, l'un poussé plus loin pour la mesure de la pression intraventriculaire et l'autre laissé dans l'oreillette destiné à l'injection de microsphères radioactives. Les gaz sanguins étaient mesurés régulièrement pendant la période de la chirurgie et les pH sanguins maintenus dans les limites normales (pH=7.4). L'artère coronaire descendante antérieure gauche (ACDAG) a été isolée en dessous de la première branche diagonale et le débit coronaire mesuré avec une sonde électromagnétique. Cinq minutes avant l'occlusion, un occluteur métallique a été ajusté sur l'ACDAG afin d'établir une sténose critique. Cette sténose critique était suffisamment sévère pour éliminer la réponse hyperémique consécutive au

rétablissement de la circulation sanguine suite à une occlusion de 10 secondes de la coronaire, sans modification du débit de base de cette dernière. Une fois les coordonnées de la sténose recueillies sur le sténoseur, la coronaire était totalement occluse en refermant ce dernier pour une période de 90 minutes, sans toutefois traumatiser localement le vaisseau <sup>330</sup>. Après ce temps, l'occlusion était levée en deserrant l'occluteur au seuil de la sténose critique et le flot sanguin était rétabli. Après 5 heures de reperfusion, la sténose était relevée entièrement, les cathéters enlevés et le thorax fermé. L'insertion d'un cathéter dans la veine jugulaire gauche a été effectuée dans le but de prélever des échantillons sanguins de manière régulière jusqu'au sacrifice. Une pompe péristaltique portative a été installée pour la perfusion constante de saline afin de prévenir l'obstruction du cathéter. Avant d'acheminer l'animal en salle de réveil, 3 mg/kg de gentamycine (Schering, Canada), 2 millions d'unités de pénicilline (Penlong XL Rogar/STB) et 0.015-0.02 mg/kg de buprénorphine étaient injectés par voie intramusculaire. Des doses additionnelles de gentamycine étaient répétées après 24 et 48 heures, alors que le traitement analgésique avec la buprénorphine était fixé aux 6 heures pendant le premier 30 heures et aux 12 heures par la suite, au besoin.

Cette étude a été approuvée par un comité de déontologie animale local et conforme aux règles du Conseil Canadien de protection des animaux (CCPA).

### 3.2.2 Groupes expérimentaux

La veille de l'expérience, les animaux ont été répartis au hasard entre deux groupes, un groupe témoin recevant de la saline, l'autre traité recevant de l'énoxaparine (Rhône-Poulenc Rorer, Canada).

Cinq minutes avant la reperfusion, une dose de 1.25 mg/kg d'énoxaparine était injectée par voie intraveineuse suivie d'une perfusion continue de 0.2125 mg/kg/hre pendant 5 heures. Par la suite, 1.25 mg/kg était injecté par voie sous-cutané après 6, 18, 30, 42, 54 et 66 heures de reperfusion. Les chiens témoins ont subi les mêmes conditions expérimentales et l'énoxaparine a été remplacée par la saline physiologique.

### 3.2.3 Mesure des débits myocardiques

Les débits myocardiques et collatéraux ont été mesurés après 60 minutes d'occlusion par l'embolisation de 3 à 4 millions de microsphères radioactives (15 $\mu$ ) marquées au strontium ( $_{88}\text{Sr}$ ) ou au chrome ( $_{52}\text{Cr}$ ) et injectées dans l'oreillette gauche  $^{331}$ . Quinze secondes avant le début de l'injection qui se poursuit pendant 20 secondes, un volume sanguin de référence a été recueilli de l'artère fémorale à vitesse constante. Ce prélèvement débute 15 secondes avant l'injection de microsphères et se poursuit pendant exactement 2.5 minutes. Le volume de l'échantillon a été mesuré et pesé par la suite pour plus de précision. La radioactivité totale de l'échantillon sanguin a été mesurée puis corrélée avec son débit sanguin. Le débit sanguin de l'échantillon a été calculé en divisant le poids du sang contenu dans la seringue par le poids

correspondant à 1 mL de sang et en divisant ce volume par 2.5 min. (correspond au temps du prélèvement). Le débit sanguin présent dans le tissu myocardique ischémique a ensuite été obtenu en multipliant la radioactivité du tissu myocardique par le débit sanguin précédemment calculé et en divisant cette valeur par le poids du tissu myocardique (voir équations #1).

**Équation #1 : Exemple de calcul des débits myocardiques à partir de microsphères :**

$$\frac{8 \text{ mL/min} \cdot \omega}{\rho} = \pi$$

$\omega$  = radioactivité du tissu myocardique  
 $\rho$  = poids du tissu myocardique  
 $\pi$  = débit sanguin du tissu myocardique

N.B. : Dans cette formule, nous supposons que l'échantillon sanguin prélevé correspond à 8 mL/min. Cette valeur est calculé par la formule suivante :

$$\frac{\mu}{A \cdot 2.5 \text{ min}} = B$$

$\mu$  = poids du sang contenu dans la seringue  
 $A$  = poids correspondant à 1 mL de sang  
 $B$  = débit de l'échantillon sanguin de référence

Le débit régional et collatéral a été mesuré en disséquant 3 ou 4 tranches centrales du ventricule gauche dans les régions non-ischémiques et ischémiques respectivement. Des sections centrales de ces régions ont été divisées en trois parties égales, le sous-épicarde, le mésomyocarde et le sub-endocarde. Chaque échantillon a été pesé et leur radioactivité mesurée dans

un compteur gamma. Après la correction du bruit de fond et de l'empiétement de la radioactivité respective de chacun des isotopes, le débit sanguin est calculé et exprimé en mL/min/g de tissu (voir équation #1).

#### **3.2.4 Évaluation de la taille de l'infarctus et de la zone à risque**

Après 72 heures de reperfusion, 10 000 U d'héparine (Leo Laboratories, Canada) était injectés par voie intraveineuse et l'animal sacrifié en injectant une surdose intraveineuse de pentobarbital sodique. Le cœur a ensuite été excisé et la délimitation entre la région privée de circulation sanguine (zone à risque), l'infarctus et la région non-ischémique (zone normale) a subséquemment été effectuée par une technique de perfusion de colorants (bleu d'Evens (BE) et chlorure de triphenyltétraazolium (TTZ) ; Sigma, Canada) <sup>332</sup>. Le cœur a ensuite été suspendu sur un montage de Langendorf et perfusé de façon rétrograde par l'aorte avec de la saline pendant 5 minutes à la pression de 100 mmHg afin d'éliminer le sang de la vasculature. Pour délimiter la zone à risque, une solution de bleu Evans (5% dans de la saline) était ensuite perfusée par l'aorte dans des conditions similaires, alors qu'une perfusion de saline était effectuée simultanément dans l'artère préalablement occluse, grâce à une canule implantée au site d'occlusion (voir annexe). Le cœur droit a été éliminé et le ventricule gauche préservé afin d'évaluer la taille de l'infarctus et de mesurer les débits normaux et collatéraux à l'aide de microsphères comme précédemment décrit. Le cœur a ensuite été sectionné avec un tranche viande électrique de l'apex vers la base en tranches de 7 mm pour la mesure de la

zone à risque et de l'infarctus. Au préalable, ces tranches ont été pesées et l'évaluation par planimétrie les zones hémorragiques, régions apparaissant rouges foncées, a été effectuée. Les tranches ont par la suite été incubées dans le TTZ (1.5% dans du tampon Tris 2.4%, pH 7.8) pendant dix minutes à 37°C afin de délimiter l'infarctus de la zone à risque. Le principe de cette méthode consiste à mettre en évidence l'absence d'activité déshydrogénase dans les régions infarctées, laquelle intervient dans le transport d'électron <sup>333</sup>. Le TTZ colore les tissus vivants en rouge brique, alors que les tissus nécrosés conservent leur teinte initiale, plus pâle. Les tranches de cœur sont ensuite dessinées par transparence sur une pellicule de plastique. Les surfaces du myocarde normalement perfusé (BE positif), celles de la zone à risque (BE négatif) ainsi que celles de l'infarctus (BE négatif, TTZ négatif) sont calculées par planimétrie en mesurant la surface (cm<sup>2</sup>) de chaque zone sur une tablette digitale couplée à un ordinateur. La taille de l'infarctus est finalement exprimée en pourcentage de la zone à risque et en pourcentage de la taille du ventricule gauche tandis que la taille de la zone à risque est exprimée en pourcentage de la taille du ventricule gauche.

### **3.2.5 Mesure des créatines kinases (CK et CK-MB) et de la troponine I**

Du sang veineux (5 mL dans des tubes vacutainer SST gel and clot activator) a été recueilli avant chirurgie, 5 minutes avant et après 45 et 90 minutes d'occlusion ainsi qu'après .25, .5, 1, 3, 6, 24, 48 et 72 heures de reperfusion pour la mesure de créatine kinase (CK), créatine kinase isomère

MB (CK-MB) et de la troponine I. Le sang a été centrifugé à 1000g pendant 30 minutes à 4°C et le sérum recueilli et conservé à -70°C. Le dosage de CK est estimé directement sur le sérum en utilisant un analyseur automatique (BM/Hitachi 917, Boehringer Mannheim, Canada) en tenant compte des recommandations du fabricant. Le principe du dosage consiste à détecter la quantité de gluconate-6-P produite suite à plusieurs réactions biochimiques. La CK présente dans le sérum catalyse la première de ces réactions biochimiques ce qui permet d'établir la relation entre le marqueur et la CK <sup>334</sup> (voir annexe). Les dosages de l'isoenzyme MB de la créatine kinase (CK-MB) ainsi que de la troponine I sont effectués par le système OPUS (Behring diagnostics Inc.) selon la procédure du fabricant. La créatine-kinase MB est mesurée à l'aide de contrôles CKMB et CK totale lyophilisés qui contiennent de la CKMB humaines et des CK de muscle de squelette de lapin dans du sérum. La troponine I est quantifiée à l'aide d'anticorps polyclonaux (chèvre) anti-troponine I marqués à la phosphatase alcaline.

### **3.2.6 Test de coagulation (aPTT) et activité anti-Xa :**

Le temps de céphaline activé (aPTT) et l'activité anti-Xa ont été mesurés sur du sang veineux citraté (9:1, 3.8% de citrate de sodium, pH 7.4) obtenu juste avant l'injection d'énoxaparine ainsi qu'après 6, 18, 24, 48 et 72 heures de reperfusion. Le sang était centrifugé à 1000g pendant 30 minutes à 4°C et le plasma recueilli et conservé à -70°C.

Le test de l'aPTT est effectué à l'aide de phosphatides de cerveau de

lapin et de soja purifiés, réactif TCA Actin (Dade Diagnostics of P.R. Inc, É-U) selon la procédure recommandée par le fabricant. L'activité anti-Xa a été mesurée avec la trousse Coatest heparine (Chromogenix, Suède) et un spectrophotomètre pour l'étude cinétique de ce facteur (voir annexe).

### **3.2.7 Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard pour chacun des groupes. Le test de t de student a été utilisé afin d'évaluer la différence entre la taille de l'infarctus mesurée chez le groupe traité et le groupe témoin. Une comparaison intra-groupe des données hémodynamiques, des dosages de marqueurs de la nécrose ainsi que des tests de la coagulation a été effectuée par une analyse de variance à mesures répétées suivi d'un test de t de student afin d'évaluer la différence entre les deux groupes à chacun des temps. Une analyse de covariance entre la taille de l'infarctus (variable dépendante) et le débit collatéral (variable indépendante) a été utilisée afin de contrôler la variabilité de l'infarctus attribuée au débit collatéral. Les différences ont été considérées statistiquement significatives lorsque la valeur de  $p < 0.05$ .

## Chapitre 4

### Résultats

#### 4.1 Caractéristiques et données hématologiques des groupes étudiés :

Quarante huit chiens de race fox-hound ont été expérimentés lors de cette étude, soit vingt cinq chiens traités et vingt trois chiens témoins. Douze chiens témoins et quatorze chiens traités ont été exclus de l'analyse (tableau 4.1). Sept chiens ont fibrillé à la période d'occlusion (5 chiens témoins et 2 chiens traités) et neuf chiens à la période de reperfusion (4 chiens témoins et 5 chiens traités). Trois chiens ont été exclus car ils présentaient des débits ischémiques myocardiques supérieurs à 0.5 mL/min/g (1 chien témoin et 2 chiens traités). Deux chiens ont été exclus à cause d'un hémothorax (2 chiens traités). Finalement, cinq chiens ont été exclus à cause de problèmes techniques : trois lors de la chirurgie (1 chien témoin et 2 chiens traités), 1 chien témoin parce qu'il avait des parasites et le dernier à cause de blessures autres que chirurgicales. L'analyse des résultats expérimentaux a été effectuée sur un échantillon de 22 chiens (11 chiens traités et 11 chiens témoins). Comme il apparaît plus loin, un sous-groupe de chiens a été formé et inclus les chiens possédant un débit collatéral transmural supérieur à 0.08 mL/min/g (6 chiens dans le groupe témoin et 6 chiens dans le groupe traité).

**Tableau 4.1 : Description des groupes expérimentaux :**

# chiens		Témoins	Traités
		23	25
Exclus :	FVO :	5	2
	FVR :	4	5
	Non-Ischémiques :	1	2
	Hémothoraxes :	0	2
	Problèmes techniques :	2	3
	Chirurgie :	1	2
	Parasites :	1	0
	Blessure autre :	0	1
	# chiens analysés :	11	11

FVO : fibrillation ventriculaire lors de l'occlusion

FVR : fibrillation ventriculaire lors de la reperfusion

Aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne le genre (témoin et traité : 5 femelles, 6 mâles), le poids corporel (témoin :  $22.67 \pm 0.67$  ; traité :  $22.5 \pm 1.03$  kg), l'hématocrite (témoin :  $49 \pm 3$  ; traité :  $49 \pm 2$  %), l'hémoglobine (témoin :  $166.27 \pm 9.64$  ; traité :  $166.64 \pm 5.14$  g/L), le compte plaquettaire (témoin :  $252.73 \pm 22.34$  ; traité :  $265.82 \pm 15.51 \times 10^9/L$ ) ainsi que les pourcentages de neutrophiles ( $64.60 \pm 0.91$  vs  $60.14 \pm 3.07$ ), d'éosinophiles ( $5.30 \pm 1.13$  vs  $5.95 \pm 1.20$ ), de basophiles ( $0 \pm 0$  vs  $0 \pm 0$ ), de lymphocytes ( $22.70 \pm 2.08$  vs  $28.45 \pm 2.89$ ) et de monocytes ( $7.80 \pm 1.31$  vs  $6.27 \pm 1.25$ ) entre les deux groupes étudiés. Toutefois, le groupe traité présentait un compte leucocytaire circulant légèrement plus élevé que le groupe témoin avant l'anesthésie ( $13.57 \pm 0.92$  comparativement à  $10.59 \pm 0.92 \times 10^9/L$ ,  $p < 0.05$ ) (tableau 4.2).

**Tableau 4.2 : Paramètres de base des chiens étudiés (\*p<0.05 vs témoin) :**

	TÉMOINS	TRAITÉS
	(Moyenne±SEM)	(Moyenne±SEM)
Nombre de chien	11	11
Femelles :	5	6
Mâles :	5	6
Poids (kg)	22,67 ± 0,67	22,50 ± 1,03
Hématocrite (%)	49,00 ± 3,00	49,00 ± 0,02
Hémoglobine (g/L)	166,27 ± 9,64	166,64 ± 5,14
Plaquettes (10 <sup>9</sup> /L)	252,73 ± 22,34	265,82 ± 15,51
Leucocytes (10 <sup>9</sup> /L)	10,59 ± 0,92	13,57 ± 0,92 *
Neutrophiles (%)	64,60 ± 0,91	60,14 ± 3,07
Éosinophiles (%)	5,30 ± 1,13	5,95 ± 1,20
Basophiles (%)	0 ± 0	0 ± 0
Lymphocytes (%)	22,70 ± 2,08	28,45 ± 2,89
Monocytes (%)	7,80 ± 1,31	6,27 ± 1,25

Les comptes de globules blancs et de plaquettes, le pourcentage d'hématocrite et les valeurs d'hémoglobine observés au cours de l'expérience sont exposés aux tableaux 4.3 à 4.6. Si tous les chiens sont inclus dans l'analyse, les globules blancs ont varié de  $7.79 \pm 0.90$  à  $24.05 \pm 1.76 \times 10^9/L$  dans le groupe témoin et de  $9.89 \pm 0.77$  à  $31.79 \pm 2.27 \times 10^9/L$  dans le groupe traité. Les globules blancs étaient significativement plus élevés dans le groupe traité avant l'anesthésie et à 24 heures de reperfusion ( $13.57 \pm 0.92$  vs  $10.59 \pm 0.92 \times 10^9/L$  et  $31.79 \pm 2.27$  vs  $24.05 \pm 2.10 \times 10^9/L$  respectivement). Le compte plaquettaire a varié de  $140.86 \pm 27.33$  à  $257.27 \pm 22.70 \times 10^9/L$  chez les chiens témoins et de  $109 \pm 12.37$  à  $265.82 \pm 15.51 \times 10^9/L$  chez les chiens traités. A 72 heures de reperfusion, les plaquettes étaient significativement moins élevées chez les chiens traités à l'énoxaparine comparativement aux chiens

témoins ( $109.50 \pm 12.37$  vs  $155.09 \pm 16.81 \times 10^9/L$ ) suggérant une thrombocytopénie induite par le traitement. Le pourcentage d'hématocrite a varié le  $36 \pm 0.01$  à  $49 \pm 0.03$  % dans le groupe témoin et de  $36 \pm 0.02$  à  $49 \pm 0.02$  % dans le groupe traité. Après 85 minutes d'occlusion et 6 heures de reperfusion, les valeurs d'hématocrite étaient statistiquement plus élevées chez les chiens traités comparativement aux chiens témoins ( $45 \pm 0.01$  vs  $44 \pm 0.01$  % et  $45 \pm 0.02$  vs  $44 \pm 0.02$  %). Après 24 et 48 heures de reperfusion, l'hématocrite était significativement plus élevée dans le groupe témoin comparativement au groupe traité ( $44 \pm 0.01$  vs  $39 \pm 0.02$  % et  $41 \pm 0.01$  vs  $38 \pm 0.02$  %). Finalement, l'hémoglobine a varié de  $127.91 \pm 6.17$  à  $166.27 \pm 9.64$  g/L dans le groupe témoin et de  $121.25 \pm 7.39$  à  $166.64 \pm 5.14$  g/L (p ns) dans le groupe traité.

Lorsque l'analyse comprend les chiens ayant des débits collatéraux supérieurs à  $0.08$  mL/min/g, le compte de globules blancs a varié de  $7.99 \pm 1.16$  à  $25.77 \pm 3.19 \times 10^9/L$  dans le groupe témoin et de  $9.06 \pm 1.47$  à  $28.78 \pm 2.06 \times 10^9/L$  dans le groupe traité (p ns). Le nombre de plaquettes a varié de  $155.75 \pm 27.76$  à  $288.00 \pm 20.91 \times 10^9/L$  chez les chiens témoins et de  $118.40 \pm 16.80$  à  $244.00 \pm 17.77 \times 10^9/L$  chez les chiens traités (p ns). Le pourcentage d'hématocrite a été significativement différent entre les deux groupes à tous les temps de prélèvements et a varié de  $37 \pm 0.02$  à  $51 \pm 0.02$  % dans le groupe témoin et de  $35 \pm 0.02$  à  $49 \pm 0.03$  % dans le groupe traité (p < 0.05). Finalement, les valeurs d'hémoglobine n'ont pas été significativement

différentes entre les deux groupes au cours de l'expérience et ont varié de  $133.83 \pm 10.05$  à  $172.83 \pm 6.99$  g/L dans le groupe témoin et de  $121.60 \pm 8.73$  à  $167.33 \pm 9.58$  g/L dans le groupe traité.

#### **4.2 Données hémodynamiques :**

Aucune variation significative n'a été observée entre les deux groupes et au cours de l'expérience en ce qui a trait à la fréquence cardiaque (battements/min), à la pression ventriculaire systolique et diastolique (mmHg), au produit de la fréquence cardiaque X la pression ventriculaire systolique / 100, qui représente un indice de la demande métabolique du myocarde, et au débit de l'artère coronaire descendante antérieure gauche (ACDAG).

La fréquence cardiaque a varié entre  $179.55 \pm 6.38$  et  $191.36 \pm 6.5$  battements/min dans le groupe témoin et entre  $185.91 \pm 5.83$  et  $196.82 \pm 6.12$  battements/min dans le groupe traité en cours d'expérience. De même, la pression ventriculaire systolique a varié de  $129.6 \pm 4.55$  à  $148.36 \pm 6.27$  mmHg chez les chiens témoins et de  $130.73 \pm 4.7$  à  $150.45 \pm 4.7$  mmHg chez les chiens traités. Le double produit a également varié de  $243.52 \pm 15.18$  à  $283.76 \pm 14.87$  mm/Hg dans le groupe témoin et de  $249.33 \pm 13.75$  à  $282.49 \pm 15.65$  batt.mmHg/min dans le groupe traité au cours de l'expérience (graphique 4.1). Une réduction du débit coronaire à l'état basal comparativement à 5 heures de reperfusion a été observée dans le groupe témoin  $28.27 \pm 4.23$  vs  $17.61 \pm 3.43$  mL/min et dans le groupe traité  $25.86 \pm 3.84$  vs  $18.00 \pm 2.67$  mL/min. Cette diminution n'est cependant pas significative.

### 4.3 Débits régionaux et collatéraux :

Les débits myocardiques régionaux et collatéraux de tous les chiens étudiés sont résumés dans le graphique 4.2. Les débits collatéraux sub-endocardiques étaient de  $0.035 \pm 0.01$  mL/min/g dans le groupe témoin et de  $0.02 \pm 0.01$  mL/min/g dans le groupe traité (p ns). Dans le mésomyocarde, les débits mesurés étaient de  $0.047 \pm 0.01$  mL/min/g et de  $0.07 \pm 0.01$  mL/min/g (p ns) respectivement dans les groupes témoin et traité. Dans la région sous-épicaudique, les valeurs étaient de  $0.17 \pm 0.044$  mL/min/g chez les chiens témoins et de  $0.21 \pm 0.04$  mL/min/g (p ns) chez les chiens traités. Par ailleurs, le débit collatéral transmural était de  $0.084 \pm 0.019$  mL/min/g et de  $0.1 \pm 0.02$  mL/min/g (p ns) respectivement dans le groupe témoin et le groupe traité.

Dans la zone non-ischémique, les débits endocardiques étaient de  $1.659 \pm 0.202$  mL/min/g dans le groupe témoin et de  $1.77 \pm 0.18$  mL/min/g (p ns) dans le groupe traité. Les débits mésomyocardiques mesurés étaient de  $1.936 \pm 0.213$  mL/min/g et de  $1.91 \pm 0.18$  mL/min/g (p ns) respectivement dans les groupes témoin et traité. Les débits sous-épicaudiques étaient de  $1.719 \pm 0.175$  mL/min/g dans le groupe témoin et de  $1.76 \pm 0.18$  mL/min/g (p ns) dans le groupe traité. D'autre part, les débits transmuraux étaient de  $1.771 \pm 0.191$  mL/min/g et de  $1.81 \pm 0.17$  mL/min/g (p ns) respectivement dans les groupes témoin et traité.

### 4.4 Zone hémorragique :

Dans chacun des deux groupes, l'étendue de la zone hémorragique

impliquait près de 12% du ventricule gauche (témoin :  $13.12 \pm 2.46$  % et traité :  $10.6 \pm 2.13$  %, p ns) (graphique 4.3). L'hémorragie occupait  $29.33 \pm 4.83$  % de la zone à risque dans le groupe témoin et  $23.61 \pm 4.4$  % dans le groupe traité, ces différences ne sont pas significatives. Par rapport à la zone infarctée,  $54.43 \pm 6.6$  % de la surface était hémorragique dans le groupe témoin comparativement à  $46.62 \pm 5.2$  % dans le groupe traité (p ns).

#### **4.5 Zone à risque et taille de l'infarctus :**

Dans chacun des deux groupes, l'étendue de la zone à risque impliquait près de 44% du ventricule gauche (témoin :  $43.5 \pm 2.18$  % et traité :  $44.18 \pm 4.69$  %, p ns) (graphique 4.4). L'infarctus occupait  $52.6 \pm 3.88$  % de la zone à risque dans le groupe témoin et  $47.49 \pm 5.74$  dans le groupe traité, ces différences ne sont pas significatives. Par rapport au ventricule gauche,  $23.17 \pm 2.67$  % était infarcté dans le groupe témoin par rapport à  $21.23 \pm 2.92$  dans le groupe traité (p ns). L'analyse de covariance entre la taille de l'infarctus et le débit collatéral transmural confirme l'absence de différence de l'étendu de l'infarctus entre les deux groupes (graphique 4.5). Toutefois, les courbes de régression du groupe témoin et du groupe traité s'entrecroisent aux valeurs de débit collatéraux de 0.08 mL/min/g suggérant une réponse distincte entre les animaux les plus ischémiques (débits collatéraux < 0.08 mL/min/g) et ceux présentant un débit collatéral supérieur à 0.08 mL/min/g.

Dans le sous-groupe d'animaux présentant un débit collatéral supérieur à 0.08 mL/min/g (témoin : n=6 ; traité : n=6), l'infarctus était respectivement de

48.2 ± 4.04 chez les chiens témoins et de 32.54 ± 4.2 % de la zone à risque ( $p < 0.05$ ) chez les chiens traités (graphique 4.6). La réduction de la taille de l'infarctus dans le sous-groupe traité avec l'énoxaparine est confirmée par l'analyse de covariance entre la taille de l'infarctus et le débit collatéral transmural (graphique 4.7).

#### **4.6 Activité des créatines kinases plasmatiques:**

##### **4.6.1 Créatine kinase :**

L'activité des créatines kinases plasmatiques est résumée dans le tableau 4.7. Si tous les chiens sont considérés dans l'analyse, une augmentation des créatines kinases a été observée lors de la chirurgie comparativement au taux basal de 124 ± 16.78 vs 197 ± 22.33 unités/L dans le groupe témoin et de 145.8 ± 23.68 vs 250.73 ± 26.19 unités/L dans le groupe traité ( $p$  ns). Les créatines kinases sont augmentées après 90 min d'occlusion comparativement à la période pré-occlusion (379.45 ± 33.99 vs 197 ± 22.33 unités/L pour le groupe témoin et 511.55 ± 53.92 vs 250.73 ± 26.19 unités/L pour le groupe traité ( $p$  ns). Une augmentation plus importante a été observée suite à la période de reperfusion. Dans le groupe témoin, après 15 min de reperfusion les valeurs sont de 1469 ± 322.19 unités/L, après 30 min de 2971.27 ± 611.15 unités/L, après 1 hre de 5652.5 ± 1413.26 unités/L, après 3 hres de 11787.55 ± 2511.35 unités/L et 6 hres de 11446.73 ± 2032.36 unités/L. Dans le groupe traité, les CK après 15 min de reperfusion sont de 1552 ± 295.2 unités/L, après 30 min de 3089.91 ± 508.68 unités/L, après 1 hre de

5884.4 ± 1052.76 unités/L, après 3 hres de 11475 ± 1796.28 unités/L et 6 hres de 12485.73 ± 2388.98 unités/L. Aucune différence significative de la libération des CK n'a été observée entre les deux groupes pour ces temps de prélèvements. Toutefois, une libération significativement plus élevée dans le groupe traité a été observée après 24 hres de reperfusion (22052.88 ± 2528.43 unités/L chez les chiens témoins et de 29460.6 ± 4448.6 unités/L chez les chiens traités) et après 48 hres de reperfusion (10407.43 ± 2393.63 unités/L chez les chiens témoins et de 30042.4 ± 4616.47 unités/L chez les chiens traités). Après 72 hres de reperfusion, la quantité de CK dosée chez les chiens traités n'est pas statistiquement différente entre le groupe témoin et le groupe traité (3271.36 ± 1022.68 vs 8207.22 ± 1874.79 unités/L).

L'analyse du sous-groupe de chiens ayant un débit collatéral transmural supérieur à 0.08 mL/min/g révèle des résultats semblables (tableau 4.7). Une augmentation des créatines kinases a été observée lors de la chirurgie comparativement au taux basal de 141 ± 25.6 vs 197.5 ± 34.81 unités/L dans le groupe témoin et de 149.4 ± 37.89 vs 235.83 ± 39.03 unités/L dans le groupe traité (p ns). Les créatines kinases sont augmentées après 90 min d'occlusion comparativement à la période pré-occlusion (415.33 ± 44.74 vs 197.5 ± 34.81 unités/L pour le groupe témoin et 498.17 ± 84.21 vs 235.83 ± 39.03 unités/L pour le groupe traité (p ns). Une augmentation plus importante a été observée suite à la période de reperfusion. Dans le groupe témoin, après 15 min de reperfusion les valeurs sont de 1149 ± 500.95 unités/L, après 30 min de

2327.33 ± 939.89 unités/L, après 1 hre de 4245.17 ± 1772.48 unités/L, après 3 hres de 7418 ± 2159.9 unités/L et 6 hres de 8974.17 ± 2268.47 unités/L. Dans le groupe traité, les CK après 15 min de reperfusion sont de 1046 ± 179.28 unités/L, après 30 min de 1992.5 ± 329.09 unités/L, après 1 hre de 3747.2 ± 444.07 unités/L, après 3 hres de 7725 ± 856.54 unités/L et 6 hres de 8499.83 ± 1080.16 unités/L. Aucune différence significative de la libération des CK n'a été observée à ces temps entre les deux groupes. Toutefois, une libération significativement plus élevée dans le groupe traité a été observée après 24 hres de reperfusion (18242.6 ± 1878.69 unités/L chez les chiens témoins et de 30150.33 ± 4187.64 unités/L chez les chiens traités) et après 48 hres de reperfusion (7090.5 ± 1976.93 unités/L chez les chiens témoins et de 29726.67 ± 6186.71 unités/L chez les chiens traités). De plus, après 72 hres de reperfusion, la quantité de CK dosée chez les chiens traités est statistiquement plus élevée comparativement aux chiens témoins (9592 ± 2246.65 vs 1741.67 ± 431.82 unités/L).

#### **4.6.2 Isoenzyme CK-MB :**

L'activité de l'isoenzyme MB de la créatine kinase (CK-MB) est résumée dans le tableau 4.8. Si tous les chiens sont considérés dans l'analyse, une augmentation des CK-MB a été observée lors de la chirurgie comparativement au taux basal (0.78 ± 0.08 vs 0.73 ± 0.12 µg/L dans le groupe témoin et de 0.91 ± 0.11 vs 0.66 ± 0.05 µg/L dans le groupe traité (p ns). Les CK-MB sont augmentées après 90 min d'occlusion comparativement à la période pré-

occlusion ( $1.35 \pm 0.21$  vs  $0.78 \pm 0.08$   $\mu\text{g/L}$  pour le groupe témoin et  $1.46 \pm 0.24$  vs  $0.91 \pm 0.11$   $\mu\text{g/L}$  pour le groupe traité (p ns). Une augmentation plus importante des CK-MB a été observée dans les 3 première heures de la reperfusion. Dans le groupe témoin, après 15 min de reperfusion les valeurs sont de  $4.62 \pm 0.96$   $\mu\text{g/L}$ , après 30 min de  $9.56 \pm 2.03$   $\mu\text{g/L}$ , après 1 hre de  $21.19 \pm 4.88$   $\mu\text{g/L}$ , après 3 hres de  $35.25 \pm 6.98$   $\mu\text{g/L}$ . Dans le groupe traité, les CK-MB après 15 min de reperfusion sont de  $4.88 \pm 1.18$   $\mu\text{g/L}$ , après 30 min de  $9.75 \pm 2.11$   $\mu\text{g/L}$ , après 1 hre de  $17.69 \pm 3.12$   $\mu\text{g/L}$ , après 3 hres de  $30 \pm 4.53$   $\mu\text{g/L}$  et 6 hres de  $24.65 \pm 4.55$   $\mu\text{g/L}$ . Aucune différence significative de la libération des CK n'a été observée entre les deux groupes pour ces temps de prélèvements. Une diminution de la libération des CK-MB a été observé dans les deux groupes à partir de 6 heures de reperfusion et s'est poursuivi jusqu'à 72 heures. Dans le groupe témoin à 6 hres de reperfusion les valeurs étaient de  $27.48 \pm 5$   $\mu\text{g/L}$ , à 24 hres de  $13.11 \pm 2.62$   $\mu\text{g/L}$ , à 48 hres de  $7.73 \pm 1.92$   $\mu\text{g/L}$  et à 72 hres de  $2.91 \pm 0.79$ . Dans le groupe traité, à 6 hres de reperfusion les valeurs étaient de  $24.65 \pm 4.55$   $\mu\text{g/L}$ , à 24 hres de  $14.64 \pm 2.15$   $\mu\text{g/L}$ , à 48 hres de  $10.84 \pm 2.47$   $\mu\text{g/L}$  et à 72 hres de  $3.41 \pm 1.22$ . Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes.

L'analyse du sous-groupe de chiens ayant un débit collatéral transmural supérieur à  $0.08$  mL/min/g révèle des résultats semblables (tableau 4.8). Une augmentation des créatines kinases MB a été observée lors de la chirurgie comparativement au taux basal de  $0.68 \pm 0.08$  vs  $0.62 \pm 0.02$   $\mu\text{g/L}$  dans le

groupe témoin et de  $0.78 \pm 0.11$  vs  $0.60 \pm 0$   $\mu\text{g/L}$  dans le groupe traité (p ns). Les créatines kinases sont augmentées après 90 min d'occlusion comparativement à la période pré-occlusion ( $1.18 \pm 0.25$  vs  $0.68 \pm 0.08$   $\mu\text{g/L}$  pour le groupe témoin et  $1.52 \pm 0.41$  vs  $0.78 \pm 0.11$   $\mu\text{g/L}$  pour le groupe traité (p ns). Une augmentation plus importante a été observée suite aux 3 premières heures de reperfusion. Dans le groupe témoin, après 15 min de reperfusion les valeurs sont de  $3.26 \pm 1.25$   $\mu\text{g/L}$ , après 30 min de  $6.67 \pm 2.59$   $\mu\text{g/L}$ , après 1 hre de  $13.6 \pm 5.57$   $\mu\text{g/L}$  et après 3 hres de  $26.72 \pm 7.65$   $\mu\text{g/L}$ . Dans le groupe traité, les CK-MB après 15 min de reperfusion sont de  $3.13 \pm 0.77$   $\mu\text{g/L}$ , après 30 min de  $5.98 \pm 1.44$   $\mu\text{g/L}$ , après 1 hre de  $10.88 \pm 2.19$  unités/L et après 3 hres de  $21.43 \pm 4.2$   $\mu\text{g/L}$ . Aucune différence significative de la libération des CK n'a été observée à ces temps entre les deux groupes. Une diminution de la libération des CK-MB a été observé dans les deux groupes à partir de 6 heures de reperfusion et s'est poursuivi jusqu'à 72 heures. Dans le groupe témoin à 6 hres de reperfusion les valeurs étaient de  $23.15 \pm 7.61$   $\mu\text{g/L}$ , à 24 hres de  $9.2 \pm 1.13$   $\mu\text{g/L}$ , à 48 hres de  $4.2 \pm 1.04$   $\mu\text{g/L}$  et à 72 hres de  $2.02 \pm 1.18$   $\mu\text{g/L}$ . Dans le groupe traité, à 6 hres de reperfusion les valeurs étaient de  $16.77 \pm 3.15$   $\mu\text{g/L}$ , à 24 hres de  $14.97 \pm 3.32$   $\mu\text{g/L}$ , à 48 hres de  $12.12 \pm 3.74$   $\mu\text{g/L}$  et à 72 hres de  $4.32 \pm 1.71$ . Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes.

#### **4.7 Troponine I :**

L'activité de la troponine I est résumée dans le tableau 4.9. Si tous les

chiens sont considérés dans l'analyse, la troponine I est resté inchangée dans les deux groupes suivant la chirurgie. Des valeurs de  $0.5 \pm 0$  et  $0.55 \pm 0.05$   $\mu\text{g/L}$  (pré et post-chirurgie) ont été mesurées dans le groupe témoin et des valeurs de  $0.5 \pm 0$  et  $0.51 \pm 0.01$   $\mu\text{g/L}$  (pré et post-chirurgie) ont été mesurées dans le groupe traité (p ns). Après 90 minutes d'occlusion, les valeurs de troponine I ont été augmentées à  $1.18 \pm 0.16$   $\mu\text{g/L}$  dans le groupe témoin et à  $1.79 \pm 0.63$  dans le groupe traité (p ns). Une augmentation plus marquée a été mesurée lors de 3 premières heures de la reperfusion chez les chiens témoins. Après 15 min, les valeurs étaient de  $9.61 \pm 3.17$   $\mu\text{g/L}$ , après 30 min de  $27.09 \pm 6.99$   $\mu\text{g/L}$ , après 1 hre de  $173.53 \pm 62.68$   $\mu\text{g/L}$  et après 3 hres de  $868.06 \pm 286.3$   $\mu\text{g/L}$ . Dans le groupe traité, un accroissement a été observée pendant les 6 premières heures. A 15 min de reperfusion elles étaient de  $11.86 \pm 3.52$   $\mu\text{g/L}$ , à 30 min de  $40.36 \pm 10.06$   $\mu\text{g/L}$ , à 1 hre de  $131.7 \pm 38.06$   $\mu\text{g/L}$ , à 3 hres de  $578.32 \pm 196.37$   $\mu\text{g/L}$  et à 6 hres de  $746.94 \pm 230.48$   $\mu\text{g/L}$ . Aucune différence significative n'a été démontrée entre les deux groupes étudiés à ces temps de prélèvement. Une diminution progressive de la libération des troponines I est observée jusqu'à 72 heures de reperfusion. Dans le groupe témoin, à 6 hres de reperfusion elles étaient de  $604 \pm 151.97$   $\mu\text{g/L}$ , à 24 hres de  $587.28 \pm 105.49$   $\mu\text{g/L}$ , à 48 hres de  $430.17 \pm 133.19$  et à 72 hres de  $207.87 \pm 39.01$   $\mu\text{g/L}$ . Dans le groupe traité, à 24 hres de reperfusion les valeurs de troponines I étaient de  $475.71 \pm 78.48$   $\mu\text{g/L}$ , à 48 hres de  $365.95 \pm 69.51$  et à 72 hres de  $181.49 \pm 37.16$   $\mu\text{g/L}$ . Aucune différence significative n'a été

observée entre les deux groupes pour ces temps de prélèvements.

L'analyse du sous-groupe de chiens ayant un débit collatéral transmural supérieur à 0.08 mL/min/g révèle des résultats semblables (tableau 4.9). La troponine I est resté inchangée dans les deux groupes suivant la chirurgie. Des valeurs de  $0.5 \pm 0$  et  $0.5 \pm 0$   $\mu\text{g/L}$  (pré et post-chirurgie) ont été mesurées dans le groupe témoin et des valeurs de  $0.5 \pm 0$  et  $0.52 \pm 0.02$   $\mu\text{g/L}$  (pré et post-chirurgie) ont été mesurées dans le groupe traité (p ns). Après 90 minutes d'occlusion, les valeurs de troponine I ont été augmentées à  $1.3 \pm 0.23$   $\mu\text{g/L}$  dans le groupe témoin et à  $2.3 \pm 1.1$  dans le groupe traité (p ns). Une augmentation plus marquée a été mesurée lors des 24 premières heures de la reperfusion chez les chiens témoins. Après 15 min, les valeurs étaient de  $5.1 \pm 2.91$   $\mu\text{g/L}$ , après 30 min de  $23.48 \pm 12.4$   $\mu\text{g/L}$ , après 1 hre de  $92.95 \pm 51.65$   $\mu\text{g/L}$  et après 3 hres de  $336.03 \pm 165.3$   $\mu\text{g/L}$ . Dans le groupe traité, un accroissement a été observée pendant les 6 premières heures. A 15 min de reperfusion elles étaient de  $7.95 \pm 3.65$   $\mu\text{g/L}$ , à 30 min de  $25.13 \pm 8.91$   $\mu\text{g/L}$ , à 1 hre de  $72.7 \pm 25.87$   $\mu\text{g/L}$ , à 3 hres de  $369.07 \pm 108.51$   $\mu\text{g/L}$  et à 6 hres de  $545.42 \pm 129.54$   $\mu\text{g/L}$ . Aucune différence significative n'a été démontrée entre les deux groupes étudiés à ces temps de prélèvement. Par la suite, une diminution progressive de la libération des troponines I est observée jusqu'à 72 heures de reperfusion. Dans le groupe témoin, à 48 hres de reperfusion elles étaient de  $287.18 \pm 87.05$   $\mu\text{g/L}$  et à 72 hres de  $147.77 \pm 32.59$   $\mu\text{g/L}$ . Dans le groupe traité, à 24 hres de reperfusion les valeurs de troponines I étaient de

367.52 ± 93.32 µg/L, à 48 hres de 225.33 ± 48.26 et à 72 hres de 125.93 ± 24.41 µg/L. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes à ces temps de prélèvements.

#### **4.8 Les tests de coagulation :**

##### **4.8.1 Temps de thromboplastine partiellement activé (aPTT) :**

Les mesures de l'aPTT sont résumées dans le tableau 4.10. Si tous les chiens sont inclus dans l'analyse, les valeurs oscillaient entre 10.16 ± 0.32 et 10.84 ± 0.60 sec dans le groupe témoin et de 11.11 ± 0.32 et 14.7 ± 1.24 sec dans le groupe traité. Les mesures de l'aPTT ont été statistiquement plus élevées dans le groupe traité à l'énoxaparine comparativement au groupe témoin à 24 et 48 heures de reperfusion. Les valeurs mesurées étaient de 13.07 ± 0.41 vs 10.84 ± 0.60sec et de 14.7 ± 1.24 vs 11.79 ± 0.56 sec. Dans l'analyse du sous-groupe, les valeurs n'ont pas été significativement différentes. Dans le groupe témoin, elles ont oscillé de 10.22 ± 0.50 à 12.43 ± 0.66 sec tandis que dans le groupe traité elles ont varié de 10.85 ± 0.81 à 14.72 ± 2.1 sec.

##### **4.8.2 Activité anti-Xa :**

Les dosages de l'activité anti-Xa sont exposés dans le tableau 4.11. Si tous les chiens sont inclus dans l'analyse, les valeurs ont varié entre 0.13 ± 0.01 et 0.19 ± 0.06 unité/mL dans le groupe témoin et de 0.32 ± 0.18 et 1.61 ± 0.12 unités/mL dans le groupe traité. L'activité anti-Xa a été statistiquement plus élevée dans le groupe traité à l'énoxaparine comparativement au groupe

témoin à tous les temps de reperfusion. Le groupe témoin comparativement au groupe traité, présentait des valeurs de  $0.17 \pm 0.02$  vs  $1.61 \pm 0.12$  unités/mL à 3 hres de reperfusion, de  $0.17 \pm 0.03$  vs  $1.15 \pm 0.13$  unités/mL à 6 hres, de  $0.13 \pm 0.01$  vs  $1.36 \pm 0.12$  à 24 hres et de  $0.19 \pm 0.06$  vs  $1.1 \pm 0.14$  unités/mL à 72 hres.

Dans l'analyse du sous-groupe, l'activité anti-Xa à la reperfusion a également été significativement plus élevées dans le groupe traité comparativement au groupe témoin (tableau 4.11). Le groupe témoin comparativement au groupe traité, présentait des valeurs de  $0.2 \pm 0.02$  vs  $1.65 \pm 0.2$  unités/mL à 3 hres de reperfusion, de  $0.2 \pm 0.04$  vs  $1 \pm 0.18$  unités/mL à 6 hres, de  $0.14 \pm 0.01$  vs  $1.38 \pm 0.16$  à 24 hres et de  $0.16 \pm 0.04$  vs  $1.15 \pm 0.19$  unités/mL à 72 hres.

	Témoins (moyenne ± SEM)		Traités (Énoxaparine)(moyenne ± SEM)	
	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)
Pré-anesthésie:	10,59 ± 0,92	11,26 ± 1,16	13,57 ± 0,92 *	12,36 ± 0,59
Pré-occlusion:	7,79 ± 0,90	7,99 ± 1,16	9,89 ± 0,77	9,32 ± 0,74
Occlusion:				
85 min	9,33 ± 1,03	9,71 ± 1,39	10,90 ± 1,45	9,06 ± 1,47
Reperfusion:				
3 hres	15,21 ± 1,77	14,62 ± 2,02	19,44 ± 1,98	16,21 ± 1,10
6 hres	18,33 ± 1,99	17,20 ± 3,14	23,89 ± 2,54	22,79 ± 2,10
24 hres	24,05 ± 2,10	25,77 ± 3,19	31,79 ± 2,27 *	28,78 ± 2,06
48 hres	23,04 ± 1,76	24,05 ± 2,70	25,65 ± 2,50	24,07 ± 1,38
72 hres	16,67 ± 2,13	18,31 ± 3,85	19,06 ± 1,96	16,45 ± 1,06

Tableau 4.4: Compte plaquettaire (X 10<sup>9</sup>/L) au cours de l'expérience

	Témoins (moyenne ± SEM)		Traités (Énoxaparine)(moyenne ± SEM)	
	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)
Pré-anesthésie:	257,27 ± 22,70	288,00 ± 20,91	265,82 ± 15,51	244,00 ± 17,77
Pré-occlusion:	250,09 ± 20,38	268,50 ± 18,77	243,55 ± 14,42	228,50 ± 19,16
Occlusion:				
85 min	231,64 ± 20,53	261,33 ± 15,90	248,70 ± 11,06	230,83 ± 11,88
Reperfusion:				
3 hres	232,80 ± 21,42	259,67 ± 16,33	239,10 ± 10,04	231,83 ± 11,69
6 hres	233,44 ± 14,59	233,80 ± 14,66	243,50 ± 11,75	233,67 ± 13,47
24 hres	159,38 ± 19,28	186,00 ± 7,62	152,90 ± 8,58	168,00 ± 6,65
48 hres	140,86 ± 27,33	155,75 ± 27,76	115,78 ± 7,65	130,20 ± 5,23
72 hres	155,09 ± 16,81	158,50 ± 8,66	109,50 ± 12,37 *	118,40 ± 16,80

\*\* Sous-groupe: Chiens avec un débit collatéral transmurale supérieur à 0.08 mL/min/g  
 \* p < 0.05 vs groupe témoin

**Tableau 4.5: Pourcentage d'hématocrite au cours de l'expérience**

	Témoins (moyenne ± SEM)		Traités (Énoxaparine) (moyenne ± SEM)	
	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)
Pré-anesthésie:	49 ± 0,03	51 ± 0,02	49 ± 0,02	49 ± 0,03 *
Pré-occlusion:	45 ± 0,02	45 ± 0,02	45 ± 0,01	46 ± 0,01 *
Occlusion:				
85 min	44 ± 0,01	44 ± 0,02	45 ± 0,01 *	45 ± 0,02 *
Reperfusion:				
3 hres	42 ± 0,01	42 ± 0,01	42 ± 0,01	41 ± 0,02 *
6 hres	44 ± 0,02	41 ± 0,02	45 ± 0,02 *	44 ± 0,03 *
24 hres	44 ± 0,01	45 ± 0,01	39 ± 0,02 *	40 ± 0,03 *
48 hres	41 ± 0,01	41 ± 0,01	38 ± 0,02 *	39 ± 0,03 *
72 hres	36 ± 0,01	37 ± 0,02	36 ± 0,02	35 ± 0,02 *

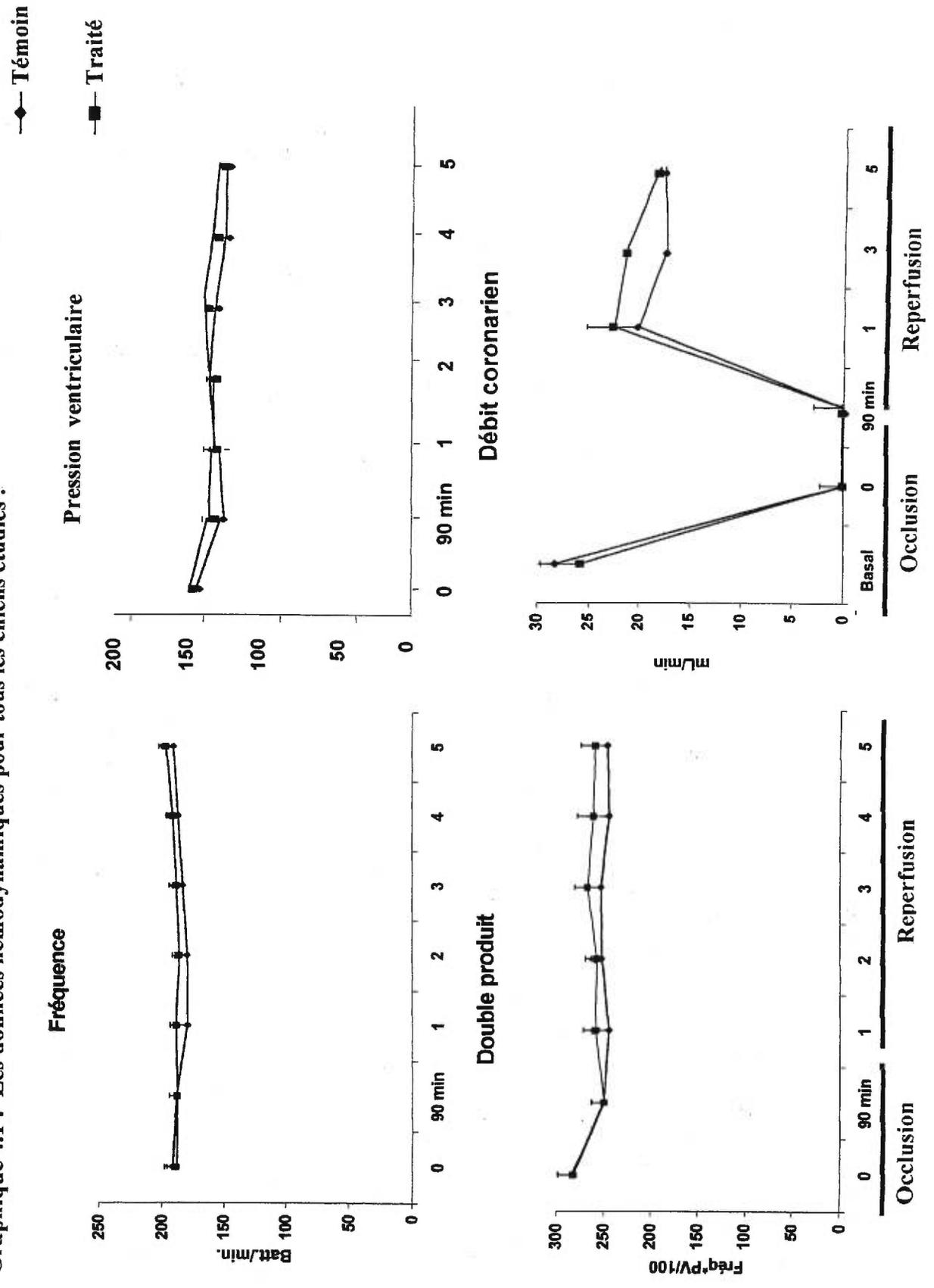
**Tableau 4.6: Hémoglobine (g/L) au cours de l'expérience**

	Témoins (moyenne ± SEM)		Traités (Énoxaparine) (moyenne ± SEM)	
	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)
Pré-anesthésie:	166,27 ± 9,64	172,83 ± 6,99	166,64 ± 5,14	167,33 ± 9,58
Pré-occlusion:	147,82 ± 9,63	152,00 ± 7,10	151,50 ± 3,11	156,20 ± 3,62
Occlusion:				
85 min	143,91 ± 8,40	149,00 ± 5,82	149,40 ± 4,15	151,17 ± 6,58
Reperfusion:				
3 hres	138,30 ± 7,05	141,17 ± 5,24	143,80 ± 4,47	141,67 ± 7,04
6 hres	147,78 ± 7,65	137,00 ± 9,17	153,10 ± 5,86	150,33 ± 9,63
24 hres	141,13 ± 8,16	150,60 ± 4,43	129,10 ± 6,97	134,00 ± 10,75
48 hres	136,71 ± 3,12	138,25 ± 5,66	128,33 ± 6,48	133,80 ± 10,46
72 hres	127,91 ± 6,17	133,83 ± 10,05	121,25 ± 7,39	121,60 ± 8,73

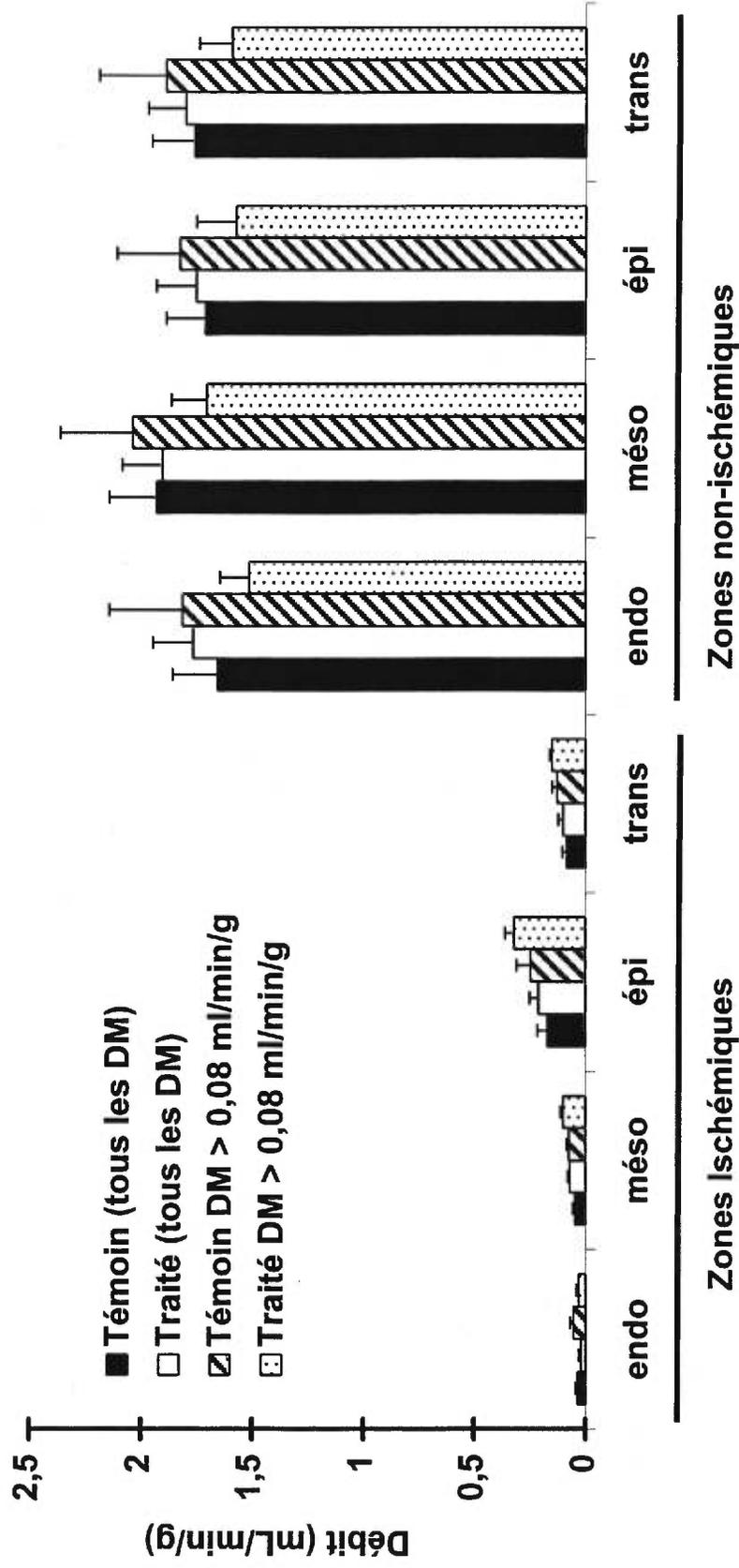
\*\* Sous-groupe: Chiens avec un débit collatéral transmurale supérieur à 0.08 mL/min/g

\* p < 0.05 vs groupe témoin

Graphique 4.1 : Les données hémodynamiques pour tous les chiens étudiés :

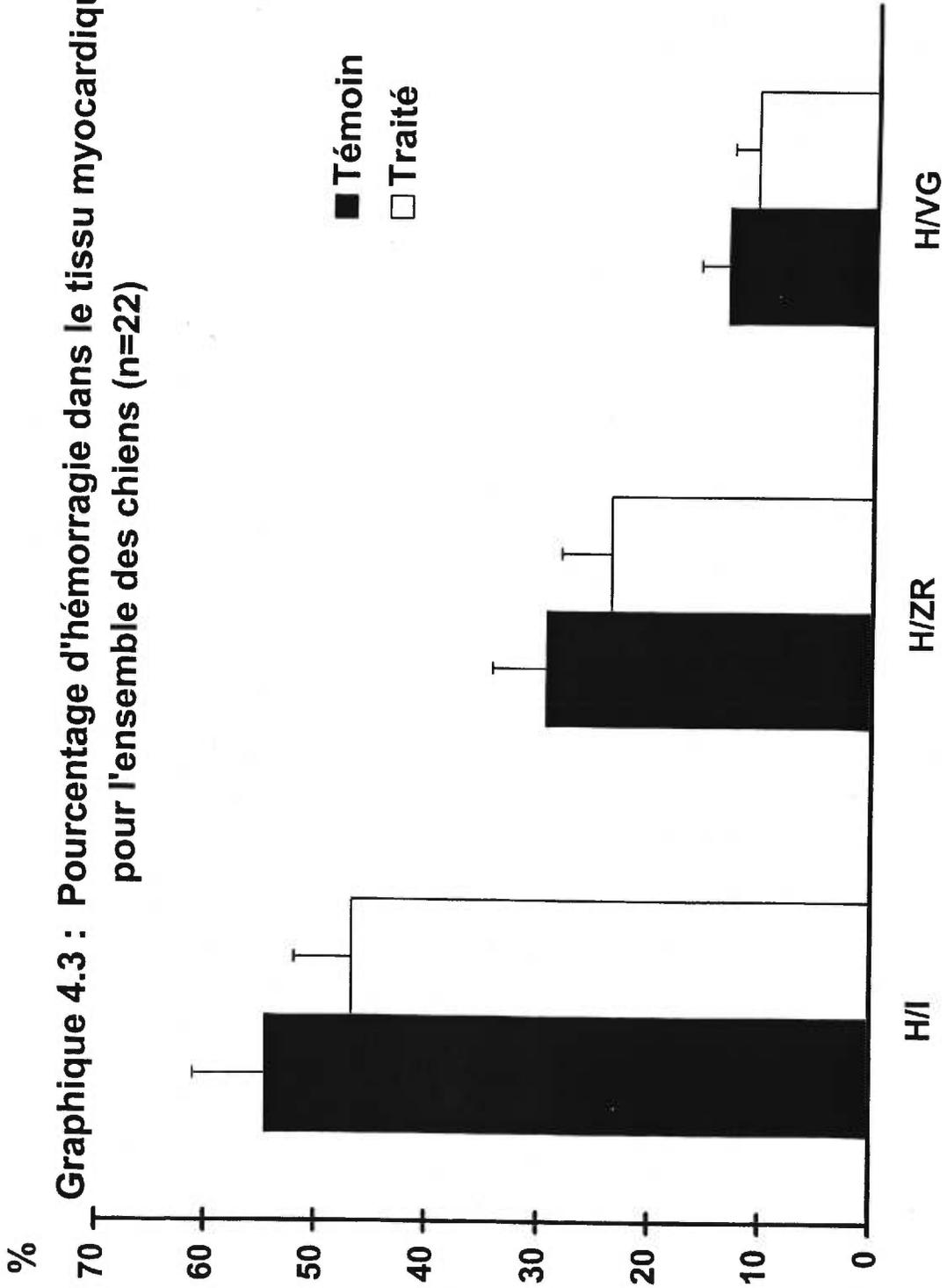


Graphique 4,2: Débit sanguin mesuré dans le tissu myocardique

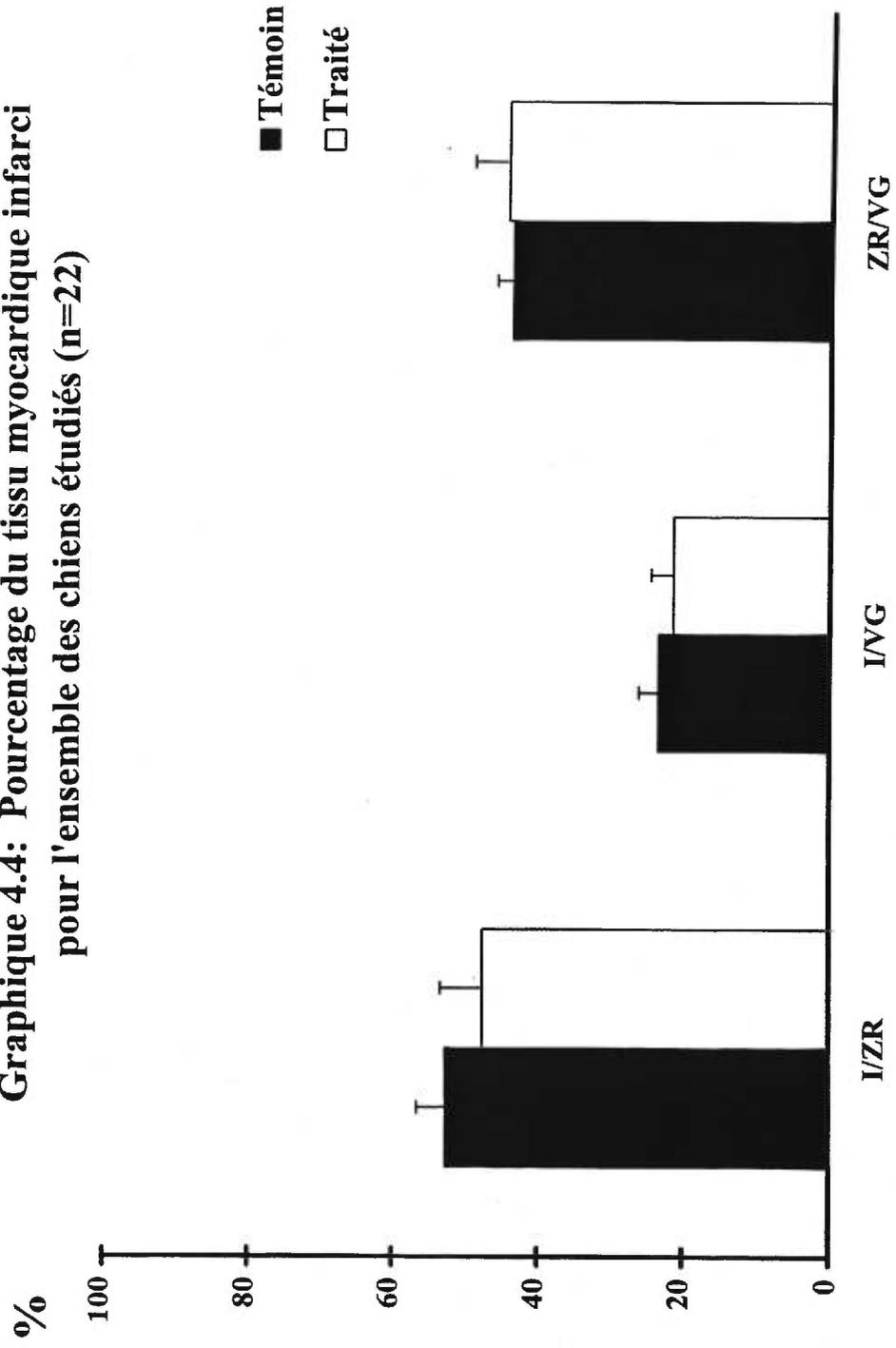


\* DM: débit myocardique

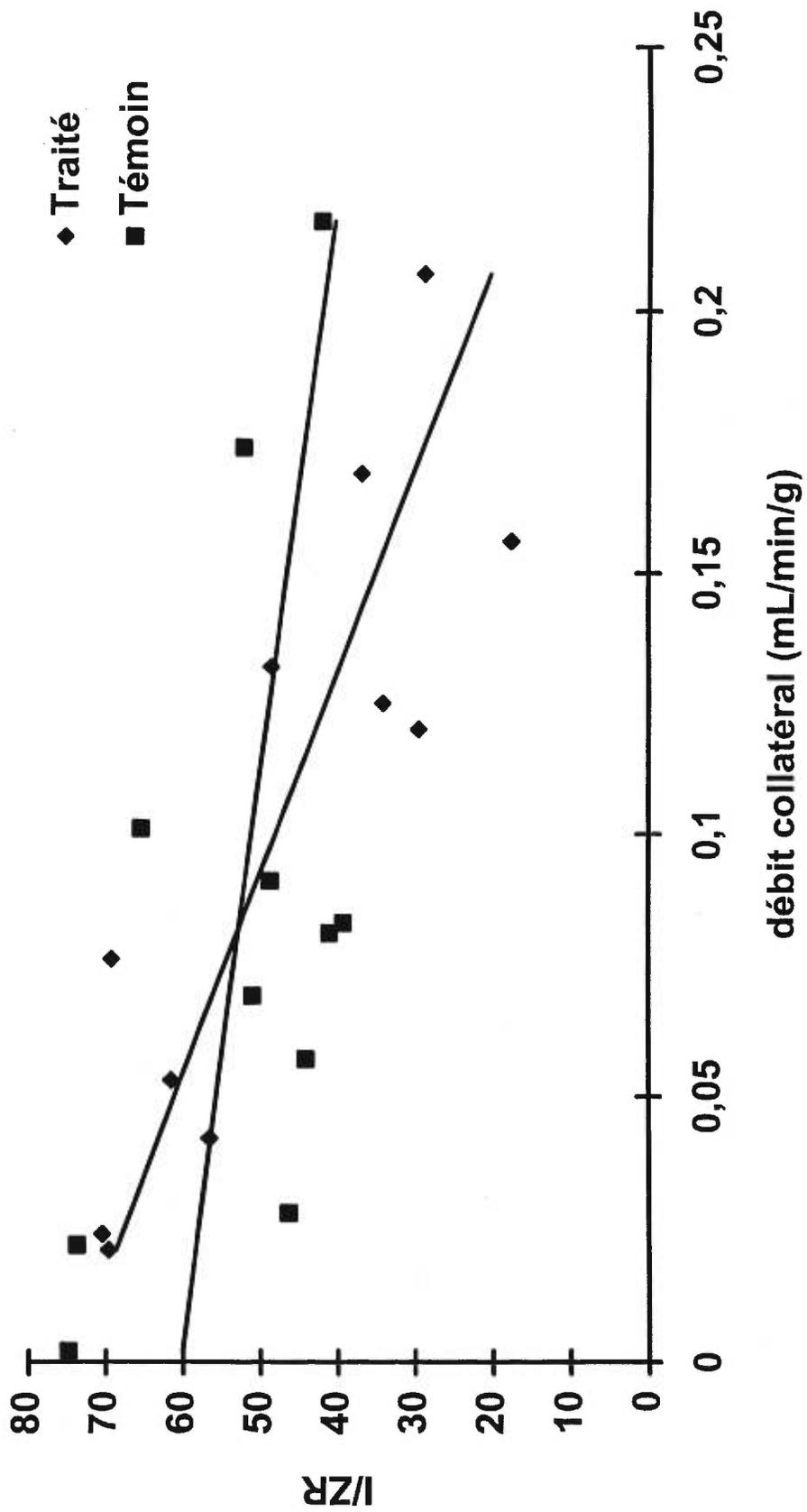
Graphique 4.3 : Pourcentage d'hémorragie dans le tissu myocardique pour l'ensemble des chiens (n=22)



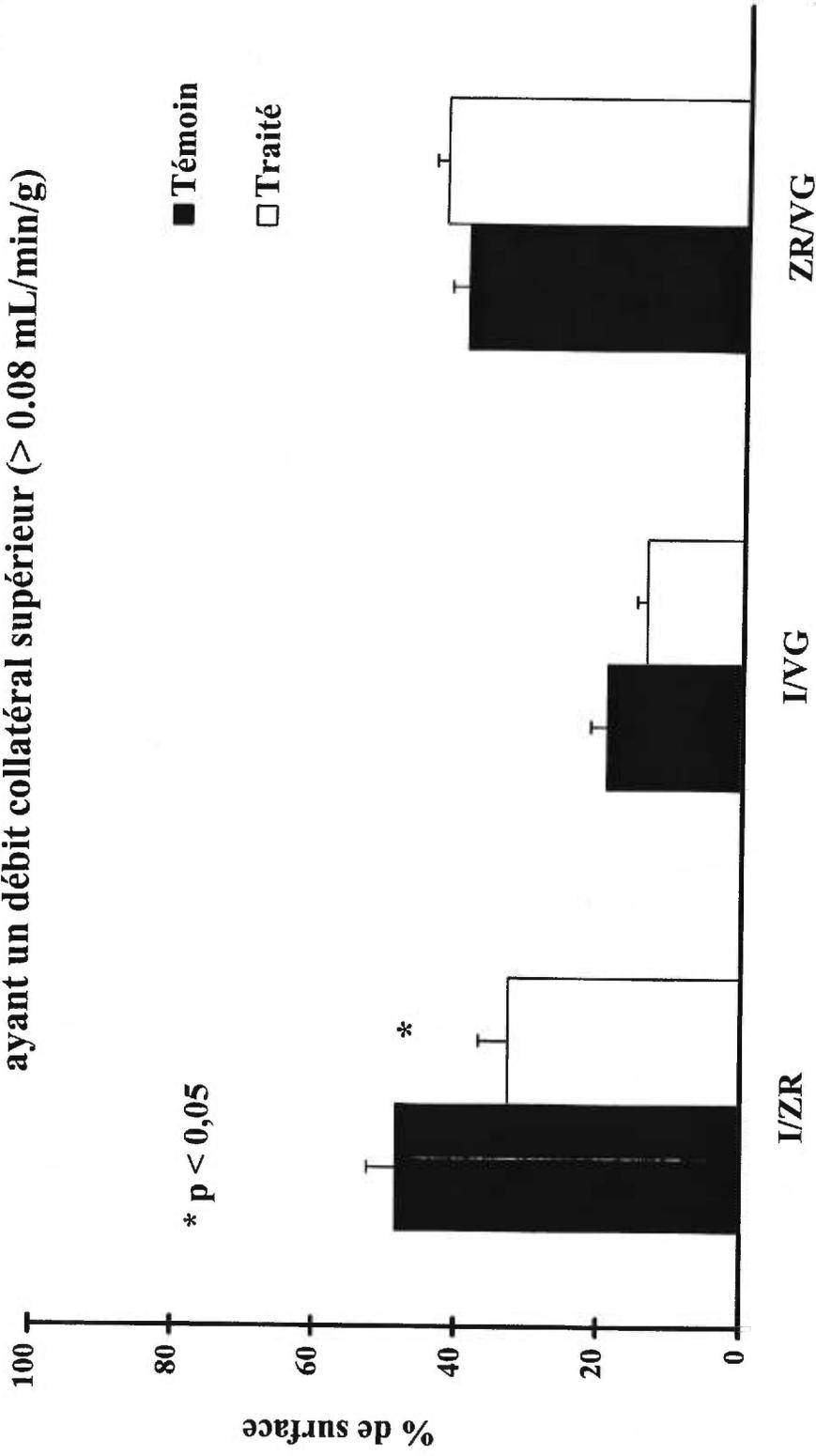
**Graphique 4.4: Pourcentage du tissu myocardique infarcté pour l'ensemble des chiens étudiés (n=22)**



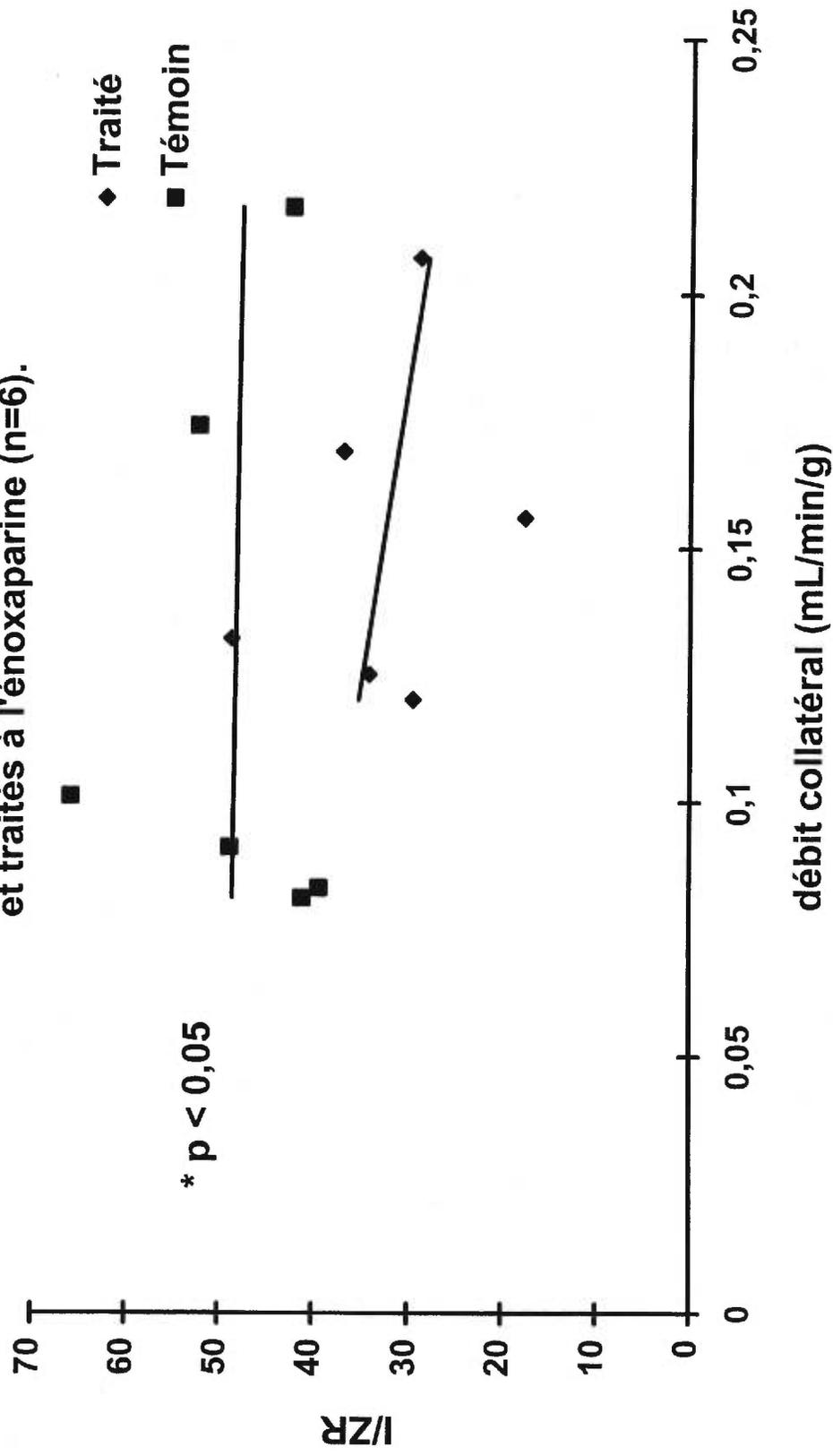
**Graphique 4.5: Corrélation entre la taille de l'infarctus et le débit collatéral transmurale chez les chiens témoins (n=11) et traités à l'énoxaparine (n=11).**



**Graphique 4.6: Pourcentage du tissu myocardique infarci chez les chiens ayant un débit collatéral supérieur ( $> 0.08$  mL/min/g)**



**Graphique 4.7: Corrélation entre la taille de l'infarctus et le débit collatéral transmurale ( $> 0.08 \text{ mL/min/g}$ ) chez les chiens témoins ( $n=6$ ) et traités à l'énoxaparine ( $n=6$ ).**



**Tableau 4.7: Activité de la créatine kinase plasmatique (Unités/L)**

	Témoins		Traités (Énoxaparine)	
	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)
Avant chirurgie:	124 ± 16,78	141 ± 25,6	145,8 ± 23,68	149,4 ± 37,89
Pré-occlusion:	197 ± 22,33	197,5 ± 34,81	250,73 ± 26,19	235,83 ± 39,03
Occlusion:				
45 min	304,36 ± 31,9	300,33 ± 38,03	393,91 ± 45,92	393,67 ± 72,76
90 min	379,45 ± 33,99	415,33 ± 44,74	511,55 ± 53,92	498,17 ± 84,21
Reperfusion:				
15 min	1469 ± 322,19	1149 ± 500,95	1552 ± 295,2	1046 ± 179,28
30 min	2971,27 ± 611,15	2327,33 ± 939,89	3089,91 ± 508,68	1992,5 ± 329,09
1 hre	5652,5 ± 1413,26	4245,17 ± 1772,48	5884,4 ± 1052,76	3747,2 ± 444,07
3 hres	11787,55 ± 2511,35	7418 ± 2159,9	11475 ± 1796,28	7725 ± 856,54
6 hres	11446,73 ± 2032,36	8974,17 ± 2268,47	12485,73 ± 2388,98	8499,83 ± 1080,16
24 hres	22052,88 ± 2528,43	18242,6 ± 1878,69	29460,6 ± 4448,6 *	30150,33 ± 4187,64 *
48 hres	10407,43 ± 2393,63	7090,5 ± 1976,93	30042,4 ± 4616,47 *	29726,67 ± 6186,71 *
72 hres	3271,36 ± 1022,68	1741,67 ± 431,82	8207,22 ± 1874,79	9592 ± 2246,65 *

\*\* Sous-groupe: Chiens avec un débit collatéral transmural supérieur à 0.08 mL/min/g

\* p < 0.05 vs groupe témoin

**Tableau 4.8: Activité de la créatine kinase MB ( $\mu\text{g/L}$ )**

	Témoins		Traités (Énoxaparine)	
	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)
Avant chirurgie:	0,73 $\pm$ 0,12	0,62 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,05	0,6 $\pm$ 0
Pré-occlusion:	0,78 $\pm$ 0,08	0,68 $\pm$ 0,08	0,91 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,11
Occlusion:				
45 min	0,88 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,25	1,32 $\pm$ 0,43
90 min	1,35 $\pm$ 0,21	1,18 $\pm$ 0,25	1,46 $\pm$ 0,24	1,52 $\pm$ 0,41
Reperfusion:				
15 min	4,62 $\pm$ 0,96	3,26 $\pm$ 1,25	4,88 $\pm$ 1,18	3,13 $\pm$ 0,77
30 min	9,56 $\pm$ 2,03	6,67 $\pm$ 2,59	9,75 $\pm$ 2,11	5,98 $\pm$ 1,44
1 hre	21,19 $\pm$ 4,88	13,6 $\pm$ 5,57	17,69 $\pm$ 3,12	10,88 $\pm$ 2,19
3 hres	35,25 $\pm$ 6,98	26,72 $\pm$ 7,65	30 $\pm$ 4,53	21,43 $\pm$ 4,2
6 hres	27,48 $\pm$ 5	23,15 $\pm$ 7,61	24,65 $\pm$ 4,55	16,77 $\pm$ 3,15
24 hres	13,11 $\pm$ 2,62	9,2 $\pm$ 1,13	14,64 $\pm$ 2,15	14,97 $\pm$ 3,32
48 hres	7,73 $\pm$ 1,92	4,2 $\pm$ 1,04	10,84 $\pm$ 2,47	12,12 $\pm$ 3,74
72 hres	2,91 $\pm$ 0,79	2,02 $\pm$ 1,18	3,41 $\pm$ 1,22	4,32 $\pm$ 1,71

\*\* Sous-groupe: Chiens avec un débit collatéral transmurale supérieur à 0.08 mL/min/g

\* p < 0.05 vs groupe témoin

**Tableau 4.9: Dosage de la troponine I ( $\mu\text{g/L}$ )**

	Témoins		Traités (Énoxaparine)	
	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)
Avant chirurgie:	0,5 $\pm$ 0	0,5 $\pm$ 0	0,5 $\pm$ 0	0,5 $\pm$ 0
Pré-occlusion:	0,55 $\pm$ 0,05	0,5 $\pm$ 0	0,51 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,02
Occlusion:				
45 min	0,56 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,34	1,43 $\pm$ 0,59
90 min	1,18 $\pm$ 0,16	1,3 $\pm$ 0,23	1,79 $\pm$ 0,63	2,3 $\pm$ 1,1
Reperfusion:				
15 min	9,61 $\pm$ 3,17	5,1 $\pm$ 2,91	11,86 $\pm$ 3,52	7,95 $\pm$ 3,65
30 min	27,09 $\pm$ 6,99	23,48 $\pm$ 12,4	40,36 $\pm$ 10,06	25,13 $\pm$ 8,91
1 hre	173,53 $\pm$ 62,68	92,95 $\pm$ 51,65	131,7 $\pm$ 38,06	72,7 $\pm$ 25,87
3 hres	868,06 $\pm$ 286,3	336,03 $\pm$ 165,3	578,32 $\pm$ 196,37	369,07 $\pm$ 108,51
6 hres	604 $\pm$ 151,97	300 $\pm$ 79,96	746,94 $\pm$ 230,48	545,42 $\pm$ 129,54
24 hres	587,28 $\pm$ 105,49	491,34 $\pm$ 121,08	476,71 $\pm$ 78,48	367,52 $\pm$ 93,32
48 hres	430,17 $\pm$ 133,19	287,18 $\pm$ 87,05	365,95 $\pm$ 69,51	225,33 $\pm$ 48,26
72 hres	207,87 $\pm$ 39,01	147,77 $\pm$ 32,59	181,49 $\pm$ 37,16	125,93 $\pm$ 24,41

\*\* Sous-groupe: Chiens avec un débit collatéral transmurale supérieur à 0.08 mL/min/g

\* p < 0.05 vs groupe témoin

**Tableau 4.10 : Temps de thromboplastine partiellement activé (aPTT: sec) mesuré au cours de l'expérience**

	Témoins (moyenne $\pm$ SEM)		Traités (Énoxaparine) (moyenne $\pm$ SEM)	
	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)
Occlusion:				
85 min	10,16 $\pm$ 0,32	10,22 $\pm$ 0,50	11,23 $\pm$ 1,26	12,55 $\pm$ 2,23
Reperfusion:				
3 hres	10,8 $\pm$ 0,61	10,58 $\pm$ 0,81	11,11 $\pm$ 0,32	11,22 $\pm$ 0,54
6 hres	10,2 $\pm$ 0,44	10,6 $\pm$ 0,82	11,21 $\pm$ 0,46	10,85 $\pm$ 0,81
24 hres	10,84 $\pm$ 0,60	11,12 $\pm$ 0,86	13,07 $\pm$ 0,41 *	13,08 $\pm$ 0,65
48 hres	11,79 $\pm$ 0,56	12,43 $\pm$ 0,66	14,7 $\pm$ 1,24 *	14,72 $\pm$ 2,1
72 hres	11,5 $\pm$ 0,43	11,06 $\pm$ 0,57	12,14 $\pm$ 0,7	12,6 $\pm$ 0,41

\*\* Sous-groupe: Chiens avec un débit collatéral transmurale supérieur à 0.08 mL/min/g

\* p < 0.05 vs groupe témoin

**Tableau 4.11 : Dosage de l'activité anti-Xa (unités/mL) mesurée au cours de l'expérience**

	Témoins (moyenne ± SEM)		Traités (Énoxaparine) (moyenne ± SEM)	
	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)	Tous (n=11)	** Sous-groupe (n=6)
Occlusion:				
85 min	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,32 ± 0,18	0,47 ± 0,34
Reperfusion:				
3 hres	0,17 ± 0,02	0,2 ± 0,02	1,61 ± 0,12 *	1,65 ± 0,2 *
6 hres	0,17 ± 0,03	0,2 ± 0,04	1,15 ± 0,13 *	1 ± 0,18 *
24 hres	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	1,36 ± 0,12 *	1,38 ± 0,16 *
48 hres	0,19 ± 0,06	0,16 ± 0,04	1,1 ± 0,14 *	1,15 ± 0,19 *

\*\* Sous-groupe: Chiens avec un débit collatéral transmurale supérieur à 0.08 mL/min/g

\* p < 0.05 vs groupe témoin

## Chapitre 5 :

### Discussion

Une étude antérieure <sup>218</sup> a démontré que l'injection intraveineuse d'énoxaparine au moment de la reperfusion réduit d'environ 50% la taille de l'infarctus dans un modèle canin d'ischémie (90 min) / reperfusion (6 hres) myocardique. Cette cardioprotection a été associée à la réduction de l'infiltration des neutrophiles dans le myocarde reperfusé, liée à l'interaction de l'énoxaparine avec la P-sélectine. Les résultats de la présente étude confirment les propriétés cardioprotectrices de l'énoxaparine en cours de reperfusion qui se sont traduites par une réduction soutenue ou permanente de la taille de l'infarctus de 35% ( $p < 0.05$ ) suivant une reperfusion prolongée de 72 heures.

Toutefois, cette diminution de la taille de l'infarctus chez les chiens traités a été observée seulement pour les chiens présentant un flot collatéral supérieur ( $> 0.08$  mL/min/g), donc présentant des atteintes ischémiques moins sévères. Une telle observation a également été documentée dans un modèle de reperfusion prolongée <sup>331</sup>, indiquant qu'une ischémie trop sévère lors de l'occlusion est probablement associée à un endommagement irréversible du myocarde qui ne peut être récupéré lors de la reperfusion.

Au cours de cette étude, l'étendue de la zone à risque (zone ischémique) était comparable entre le groupe traité et témoin et représentait environ 44% du ventricule gauche. Les débits collatéraux transmuraux présents dans le tissu ischémique étaient également comparables entre les

deux groupes et s'élevaient en moyenne à 0.09 mL/min/g pour l'ensemble des chiens étudiés. Une réduction non significative de 9.8% de la taille de l'infarctus (% de la zone à risque) chez les chiens traités à l'énoxaparine comparativement aux chiens témoins a été mesurée pour l'ensemble des chiens étudiés. Par contre, l'analyse effectuée pour les chiens possédant des débits collatéraux supérieurs à 0.08 mL/min/g, indique que l'énoxaparine réduit significativement la taille de l'infarctus de 32.5% comparativement aux chiens témoins. L'existence d'un apport sanguin dans les régions ischémiques est un déterminant inversement proportionnel à la taille de l'infarctus <sup>61,66</sup>. De plus, les bienfaits de la reperfusion sont limités aux cellules réversiblement endommagées. Comme le démontrent plusieurs études, lorsque la durée et/ou le degré d'ischémie sont trop sévères, la reperfusion ne peut mener à la sauvegarde des cellules irréversiblement endommagées <sup>335</sup>. Par conséquent, l'absence de réduction de la taille de l'infarctus par l'administration de l'énoxaparine chez les chiens possédant des débits collatéraux inférieurs à 0.08 mL/min/g peut être attribuable à des lésions irréversibles trop importantes induites lors de la période ischémique.

Plusieurs travaux ont démontré le rôle des neutrophiles et des plaquettes dans l'endommagement post-ischémique du myocarde reperfusé. La production et la libération de matériaux cytotoxiques (ie : les radicaux libres, les enzymes lysosomiales et les métabolites lipidiques dérivés des neutrophiles, des plaquettes et du tissu ischémique) sont associés à un dysfonctionnement de la

microcirculation qui interagit avec la formation de bouchons leucocytaires, la libération de substances vasoactives et/ou la réduction de la réponse vasodilatatrice de l'endothélium compromettant le retour sanguin et la survie des myocytes réversiblement endommagés <sup>82</sup>. Les plaquettes et les neutrophiles sécrètent une quantité considérable de radicaux libres aux sites de thrombose et d'inflammation <sup>336</sup>. Suivant une activation plaquettaire, la P-sélectine (GMP-140) retrouvée dans les granules  $\alpha$  des plaquettes, s'expriment à leur surface et modulent l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles via leurs ligands, le sialyl Lewis-X (SLe<sup>x</sup>) <sup>337</sup>. Les cellules endothéliales activées expriment aussi la P-sélectine qui médie, conjointement avec la L-sélectine, le roulement et l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium. Ces interactions constituent les premières étapes nécessaires à l'infiltration leucocytaire aux sites d'inflammation. La P-sélectine joue un rôle de premier plan dans le recrutement des neutrophiles dans le foyer ischémique reperfusé <sup>338</sup>. En effet, des études conduisent à une réduction de l'accumulation des neutrophiles et à une réduction de la taille de l'infarctus dans des modèles canins et félins d'ischémie-reperfusion <sup>338,339</sup>. Toutefois, toutes ces études ont été réalisées dans un modèle où la reperfusion était limitée à quelques heures. Dans ces conditions, il est possible que la cardioprotection observée n'ait été que transitoire. De plus, contrairement à cette présente étude, ces travaux ont été réalisés dans un modèle sans sténose résiduelle en cours de reperfusion, alors que cliniquement, 75% des patients ayant subi une thrombolyse coronaire reçue à la suite d'un infarctus aigu,

présentent une sténose <sup>340</sup>. Une étude effectuée par notre groupe a révélé un accroissement significatif de l'infarctus associé au rétrécissement de la lumière du vaisseau par une telle sténose en cours de reperfusion et ce phénomène s'est avéré dépendant des plaquettes <sup>196</sup>. Ainsi, les résultats de la présente étude nous indiquent qu'une cardioprotection de nature permanente est observée avec l'énoxaparine en cours de reperfusion en présence d'une sténose résiduelle au foyer d'occlusion.

Comme l'héparine, l'énoxaparine possède plusieurs propriétés capables d'intervenir dans la réduction des lésions de reperfusion : la modulation de l'activité de l'élastase <sup>277</sup> et du système du complément <sup>278</sup>, son interaction avec les molécules d'adhésion des leucocytes et des plaquettes <sup>218,281,282</sup>, ainsi que son pouvoir antioxydant <sup>243</sup>. L'énoxaparine possède également des propriétés anticoagulantes pouvant intervenir dans la réduction des lésions de reperfusion. En effet, chez le groupe traité à l'énoxaparine, l'aPTT a été allongé après 24 et 48 heures de reperfusion tandis que l'activité du facteur anti-Xa s'est avérée supérieure à tous les temps de reperfusion. Le facteur anti-Xa est donc le médiateur principal de l'effet anticoagulant de l'énoxaparine, cependant, l'augmentation significative de l'aPTT à 24 et 48 heures de reperfusion indique que d'autres facteurs de la coagulation peuvent intervenir, comme par exemple, l'inhibition du facteur tissulaire (Tissue factor pathway inhibitor : TFPI) <sup>341</sup>. Malgré son pouvoir antithrombotique, l'effet cardioprotecteur de l'énoxaparine ne semble pas être dépendant de cette propriété, mais plutôt de son interaction

avec la liaison des plaquettes avec les neutrophiles via la P-sélectine. L'interaction de l'énoxaparine avec la P-sélectine plaquettaire serait probablement responsable de cette inhibition. De plus, une réduction de la séquestration des plaquettes et des neutrophiles à l'intérieur du tissu myocardique reperfusé a été observée dans un modèle où l'énoxaparine était administrée lors de la reperfusion <sup>218</sup>.

Dans ces travaux, nous avons étudié différents marqueurs plasmatiques de la nécrose en relation avec la taille de l'infarctus mesurée par des procédés histochimiques. Par opposition à l'étude antérieure, aucune réduction de la créatine kinase (CK) plasmatique dans le groupe traité à l'énoxaparine n'a été observée. A 24 et 48 heures de reperfusion, la libération de CK s'est avérée supérieure chez les chiens traités à l'énoxaparine comparativement aux chiens témoins. Les facteurs responsables sont sans doute la fermeture du thorax, l'utilisation d'antibiotiques et l'injection sous-cutanée de l'énoxaparine, car ce marqueur de la nécrose est non spécifique du muscle cardiaque. En effet, les créatines kinases se sont retrouvées en quantité élevée non seulement lors d'une nécrose cellulaire myocardique, mais aussi suite à une nécrose des muscles squelettiques <sup>36</sup>. Donc l'élévation de la libération des CK en fin de reperfusion peut être attribuable à la libération de CK provenant du muscle squelettique.

La libération de l'isomère MB de la CK (CK-MB) et de la troponine I ne se sont pas retrouvées réduites dans le groupe traité par rapport au groupe

témoin, quoiqu'une tendance à des valeurs plus faibles de CKMB ait été observée dans le groupe traité durant les 6 premières heures de reperfusion. Par contre, leur dosage représente un outil efficace dans l'évaluation des dommages myocardiques <sup>24,25,35</sup>. Dans cette présente étude, une réduction significative de la taille de l'infarctus a été mesurée chez les chiens traités à l'énoxaparine comparativement aux chiens témoins. L'énoxaparine exerce donc un pouvoir cardioprotecteur lorsque administrée au cours de la reperfusion. Cependant, une réduction de la libération des marqueurs de la nécrose aurait dû être observée dans le groupe traité afin de soutenir la réduction de la nécrose myocardique observée. Au contraire, le dosage plasmatique des CK, CK-MB et de la troponine I ne démontre aucune différence significative entre les deux groupes. Peut-être que la réduction de la taille de l'infarctus dans le groupe traité soit associée à une prévention de l'apoptose des cellules myocardiques. Le phénomène de l'apoptose a été identifié dans des modèles d'ischémie <sup>51</sup> et d'ischémie-reperfusion <sup>53,54</sup>, et son importance pourrait être sous-estimée <sup>51</sup>. Les proportions de ces deux formes de mort cellulaire n'ont jusqu'à maintenant pas été déterminées. Il n'est donc pas exclu que l'énoxaparine puisse intervenir sur ces mécanismes, des études additionnelles seront requises afin d'élucider cette question. Enfin, ces observations confirment la limite de ces marqueurs à préciser l'étendue de l'infarctus expérimental par rapport à des méthodes histochimiques objectives.

En conclusion, l'énoxaparine réduit la taille de l'infarctus des chiens

possédant des débits collatéraux transmuraux supérieurs à 0.08 mL/min/g lorsque administrée au cours des 72 heures de reperfusion. La cardioprotection exercée par l'énoxaparine est donc permanente et non pas attribuable à un retardement des dommages cellulaires suivant des événements d'ischémie-reperfusion. Les mécanismes responsables de cette cardioprotection sont possiblement les mêmes que ceux observés dans le modèle aigu, c'est-à-dire une réduction des conséquences néfastes apportées par le recrutement des plaquettes et des neutrophiles dans le myocarde reperfusé. Le dosage des marqueurs de la nécrose n'a pas confirmé la réduction des dommages myocardique observés en mesurant la taille de l'infarctus. L'hypothèse d'une réduction de l'apoptose myocardique pouvant expliquer la réduction de l'infarctus par l'énoxaparine n'est pas exclue. La quantification des cellules apoptotiques dans le tissu infarci et la comparaison entre les phénomènes de nécrose et d'apoptose seraient des sujets intéressants à étudier dans ce modèle au cours d'expérience à venir.

**Bibliographie**

1. Jennings R, Schaper J, Hill M, Steenbergen C, Reimer K. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury: Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res* 1985;56:262-278.
2. Jennings R, Ganote C, Reimer K. Ischemic tissue injury. *Am J Pathol* 1975;81:179-198.
3. Jennings R, Hawkins H, Lowe J, Hill M, Klotman S, Reimer K. Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in dog. *Am J Pathol* 1978;92:187-214.
4. Huber K, Runge M, Bode C, Gulba D. Thrombolytic therapy in acute myocardial infarction-update. *Ann Hematol* 1996;73 (Suppl I):S29-S38.
5. Investigators G. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993;329:673-682.
6. Braunwald E, Kloner R. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985;76:1713-1719.
7. Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation* 1998;97:795-804.
8. Hillis L, Braunwald E. Myocardial ischaemia. *New Engl J of Med* 1977;296:971, 1034 1093.
9. Jennings R, Reimer K. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: Effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* 1983;68:125-136.
10. DeBoer L, Ingwall J, Kloner K, Braunwald E. Prolonged derangements of canine myocardial purine metabolism after brief coronary artery occlusion not associated with anatomic evidence of necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5471-5476.
11. Kloner R, Braunwald E. Observations on experimental myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1980;14:371-375.
12. Jennings R, Reimer K. Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 1981;102:241-255.

13. Jennings R, Ganote C. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res* 1974;34-35 suppl III:156-168.
14. Buja L, Eigenbrodt M, Eigenbrodt E. Apoptosis and necrosis; basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:1208-1214.
15. Jennings R, Reimer K, Steenbergen C. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18:769-780.
16. Jennings R, Murry C, Steenbergen C, Reimer K. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990;82 Suppl II:II2-II12.
17. Kloner R, Rude R, Carlson N, Maroko R, DeBoer L, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* 1980;62:945-952.
18. Armingier L, Gavin J. Changes in the microvasculature of ischemic and infarcted myocardium. *Lab Invest* 1975;33:51-56.
19. Reimer K, Jennings R. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death 2- Transmural progression of necrosis within the framework of the ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab invest* 1979;40:633-644.
20. Weisman H, Bulkley B. Pathophysiology of atherosclerotic heart disease. *Cardiol Clin* 1984;2:555-569.
21. Fox KAA, Bergmann SR, Sobel BE. Pathophysiology of myocardial reperfusion. *Ann. Rev. Med* 1985;36:125-144.
22. Gottlieb G, Kubo S, Alonso D. Ultrastructural characterization of the border zone surrounding early experimental myocardial infarcts in dogs. *Am J Pathol* 1981;103:292-303.
23. Shen A, Jennings R. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Path* 1972;67:417-440.
24. Adams J, Abendschein D, Jaffe A. Biochemical markers of myocardial injury: is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* 1993;88:750-763.

25. Hossein-Nia M, Kallis P, Brown P. Creatine kinase MB isoforms: sensitive markers of myocardial damage. *Clin Chem* 1994;7:1265-1271.
26. Marieb EN, Laurendeau G. Anatomie et physiologie humaines. Québec: The benjamin/Cummings publishing company Inc., 1993:p 266.
27. Mair J, Artner-Dwarzak E, Dienstl A. Early detection of acute myocardial infarction by measurement of mass concentration of creatine kinase MB. *Am J Cardiol* 1991;68:1545-1550.
28. Katus H, Remppis A, Neumann F. Diagnostic efficiency of troponine T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* 1991;83:902-912.
29. Katus H, Loosers S, Hallermayer K. Development and in vitro characterisation of a new immunoassay of cardiac troponine T. *Clin Chem* 1992;38:386-393.
30. Cummins B. Cardiac-specific troponin I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1987;113 No 6:1333-1344.
31. Wong S. Strategic utilization of cardiac markers for the diagnosis of acute myocardial infarctions. *Ann Clin Lab Sci* 1996;26 No 4:301-312.
32. Abe S, Arima S. Early assessment of reperfusion therapy using cardiac troponine T. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1382-1389.
33. Skobel E, Kammermeier H. Relation between enzyme release and irreversible cell injury of the heart under the influence of cytoskeleton modulating agents. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997;1362:128-134.
34. Devries S, Jaffe A, Geltman E, Sobel B, Abendschein D. Enzymatic estimation of the extent irreversible myocardial injury early after reperfusion. *Am Heart J* 1989;117:31-36.
35. Blanke H, Hardenberg DV, Cohen M. Patterns of creatine kinase release during acute myocardial infarction after nonsurgical treatment and correlation with infarct size. *J Am Coll Cardiol* 1984;3:675-680.
36. Siegel A, Silverman L, Holman B. Elevated creatine kinase MB isoenzyme levels in marathon runners. Normal myocardial scintigrams suggest noncardiac source. *JAMA* 1981;246 No 18:2049-2051.

37. Missov E. The troponin complex: a new biochemical approach to cardiac insufficiency. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1998;94 (12 suppl):31-33.
38. Missov E, Calzolari C, Pan B. Circulations cardiac troponine I in severe congestive heart failure. *Circulation* 1997;96:2953-2958.
39. Bodor G, Porterfield D, Voss E, Smith S, Apple F. Cardiac troponine I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. *Clin Chem* 1995;41:1710-1715.
40. Solymoss B, Bourassa M, Wesolowska E, Dryda I, Theroux P, Mondor L, Perrault D, Gilfix B. The role of cardiac troponin T and other new biochemical markers in evaluation and risk stratification of patients with acute chest pain syndromes. *Clin Cardiol* 1997;20:934-942.
41. Antman E, Sacks D, Rifai N, McCabe C, Cannon C, Braunwald E. Time to positivity of a rapid bedside assay for cardiac-specific troponin T predicts prognosis in acute coronary syndromes: a thrombolysis in myocardial infarction (TIMI)11A substudy. *JAAC* 1998;31 No2:326-330.
42. Laperche T, Golmard J, Steg P. Early behavior of biochemical markers in patients with thrombolysis in myocardial infarction grade 2 flow in the infarct artery as opposed to other flow grades after intravenous thrombolysis for acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1997;134 No 6:1044-1051.
43. Katus H, Remppis A, Scheffold T, Diederich K, Kuebler W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991;67:1360-1367.
44. Michael L, Hunt J, Weilbaecher D, Perryman M, Lewis RRR, Entman M. Creatine kinase and phosphorylase in cardiac lymph: coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol* 1985;248:H350-H359.
45. Jarmakani JM, Limbird L, Graham TC, Marks RA. Effect of reperfusion on myocardial infarct, and the accuracy of estimating infarct size from serum creatine phosphokinase in the dog. *Cardiovascular Research* 1976;10:245-253.

46. Vatner S, Baig H, Manders W, Maroko P. Effects of coronary artery reperfusion on myocardial infarct size calculated from creatine kinase. *J Clin Invest* 1978;61:1048-1056.
47. Blair E. Anatomy of the ventricular coronary arteries in the dog. *Circ Res* 1961;9:333-341.
48. Hetts S. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998;279:300-307.
49. MacLellan W, Schneider M. Death by design: programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1997;81:137-144.
50. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:462-475.
51. Kajstura J, Cheng W, Reiss K. Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996;74:86-107.
52. Kajstura J, Liu Y, Baldini A, Li B, Olivetti G, Leri A, Anversa P. Coronary artery constriction in rats: Necrotic and apoptotic myocyte death. *Am J Cardiol* 1998;82:30K-41K.
53. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused myocardium. *Circ Res* 1996;79:949-956.
54. Gottlieb R, Burleson K, Kloner R. Rerperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-1628.
55. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998;97:276-281.
56. Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: Role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* 1998;97:2259-2267.

57. Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1998;30:1789-1801.
58. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56 No5:786-794.
59. Chatelain P, Latour J-G, Tran D, Lorgetil MD, Dupras G, Bourassa M. Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation* 1987;75 No 5:1083-1090.
60. Pasyk S, Schaper W, Schaper J, Pasyk K, Miskiewicz G, Steinseifer B. DNA synthesis in coronary collaterals after coronary artery occlusion in conscious dog. *Am J Physiol* 1982;242:H1031-H1037.
61. Bishop S, White R, Bloor C. Regional myocardial blood flow during acute myocardial infarction in the conscious dog. *Circulation Research* 1976;38:429-438.
62. Maxwell L, Gavin J. Anti-oxidant therapy improves microvascular ultrastructure and perfusion in postischemic myocardium. *Microvasc Res* 1992;43 No 3:255-266.
63. Lavallée M, Vatner S. Regional myocardial blood flow and necrosis in primate following coronary occlusion. *Am J Physiol* 1984;246:H635-H639.
64. Miura T, Downey J, Ooiwa H, Ogawa S, Adachi T, Noto T, Shizukuda Y, Imura O. Progression of myocardial infarction in a collateral flow deficient species. *Jpn Heart J* 1989;30 No 5:695-708.
65. Hearse D, Yellon D. Therapeutic approaches to myocardial infarct size limitation. New-York, 1984:85-87.
66. Reimer K, Jennings R, Cobb F, Murdock R, Greenfield J, Becker L, Bulkley B, Hutchins G, Schwartz R, Bailey K. Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models. *Circ Res* 1985;56:651-665.

67. Fujiwara H, Matsuda M, Fujiwara Y, Ishida M, Kawamura A, Takemura G, Kida M, Uegaito T, Tanaka M, Horike K. Infarct size and protection of ischemic myocardium in pig, dog and human. *Jpn Circ J* 1989;53 No 9:1092-1097.
68. Schaper W. Experimental coronary artery occlusion. III The determinants of collateral blood flow in acute coronary occlusion. *Basic Res Cardiol* 1978;73:584-594.
69. Christian T, Schwartz R, Gibbons R. Determinants of infarct size in reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 1992;86:81-90.
70. Yellon D, Hearse D, Maxwell M, Chambers D, Downey J. Sustained limitation of myocardial necrosis 24 hours after coronary artery occlusion: Verapamil infusion in dogs with small myocardial infarcts. *Am J Cardiol* 1983;51:1409-1413.
71. Lowe J, Reimer K, Jennings R. Experimental infarct size as a function of the amount of myocardium at risk. *Am J Pathol* 1978;90:363-380.
72. Jugdutt B, Hutchins G, Bulkley B, Becker L. Myocardial infarction in the conscious dog: Three-dimensional mapping of infarct, collateral flow and region at risk. *Circulation* 1979;60:1141-1150.
73. Vandeplassche G, Hermans C, Haecke JV, Wouters L, Borgers M, Flameng W. Evaluation of factors influencing myocardial infarct size in unconscious dogs. *Cardiovasc Res* 1991;25 No 10:844-854.
74. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: Metabolic, functional and ultrastructural studies. *The American Journal of Cardiology* 1983;52:72A-81A.
75. Jennings R, Sommers H, Smyth G, Flack H, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960;70:68-78.
76. Eng C, Cho S, Factor S, Kirk E. A nonflow basis for the vulnerability of the subendocardium. *J Am Coll Cardiol* 1987;9:374-379.
77. Manning A, Hearse D. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16:497-518.

78. Braunwald E, Kloner R. The stunned myocardium-prolonged post-ischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982;66:1146-1149.
79. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990;82:723-738.
80. Ryan T, Tarver R, Duerk J. Distinguishing viable from infarcted myocardium after experimental ischaemia and reperfusion by using nuclear magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1355-1364.
81. Mattfeldt T, Schwarz F, Schuler G. Necropsy evaluation in seven patients with evolving acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Am J Cardiol* 1984;54:530.
82. Latour J. Impaired postischemic reflow and myocardial reperfusion injury. In: The age of reperfusion,. New-York, NY: Cahners Med. Comm., 1992:5-11.
83. Thompson J, Hess M. The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1986;28:449-462.
84. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996;46:15-32.
85. Kukreja R, Hess M. The oxygen free radical system: from equation through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992;26:641-655.
86. Muntz K, Hagler H, Boulas H, Buja L. Redistribution of catecholamines in the ischemic zone of the dog heart. *Am J Pathol* 1984;114:64-78.
87. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-716.
88. Meerson F, Kagan V, Kozlov Y, Belkina L, Arkhipenko Y. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res Cardiol* 1982;77:465-485.
89. Morel F, Doussi re J, Vignais P. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 1991;201:523-546.

90. McCord J. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-163.
91. Phan EH, Gannon DE, Ward PA, Karmiol S. Mechanism of neutrophil-induced xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase conversion in endothelial cells: evidence of a role for elastase. *Am J Respiratory Cell and Mol Biol* 1992;6:270-278.
92. Haberland A, Luther H, Schimke I. Does allopurinol prevent superoxide radical production by xanthine oxidase (XOD)? *Agents and Actions* 1991;32.
93. Duncan C. The role of oxygen radicals in ischemia-reperfusion injury in the heart. *Med Science Res* 1994;22:609-611.
94. Kuppusamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J of Biol Chem* 1989;264:9880-9884.
95. Chambers D, Parks D, Patterson G, Roy R, McCord J, Yoshida S, Parmley L, Downey J. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:145-152.
96. Hearse D, Manning A, Downey J, Yellon D. Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion? *Acta Physiol Scand* 1986;Suppl 548:65-78.
97. Hirai K, Ashraf M. Modulation of adenosine effects in attenuation of ischemia and reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30 No 9:1803-1815.
98. Terada LS, Leff JA, Repine JE. Measurement of xanthine oxidase in biological tissues. *Methods in Enzymology* 1990;186:651-656.
99. Podzuweit T, Muller BH, Bader A, Gerold RG, Scheld HH. Absence of xanthine oxidoreductase activity in human myocardium. *Cardiovasc Res* 1991;25:820-830.
100. Schoutsen B, DeJong JW, Harmsen E, Tombe PP, Achterberg P. Myocardial xanthine oxidase/dehydrogenase. *Biochem et Biophys Acta* 1983;762:518-524.

101. Josephson RA, Silverman HS, Lakatta EG, Stern MD, Zweier JL. Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes. *The J of Biological Chem* 1991;266:2354-2361.
102. Thompson-Gorman S, Zweier J. Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem* 1990;265:6656-6663.
103. Dulchavsky S, Davidson S, Cullen W, Devasagayam T, Diebel L, Dutta S. Effects of deferoxamine on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in isolated rat heart. *Basic Res Cardiol* 1996;91 No 6:418-424.
104. Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996;6:79-88.
105. Kitakaze M, Node K, Minamino T, Kosaka H, Shinozaki Y, Mori H, Inoue M, Hori M, Kamada T. Role of nitric oxide in regulation of coronary blood flow during myocardial ischemia in dogs. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1804-1812.
106. Hearse D. Reperfusion of ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1977;9:607-614.
107. Petrone W, English D, Wong K, McCord J. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1159-1163.
108. Pryor WA. Free Radicals Research. New York, 1976:p 1-49.
109. Mead JF. Free Radicals Research. New York, 1976:p.51-68.
110. Bast A, Haenen G, Doelman C. Oxidants and antioxidants: state of the art. *AM J Med* 1991;91 Suppl 3C:3C-2S-3C-13S.
111. Ferrari R, Ceconi C, Curello S. Oxygen-mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:937-945.
112. Ambrosio G, Becker L, Hutchins G, Weisman H, Weisfeldt M. Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insight into the pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation* 1986;74:1424-1433.

113. Campo G, Squadrito F, Campo S, Altavilla D, Quartarone C, Ceccarelli S, Ferlito M, Avenoso A, Squadrito G, Saitta A, Caputi A. Beneficial effect of raxofelast, an hydrophilic vitamin E analogue, in the rat heart after ischemia and reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30 No 8:1493-1503.
114. Roth E, Torok B, Pollak Z, Temes G, Morvay G. Myocardial protection by antioxidant during permanent and temporary coronary occlusion in dogs. *Basic Res Cardiol* 1987;82 suppl 2:335-345.
115. Mallory G, White P, Salcedo-Salgar J. The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. *Am Heart J* 1939;18:647-671.
116. Sommers H, Jennings R. Experimental acute myocardial infarction: histologic and histochemical studies of early myocardial infarcts induced by temporary or permanent occlusion of a coronary artery. *Lab Invest* 1964;13:1491-1502.
117. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995;91:1872-1885.
118. Weiss S. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376.
119. Springer T. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76 No 2:301-314.
120. Carlos T, Harlan J. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84 No 7:2068-2101.
121. Andrian Uv, Hansell P, Chambers J, Berger E, Filho I, Butcher E, Arfors K-E. L-selectin function is required for  $B_2$ -integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol* 1992;263:H1034-H1044.
122. Lawrence M, Springer T. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol* 1993;151:6338-6346.
123. Dore M, Korthuis R, Granger D, Entman M, Smith C. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 1993;82:1308-1316.

124. Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood* 1993;82 No 4:1165-1174.
125. Berg M, James S. Human neutrophils release the Leu-8 lymph node homing receptor during cell activation. *Blood* 1990;76:2381-2388.
126. Jung TM, Dailey MO. Rapid modulation of homing receptors (gp90mel-14) induced by activation of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol* 1990;144:3130-3136.
127. Kansas GS. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood* 1996;88 No 9:3259-3287.
128. Hattori R, Hamilton K, Fugate R, McEver R, Sims R. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 1989;264:7768-7771.
129. Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun* 1994;2:7-14.
130. Bischoff J, Brasel C. Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:174-180.
131. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 1992;80:795-800.
132. Bevilacqua M, Pober J, Mendrick D, Cotran R, Gibbrone M. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9238-9242.
133. Kishimoto T, Warnock R, Jutila M, Butcher E, Lane C, Anderson D, Smith C. Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18 independent adhesion pathway in vitro. *Blood* 1991;78:805-811.

134. Nudelman P, Gaeta F, Perez M, Singhal A, Hakomori S, Paulson J. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl Le<sup>x</sup>. *Science* 1990;250 No 4984:1130-1132.
135. Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Seed B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Le<sup>x</sup> determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 1990;250 No 4984:1132-1135.
136. Fukuda M, Spoocher E, Oates JE, Dell A, Klock JC. Structure of sialylated fucosyl lactosaminoglycan isolated from human granulocytes. *J Biol Chem* 1984;259:10925-10935.
137. Sako D, Chang X, Barone K, Vachino G, White H, Shaw G, Veldman G, Bean K, Ahern T, Furie B. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993;75 No 6:1179-1186.
138. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* 1992;118:445-465.
139. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher H, Kleuser B, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 1995;373 No 6515:615-620.
140. Baumhater S, Singer M, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rossen S, Lasky L. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993;262 No 5132:436-438.
141. Berg E, McEvey L, Berlin C, Bargatze R, Butcher E. L-selectin mediated lymphocyte rolling on MadCAM-1. *Nature* 1993;366:695-698.
142. Imai Y, Lasky L, Rosen S. Sulphation requirement for glyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature* 1993;361:555-557.
143. Phillips D, Charo I, Parise L, Fitzgerald L. The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-843.
144. Arnaout M. Leukocyte adhesion molecule deficiency: its structural basis, pathophysiology and implication for modulating the inflammatory response. *Immunol Rev* 1990;114:145-180.

145. Jang Y, Lincoff M, Plow E, Topol E. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-1601.
146. Muller W, Weigl S, Dang X, Phillips D. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;178 No 2:449-460.
147. Vaporciyan A, Delisser H, Yan H, Mendiguren I, Thom S, Jones M, Ward P, Albelda S. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 1993;262 No 5139:1580-1582.
148. Braun M, Pietsch P, Felix S, Baumann G. Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27 No 12:2571-9.
149. Ferran C, Peuchmaur M, Desruennes M, Ghossoub J, Cabrol A, Brousse N, Cabrol C, Bach J, Chatenoud L. Implications of de novo ELAM-1 and VCAM-1 expression in human cardiac allograft rejection. *Transplantation* 1993;55 No 3:605-609.
150. Sheridan F, Dauber I, McMurtry I, Lesnefsky E, Horwitz L. Role of leukocytes in coronary vascular endothelial injury due to ischemia and reperfusion. *Circ. Res* 1991;69:1566-1574.
151. Crawford M, Grover F, Kolb W, McMahan C, O'Rourke R, McManus L, Pinckard R. Complement and neutrophil activation in the pathogenesis of ischemic myocardial injury. *Circulation* 1988;78:1449-1458.
152. Sawa Y, Ickikawa H, Kagisaki K, Ohata T, Matsuda H. Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes promotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116 No 3:511-517.
153. Dreyer W, Michael L, West M, Smith C, Rothlein R, Rossen R, Anderson D, Entman M. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991;84:400-411.

154. deLorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, St-Jean G, Tran D, Latour J-G. Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *The American Journal of Cardiovascular Pathology* 1990;3 No 2:143-153.
155. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Campo G, Arlotta M, Quartarone C, Ferlito M, Caputi A. Cyclosporin-A reduces leudocyte accumulation and protects against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* 1999;364 No 2-3:159-168.
156. McPhail L, DeChatelet L, Shirley P. Further characterization of NAPHG oxidase activity of human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1976;58:775-780.
157. Kobayashi T, Robinson J, Seguchi H. Identification of intracellulair sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *Journal of Cell Science* 1998;111:81-91.
158. Root R, Metcalf J. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis. *J Clin Invest* 1977;60:1266-1279.
159. Higginson LAJ, Heggtveit WHA, Sanders TM, Bloor CM, Covell JW. Determinants of myocardial hemorrhage after coronary reperfusion in the anesthetized dog. *Circulation* 1982;65 No 1:62-69.
160. Badwey J, Karnovsky M. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu Rev Biochem* 1980;49:695-726.
161. Janoff A. Elastase in tissue injury. *Annu Rev Med* 1985;36:207-216.
162. Varani J, Ward P. Mechanisms of neutrophil-dependent and neutrophil-independent endothelial cell injury. *Biol Signals* 1994;3:1-14.
163. Brower M, Levin R, Garry K. Human neutrophil elastase modulates platelet function by limited proteolysis of membrane glycoproteins. *J Clin Invest* 1985;75:657-666.
164. Weksler B, Jaffe E, Brower M, Cole O. Human leukocyte cathepsin G and elastase specifically suppress thrombin-induced prostacyclin production in human endothelial cells. *Blood* 1989;74:1627-1634.

165. Wu K, Urano T, Ihara H, Tanaka Y, Fujie M, Shikimori M, Hashimoto K, Takada A. The cleavage and inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by neutrophil elastase: the evaluation of its physiologic relevance in fibrinolysis. *Blood* 1995;79:430-438.
166. Zimmerman B, Granger D. Reperfusion-induced leukocyte infiltration: role of elastase. *Am J Physiol* 1990;259:H390-H394.
167. Delyani J, Murohara T, Lefer A. Novel recombinant serpin, LEX-032, attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *Am J Physiol* 1996;270:H881-H887.
168. Molino M, DiLallo M, Martelli N, deGaetano G, Cerletti C. Effects of leukocyte-derived cathepsin G on platelet membrane glycoprotein Ib-IX and IIb-IIIa complexes: a comparison with thrombin. *Blood* 1993;82:2442-2451.
169. Murohara T, Guo J, Lefer A. Cardioprotection by a novel recombinant serine protease inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:1246-1253.
170. Lynch J, Lotner F, Betz S, Henson P. The release of a platelet-activating factor by stimulated rabbit neutrophils. *J Immunol* 1979;123:1219-1226.
171. Goldstein I, Malmsten C, Samuelsson B, Weissmann G. Prostaglandins, thromboxanes, and polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1977;2:309-317.
172. Borgeat P, Samuelsson B. Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes: formation of a novel dihydroxyeicosatetraenoic acid. *J Biol Chem* 1979;254:2643-2646.
173. Snyder F. Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am J Physiol* 1990;259:C697-C708.
174. Benveniste J, Chignard M. A Role for PAF-acether (platelet-activating factor) in platelet-dependent vascular diseases. *Circulation* 1985;72:713-717.
175. Ingraham L, Coates T, Allen J, Higgins C, Baehner R, Boxer L. Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. *Blood* 1982;59:1259-1266.

176. Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace J, Granger D. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 1990;259:G300-G305.
177. Dahlén S, Bjork J, Hedqvist P, Arfors K, Hammarstrom S, Lindgren J, Samuelsson B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in post-capillary venules, in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3887-3891.
178. Lehr H, Guhlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K. Leukotriene as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest* 1991;87:2036-2041.
179. Ma X, Weyrich A, Lefer D, Buerke M, Albertine K, Kishimoto T, Lefer A. Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation* 1993;88 No 2:649-658.
180. Attavilla D, Squadrite F, Ioculano M, Candle P, Campo G, Zingarelli B, Caputi A. E-selectin in the pathogenesis of experimental myocardial ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 1994;270 No 1:45-51.
181. Weyrich A, Buerke M, Albertine K, Lefer A. Time course of coronary vascular endothelial adhesion molecule expression during reperfusion of ischemic feline myocardium. *J Leukoc Biol* 1995;57:45-55.
182. Yoshinori S, Yoshifumi E, Tohru N, Hideo Y, Ko O, Yoshio Y. Reduction of rat myocardial ischaemia/reperfusion injury by a synthetic selectin oligopeptide. *Jour of Pathol* 1996;178:335-342.
183. Jaeschke H, Arhood F, Smith C. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB* 1990;J 4:3355-3359.
184. Smith S, Holm L, Perry M, Grisham M, Arfors K, Granger D, Kuytys P. Role of neutrophils in hemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterology* 1987;93 No 3:466-471.

185. Takada M, Nadeau K, Shaw G, Tilney N. Early cellular and molecular changes in ischemia/reperfusion injury: inhibition by a selectin antagonist, P-selectin glycoprotein ligand-1. *Transpl Proc* 1997;29 (1-2):1324-1325.
186. Lefer A, Campbell B, Shin Y. Effects of a metalloproteinase that truncated P-selectin glycoprotein ligand on neutrophil-induced cardiac dysfunction in ischemia-reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30 No 12:2561-2566.
187. Hayward R, Campbell B, Shin Y, Scalia R, Lefer A. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res* 1999;41 No 1:65-76.
188. Harlan J, Winn R, Doerschuk C, Vedder N, Rice C. In vivo models of leukocyte adherence to endothelium. In *adhesion: Its role in inflammatory disease*. New-York, 1992:117-150.
189. Simpson P, III RT, Fantone J, Mickelson J, Griffin J, Luchesi B. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo-1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988;81:624-629.
190. Ma X, Tsao P, Lefer A. Antibody to CK18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1991;88:1237-1243.
191. Murohara T, Delyani J, Albelda S, Lefer A. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. *J Immunol* 1996;156:3550-3557.
192. Laws K, Clanton J, Starnes V, Lupinetti F, Collins J, Oates J, Hammon J. Kinetics and imaging of indium-111 labeled autologous platelets in experimental myocardial infarction. *Circulation* 1983;67:110-116.
193. Bednar M, Smith B, Pinto A, Mullane D. Neutrophil depletion suppresses <sup>111</sup>In-labeled platelet accumulation in infarcted myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:906-912.

194. Jolly S, Schumacher W, Kunkel S, Abrams G, Liddicoat J, Lucchesi B. Platelet depletion in experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 1985;80:269-279.
195. Mullane K, McGiff J. Platelet deposition and infarct size in an occlusion-reperfusion model of myocardial ischemia in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:733-738.
196. Rousseau G, Hébert D, Libersan D, Khalil A, St-Jean G, Latour J-G. Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J* 1993;125:1553-1563.
197. Lierde JV, Geest HD, Verstraete M, Werf FVd. Angiographic assessment of the infarct related residual coronary stenosis after spontaneous or therapeutic thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:1545-1549.
198. Dinerman J, Mehta J. Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease: insights into potential mechanism and their clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:207-222.
199. Schmidt S, Varghese P, Bloom S, Yackee J, Ross A. The influence of residual coronary stenosis on size of infarction after reperfusion in a canine preparation. *Circulation* 1986;73:1354-1359.
200. Myears DW, Nohara R, Abendschein DR, Saffitz JE, Sobel BE, Bergmann SR. Compromise of beneficial effects of reperfusion on myocardium supplied by vessels with critical residual stenosis. *JACC* 1988;11 No5:1078-1086.
201. Wilson J, Ramanathan K, Ingram L, Mirvis D. Effects of residual stenosis on infarct size and regional transmural myocardial blood flow after reperfusion. *Am Heart J* 1988;116:1523-1529.
202. Romson J, Hook B, Rigot V, Schork M, Swanson D, Lucchesi B. The effect of bupropfen on accumulation of Indium-111-labeled platelets and leukocytes in experimental myocardial infarction. *Circulation* 1982;66:1002-1011.
203. Leinberger H, Suehiro G, McNamara J. Myocardial platelet trapping after coronary ligation in primates (*Papio anubis*). *J Surg Res* 1979;27:36-40.

204. Ishikawa K, Ogawa I, Shimizu M, Koka H, Kamata N, Nakai S, Katori R. Residual critical coronary stenosis during myocardial reperfusion is deleterious to myocardial salvage in dogs. *Jpn Circ J* 1992;56:921-928.
205. Holme PA, Orvim U, Hamers JM, Solum ON, Brosstad RF, Barstad RM, Sadariassen KS. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:646-653.
206. Marguerie G, Edgington T, Plow E. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor as part of a multistep reaction in ADP-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 1980;255:154-160.
207. Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek M, Timmons S. Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry* 1989;28:2902-2914.
208. Landolfi R, Candia ED, Rocca B, Ciabattini G, Antinori A, Masetti R, Patrono C. Effects of unfractionated and low molecular weight heparins on platelet thromboxane biosynthesis "in vivo". *Thromb Haemost* 1994;72:942-946.
209. Itoh K, Nakao A, Kishimoto W, Takagi H. Heparin effects on superoxide production by neutrophils. *Eur Surg Res* 1995;27:184-188.
210. Rosemarie C, Fitzgerald D. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* 1997;95:787-789.
211. Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli F, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita A, Fitzgerald G, Violi F. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyle radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* 1997;95:885-891.
212. Deuel TF, Seniorf RM, Chang D, Griffin GL, Heinrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 1981;78 No 7:4584-4587.
213. Bubel S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Kluter H. Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1996;36 No 5:445-449.

214. Kinn J, Bache R. Effect of platelet activation on coronary collateral blood flow. *Circulation* 1998;98:1431-1437.
215. Merhi Y, Lam JYT, Lacoste LL, Latour J-G, Guidoin R, Walters D. Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993;13:951-957.
216. Lefer AM, Campbell B, Scalia R, Lefer DJ. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion; role of selectins. *Circulation* 1998;98:1322-1328.
217. Issekutz A, Ripley M, Jackson J. Role of neutrophils in the deposition of platelets during acute inflammation. *Lab Invest* 1983;49:716-724.
218. Libersan D, Khalil A, Dagenais P, Quan E, Delorme F, Uzan A, Latour J-G. The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovascular Research* 1998;37:656-666.
219. Furchgott R, Zawadki J. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
220. Vanhoutte P. The endothelium-modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Eng J Med* 1988;319:512-513.
221. Furchgott R, Vanhoutte P. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989;3:2007-2018.
222. Lücher T, Vanhoutte P. The endothelium: Modulator of cardiovascular function. : Boca Raton, FL, 1990:1-228.
223. Moncada S, Vane J. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1979;30:293-331.
224. Ku D. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science* 1982;218:576-578.
225. Benthuyzen V, McMurtry I, Horowitz L. Reperfusion after acute coronary occlusion in dogs impairs endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and augments contractile reactivity in vitro. *J. Clin. Invest.* 1987;79:265-274.

226. Furlong B, Henderson A, Lewis M. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1987;90:687-692.
227. McCall T, Whittle B, Boughton-Smith N, Moncada S. Inhibition of FMLP-induced aggregation of rabbit neutrophils by nitric oxide. *Br. J Pharmacol* 1988;95:517P.
228. Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall P. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620-1624.
229. Mizuno T, Watanabe M, Sakamoto T, Sunamori M. L-arginine, a nitric oxide precursor, attenuates ischemia-reperfusion injury by inhibiting inositol-1,4,5-triphosphate. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115 No 4:931-936.
230. Engler R, Dahlgren M, Peterson M, Dobbs A, Schmid-Schönbein G. Accumulation of polymorphonuclear leukocytes during 3 h experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1986;251:H93-H100.
231. Litt M, Jeremy R, Weisman H, Winkelstein F, Becker L. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 1989;80:1816-1827.
232. Olafsson B, Forman M, Puett D, Pou A, Cates C, Friesinger G, Virmani R. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 1987;76:1135-1145.
233. Engler R, Dahlgren M, Morris D, Peterson M, Schmid-Schonbein G. Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 1986;251 (2 Pt 2):H314-23.
234. deLorgeril M, Basmadjian A, Lavallée M, Clément R, Millette D, Rousseau G, Latour J-G. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *Am Heart J* 1989;117:523-532.

235. Siminiak T, Flores N, Sheridan D. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J* 1995;16:160-170.
236. Califf R, Topol E, Stack R. Evaluation of combination thrombolytic therapy and timing of cardiac catheterization in acute myocardial infarction: results of thrombolysis and angioplasty in myocardial infarction-phase 5 randomized trial. *Circulation* 1991;83:1543-1546.
237. Schaer D, Wasserman AR. Reinfarction, recurrent angina, and reocclusion after thrombolytic therapy. *Circulation* 1987;76:57-62.
238. Roux S, Christeller S, Lüdin E. Effects of aspirin on coronary reocclusion and recurrent ischemia after thrombolysis: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:671-676.
239. Verheught F, Meijer A, Lagrand W, Eenige M. Reocclusion: The flip side of coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:766-773.
240. Roux S, Tschopp T, Kugn H, Steiner B, Hadvary P. Effects of heparin, aspirin and a synthetic platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist (Ro 43-5054) on coronary artery reperfusion and reocclusion after thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:501-508.
241. Dzau V, Gibbons G, Cooke J, Omoigui N. Vascular biology and medicine in the 1990s: scope, concepts, potentials, and perspectives. *Circulation* 1993;87:705-719.
242. Markis J, Malagold M, Parker J. Myocardial salvage after intracoronary thrombolysis with streptokinase in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1981;305:777.
243. Grant D, Long WF, Mackintosh G, Williamson FB. Heparins as essential antioxidants. *Agents Actions* 1994;41:C214-C215.
244. O'Rourke M, Baron D, Keogh A. Limitation of myocardial infarction by early infusion of recombinant tissue-type plasminogen activator. *Circulation* 1988;77:1311-1315.

245. Simoons M, Serruys R, Brand Mvd. Early thrombolysis in acute myocardial infarction: limitation of infarct size and improved survival. *J Am Coll Cardiol* 1986;7:717-728.
246. Fox K, Bergmann R, Sobel B. Coronary thrombolysis: pharmacological considerations with emphasis on tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Biochem Pharmacol* 1984;33:1831-1838.
247. Hoylaerts M, Rijken D, Lijnen H, Collen D. kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 1982;257:2912.
248. Tanswell P, Tebbe U, Neuhaus K. Pharmacokinetics and fibrin specificity of alteplase during accelerated infusions in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:1071.
249. Chesebro J, Knatterud G, Roberts R. Thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial, phase I: a comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase: clinical findings through hospital discharge. *Circulation* 1987;76:142-154.
250. Kawano K, Aoki I, Aoki N, Homori M, Maki A, Hioki Y, Hasumura Y, Terano A, Arai T, Mizuno H, Ishikawa K. Human platelet activation by thrombolytic agents: Effects of tissue-type plasminogen activator and urokinase on platelet surface P-selectin expression. *Am Heart J* 1998;135:268-271.
251. Lopez-Farre A, Farre J, Miguel LSd, Romero J, Gomez J, Rico L, Casado S. Thrombosis and coronary disease: neutrophils, nitric oxide and aspirin. *Rev Esp Cardiol* 1998;51 No 3:171-177.
252. Myler R, Frink R, Shaw R, Bashour T, Hecht H, Ryan C, Cumberland D, Stertzer S. The unstable plaque; Pathophysiology and therapeutic implications. *J Invas Cardiol* 1990;2:117.
253. Mustard J, Packham M, Kinlough-Rathbone R. Platelets, blood flow, and the vessel wall. *Circulation* 1990;81 Suppl 1:124.

- 254.** Golino P, Maroko R, Carew T. Efficacy of platelet depletion in counteracting the detrimental effect of acute hypercholesterolemia on infarct size and the no-reflow phenomenon in rabbits undergoing coronary artery occlusion-reperfusion. *Circulation* 1987;76:173-180.
- 255.** Barrabés J, Garcia-Dorado D, Oliveras J, Gonzalez M, Ruiz-Meana M, Solares J, Garcia-Burillo A, Lidon R-M, Antolin M, Castell J, Soler-Soler J. Intimal injury in a transiently occluded coronary artery increases myocardial necrosis. Effect of aspirin. *Eur J Physiol* 1996;432:663-670.
- 256.** Anderson J. Why does thrombolysis fail? Breaking through the reperfusion ceiling. *Am J Cardiol* 1997;80 No 12:1588-1590.
- 257.** Becker RC, Gore JM. The challenge of maintaining coronary arterial patency with intravenous heparin following tissue plasminogen activator administration. *Cardiology* 1993;83:100-106.
- 258.** Saliba MJ, Covell JW, Bloor CM. Effects of heparin in large doses on the extent of myocardial ischemia after acute coronary occlusion in the dog. *The American Journal of Cardiology* 1976;37:599-604.
- 259.** Black SC, Gralinski MR, Friedrichs GS, Kilgore KS, Driscoll EM, Lucchesi SR. Cardioprotective effects of heparin or N-acetylheparin in an in vivo model of myocardial ischaemic and reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 1995;29:629-636.
- 260.** Rodén L. Highlights in the history of heparin. In: Lane DA LU, ed. Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications. Boca Raton: CRC Press, 1989:1-23.
- 261.** Holmer E. Low-molecular weight heparin. In: DA L, Lindahl U, eds. Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications. Boca Raton: CRC Press, 1989:575-595.
- 262.** Turpie A. Anticoagulant therapy after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990;65:20C.
- 263.** Bjork I, Lindahl U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Mol Cell Biochem* 1982;48 No 3:161-182.

264. Thunberg L, Backstrom G, Lindahl U. Further characterization of antithrombin-binding sequence in heparin. *Card Res* 1982;100:393-410.
265. Rosenberg R, Bauer K. The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. Philadelphia: J.B. Lippincott company, 1994:837-860.
266. Lindahl U, Thunberg L, Backström G, Riesenfeld J, Nordling K, Björk I. Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. *J Biol Chem* 1984;259:12368-12376.
267. Tollefsen D, Majerus D, Blank M. Heparin cofactor II. Purification and properties of thrombin in human plasma. *J Biol Chem* 1982;257 No 5:2162-2169.
268. Maimone M, Tollefsen D. Activation of heparin cofactor II by heparin oligosaccharides. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;152:1056-1061.
269. Andersson L, Barrowcliffe T, Holmer E, Johnson E, Sims G. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel filtration. *Thromb Res* 1976;9 No 6:575-583.
270. Johnson E, Kirkwood T, Stirling Y, Perez-Requejo J. Four heparin preparations: Anti-Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection. *Thromb Haemost* 1976;35 No 3:586-591.
271. Carter C, Kelton J, Hirsh J, Cerskus A, Santos A, Gent M. The relationship between the hemorragic and antithrombotic properties of low molecular weight heparin and pentosan polysulphate on haemostasis and platelets in vivo. *Blood* 1982;59 No 6:1239-1245.
272. Holmer E, Matsson C, Nilsson S. Anticoagulant and antithrombotic effects of low molecular weight heparin fragments in rabbits. *Thromb Res* 1982;25 No 6:475-485.
273. Bergqvist D, Nilsson B, Hedner U, Pedersen P, Ostergaard P. The effects of heparin fragments of different molecular weight in experimental thrombosis and haemostasis. *Thromb Res* 1985;38 No 6:589-601.

274. Siragusa S, Cosmi B, Piovella F, Hirsch J, Ginsberg J. Low-molecular-weight heparins and unfractionated heparin in the treatment of patients with acute venous thromboembolism: results of a meta-analysis. *Am J Med* 1996;100:269-277.
275. Lindahl U, Lidholt K, Spillmann D, Kjellén L. More to heparin than anticoagulation. *Thrombosis Research* 1994;75 No 1:1-32.
276. Zammit A, Pepper DS, Dawes J. Interaction of immobilised unfractionated and LMW heparins with proteins in whole human plasma. *Thrombosis and Haemostasis* 1993;70 No 6:951-958.
277. Redini F, Tixier J, Petitou M, Choay J, Robert L, Hornebeck W. Inhibition of leukocyte elastase by heparin and its derivatives. *Biochem J* 1988;252:515-519.
278. Edens R, Linhardt R, Weiler J. Heparin is not just an anticoagulant anymore: six and one-half decades of studies on the ability of heparin to regulate complement activity. Basel, Switzerland: Karger S, 1993:96-120.
279. Friedrichs G, Kilgore K, Manley P, Gralinski M, Lucchesi B. Effects of heparin and N-acetyl heparin on ischemia/reperfusion-induced alterations in myocardial function in the rabbit isolated heart. *Circ Res* 1994;75:701-710.
280. Homeister J, Satoh P, Lucchesi B. Effects of complement components. *Circ Res* 1992;71:303-309.
281. Silvestro L, Viano I, Macario M, Colangelo D, Montrucchio G, Panico S, Fantozzi R. Effects of heparin and its desulfated derivatives on leukocyte-endothelial adhesion. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1994;20 No 3:254-285.
282. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993;82 No 11:3253-3258.
283. Skinner M, Lucas C, Burns G, Chesterman C, Berndt M. GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *J Biol Chem* 1991;266:5371-5374.

284. Bevilacqua M, Nelson R, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 1994;45:361-378.
285. Saliba M, Saliba R. Heparin in burns: dose related and dose dependent effects. *Throm Diath Haemorrh* 1975;33:113-123.
286. Yanaka K, Spellman SR, McCarthy JB, Jr. TRO, Low WC, Camarata PJ. Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. I. Protective mechanism. *J Neurosurg* 1996;85:1102-1107.
287. Kitamura N, Yamaguchi M, Shimabukuro K, Miyasaka M, Nakano H, Kumada K. Heparin-like glycosaminoglycans inhibit leukocyte adhesion to endotoxin-activated human vascular endothelial cells under nonstatic conditions. *European surgical research* 1996;28:428-435.
288. Bonmann E, Juttler E, Krestel H, Spranger M. Heparin inhibits induction of nitric oxide synthase by cytokines in rat brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett* 1998;253 No 2:95-98.
289. Sternbergh W, Makhoul R, Adelman B. Heparin prevents postischemic endothelial cell dysfunction by a mechanism independent of its anticoagulant activity. *J Vasc Surg* 1993;17:318-327.
290. Sternbergh W, Makhoul R, Adelman B. Heparinoids with low anticoagulant potency attenuate postischemic endothelial cell dysfunction. *J Vasc Surg* 1995;17:318-327.
291. Kouretas P, Kim Y, Cahill P, Myers A, To L, Wang Y, Wallace R, Kron I, Hannan R. Heparin preserves nitric oxide activity in coronary endothelium during ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1998;66 No 4:1210-1215.
292. Kouretas P, Hannan R, Kapur N, Hendrickson R, Redmond E, Myers A, Kim Y, Cahill P, Sitzmann J. Non-anticoagulant heparin increases endothelial nitric oxide synthase activity: role of inhibitory guanine nucleotide proteins. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30 No 12:2669-2682.

- 293.** Kouretas P, Kim Y, Cahill P, Myers A, To L, Wang Y, Sitzmann J, Hannan R. Nonanticoagulant heparin prevents coronary endothelial dysfunction after brief ischemia-reperfusion injury in the dog. *Circulation* 1999;99 No 8:1062-1068.
- 294.** Upchurch G, Welch G, Freedman J, Fabian A, Pigazzi A, Scribner A, Alpert C, Keaney J, Loscalzo J. High-dose heparin decreases nitric oxide production by cultured bovine endothelial cells. *Circulation* 1997;95:2115-2121.
- 295.** Grant D, Long W, Williamson F. Pericellular heparans may contribute to the protection of cells from free radicals. *Med Hypotheses* 1987;23 no 1:67-71.
- 296.** Karlsson K, Marklund S. Heparin-, dextran sulfate- and protamine-induced release of extracellular-superoxide dismutase to plasma in pigs. *Biochim Biophys Acta* 1988;967 No 1:110-114.
- 297.** Karlsson K, Marklund S. Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochem J* 1987;242:55-59.
- 298.** Hiebert L, Liu J. Heparin protects cultured arterial endothelial cells from damage by toxic oxygen metabolites. *Atherosclerosis* 1990;83 No 1:47-51.
- 299.** Xiao Z, Thérroux P. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation* 1998;97:251-256.
- 300.** Harenberg J, Malsch R, Piazzolo L, Huhle G, Heene D. Analysis of heparin binding to human leukocytes using a fluorescein-5-isothiocyanate labeled heparin fragment. *Cytometry* 1996;23:59-66.
- 301.** Investigators T. Dose-ranging trial of enoxaparin for unstable angina: Results of TIMI 11A. *JACC* 1997;29 No 7:1474-1482.
- 302.** Blajchman M, Young E, Ofosu F. Effects of unfractionated heparin, dermatan sulfate and low molecular weight heparin on vessel wall permeability in rabbits. New York, NY: The New York Academy of Sciences, 1989:245-254.

303. Young E, Cosmi B, Weitz J, Hirsh J. Comparison of the non-specific binding of unfractionated heparin and low molecular weight heparin (enoxaparin) to plasma proteins. *Thrombosis and Haemostasis* 1993;70 No 4:625-630.
304. Hunt D. Low-molecular-weight heparins in clinical practice. *Southern Medical Journal* 1998;91 No 1:2-10.
305. Leadley RJ, Kasiewski CJ, Bostwick JS, Bentley R, McVey MJ, White FJ, Perrone MH, Dunwiddie CT. Comparison of enoxaparin, hirulog, and heparin as adjunctive antithrombotic therapy during thrombolysis with rtPA in the stenosed canine coronary artery. *Thrombosis Haemostasis* 1997;78:1278-1285.
306. Cohen M, Demers C, Gurfinkel EP, Turpie AGG, Fromell GJ, Goodman S, Langer A, Califf RM. A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for unstable coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997;337:447-452.
307. Colman R, Marder V, Salzman E, Hirsh J. Overview of hemostasis. Philadelphia: JB Lippincott, 1994:3-18.
308. Hynes R. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
309. Théroux P, Kouz S, Roy L, Knudtson M, Diodati J, Marquis J-F, Nasmith J, Fung A, Boudreault J-R, Delage F, Dupuis R, Kells C, Bokslag M, Steiner B, Rapold H. Platelet membrane receptor glycoprotein IIb/IIIa antagonism in unstable angina. The canadian lamifiban study. *Circulation* 1996;94:899-905.
310. Frishman W, Miller K. Platelets and antiplatelet therapy in ischemic heart disease. *Curr Probl Cardiol* 1986;11:73-136.
311. Garcia-Dorado D, Théroux P, Tornos P, Sambola A, Oliveras J, Santos M, Soler J. Previous aspirin use may attenuate the severity of the manifestation of acute ischemic syndromes. *Circulation* 1995;92:1743-1748.
312. Smith J, Willis A. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature New Biol* 1971;231:235-237.

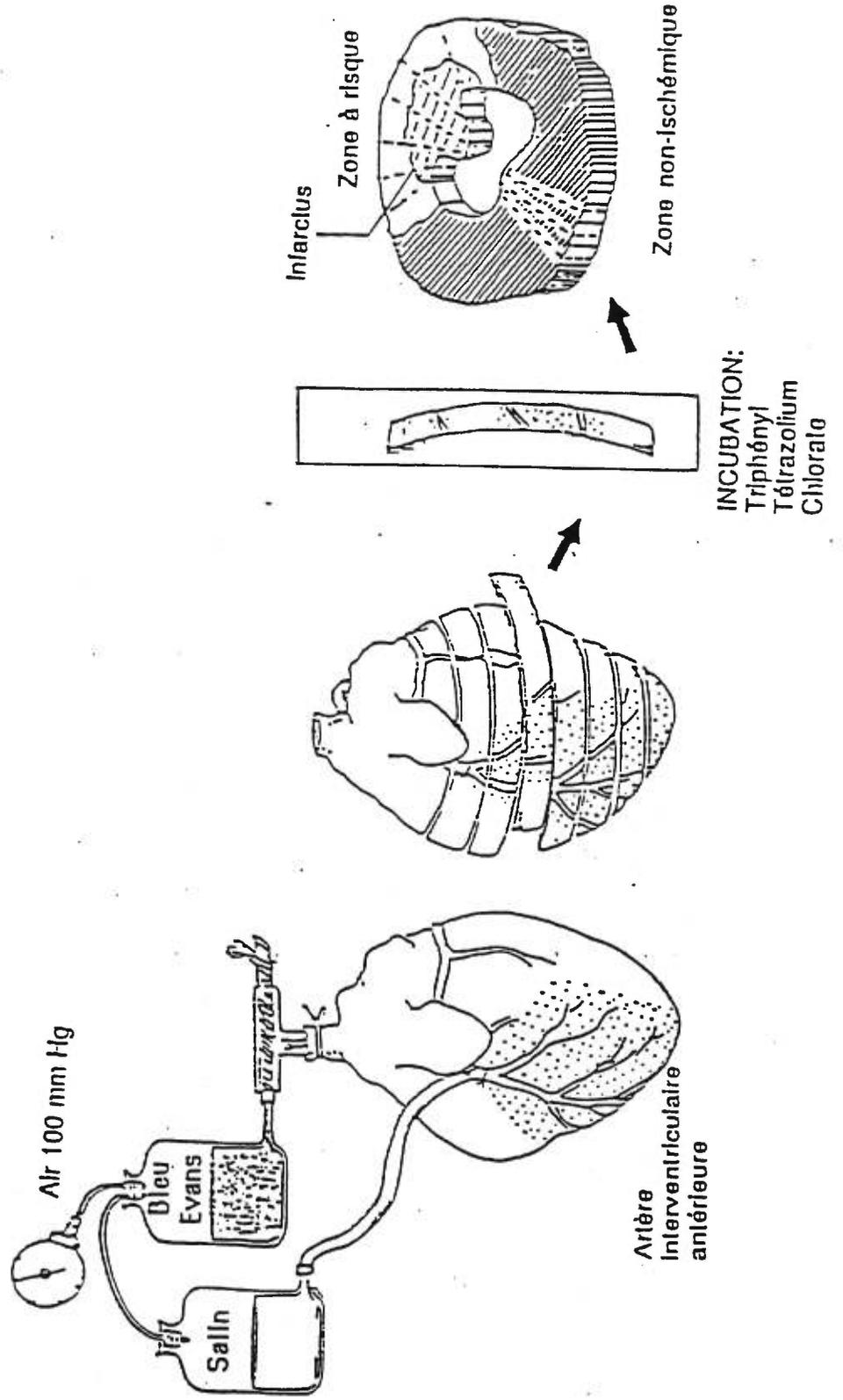
313. Moran N, Fitzgerald G. Mechanisms of action fo antiplatelet drugs. Philadelphia: JB Lippincott, 1994:1623-1637.
314. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cummulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* 1982;69:1366-1372.
315. Kelton J, Hirsh J, Carter C, Buchanan M. Thrombogenic effect of high-dose aspirin in rabbits. Relationship to inhibition of vessel wall synthesis of prostaglandin I<sub>2</sub>-like activity. *J Clin Invest* 1978;62:892-895.
316. Vane J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol* 1971;231:232-235.
317. Cronstein B, Stouwe MVd, Druska L, Levin R, Weissmann G. Nonsteroidal anti-inflammatory agents inhibit stimulated neutrophil adhesion to endothelium: adenosine dependent and independent mechanisms. *Inflammation* 1994;18:323-335.
318. Cronstein B, Duguma L, Nicholls D, Hutchinson A, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved. Human neutrophils possess goth A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors which promote chemotaxis and inhibit O<sup>-2</sup>, respectively. *J Clin Invest* 1990;85:1150-1157.
319. Haynes D, Wright P, Gadd S, house MW, Vernon-Roberts B. Is aspirin a prodrug for antioxidant and cytokine-modulating oxymetabolites? *Agents Actions* 1993;39:49-58.
320. Group I-C. Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17, 187 cases of suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1988;2:349-360.
321. Serebruany V, BAhr R, O'Connor C, Lowry D, Gurbel P. Antecedent aspirin therapy inhibits baseline platelet activity in patients presenting with acute myocardial infarction. *Cardiology* 1998;90:37-42.

322. Yao S, Benedict C, Rosolowsky M, McNatt J, Falinska B, Campbell W, Buja L, Willerson J. Effect of aspirin on local prostaglandin production and serotonin accumulation in a canine model with coronary cyclic flow variation or thrombosis. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:473-482.
323. Maalej N, Folts J. Increased shear stress overcomes the antithrombotic platelet inhibitory effect of aspirin in stenosed dog coronary arteries. *Circulation* 1996;93:1201-1205.
324. Collier R. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995;92:2373-2380.
325. Kieffer N, Phillips D. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:329-357.
326. Mousa S, DeGrado W, Mu D, Kapil R, Lucchesi B, Reilly T. Oral antiplatelet, antithrombotic efficacy of DMP 728, a novel platelet GPIIb/IIIa antagonist. *Circulation* 1996;93:537-543.
327. Sudo Y, Kilgore K, Lucchesi B. Monoclonal antibody [7E3 F (ab')<sub>2</sub>] prevents arterial but not venous rethrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:241-250.
328. Topol E. Prevention of cardiovascular ischemic complications with new platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Am Heart J* 1995;130:666-672.
329. Lefkovits J, Topol E. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in coronary artery disease. *Eur Heart J* 1996;17:9-18.
330. Rousseau G, St-Jean G, Latour J-G, Merhi Y, Nattel S, Waters D. Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium. *Cardiovascular Research* 1991;25 No 4:319-329.
331. Rousseau G, Provost P, Latour J-G. Sustained myocardial protection by diltiazem (TA-3090) after a 90-minute coronary occlusion and 72 hours of reperfusion in dogs with collateral flow. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1993;22:264-272.

- 332.** Rousseau G, Provost P, Tran D, Caillé G, Latour J-G. Clentiazem given at reperfusion improves subendocardial reflow and reduces myocardial infarct size in the dog. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1994;268 No 3:1252-1260.
- 333.** Klein H, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Pathol. Anat.* 1981;393:287-297.
- 334.** Szasz G, Gruber W, Bernt E. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem* 1976;22 No 5:650-656.
- 335.** Jia Y, Sato S. Evaluation of coronary collateral circulation in early ischemia in rat hearts. A morphological study. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1997;64 No 4:329-336.
- 336.** Ward P, Cunningham T, McCulloch K. Platelet enhancement of O<sub>2</sub>-responses in stimulated human neutrophils. Identification of platelet factor as adenine nucleotide. *Lab Invest* 1988;58:37-47.
- 337.** McEver R, Moore K, Cummings R. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995;270:11025-11028.
- 338.** Lefer DJ, Flynn DM, Phillips ML, Ratcliffe M, Buda AJ. A novel Sialyl Lewis<sup>x</sup> Analog attenuates neutrophil accumulation and myocardial necrosis after ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994;90:2390-2401.
- 339.** Weyrich A, Ma X, Lefer D, Albertine K, Lefer A. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993;91:2620-2629.
- 340.** group TTS. Comparison of invasive and conservative strategies after treatment with intravenous tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1989;320:618-627.
- 341.** Hansen J, Sandset P, Huseby K, Huseby N, Bendz B, Ostergaard P, Nordoy A. Differential effect of unfractionated heparin and low molecular weight heparin on intravascular tissue factor pathway inhibitor: evidence for a difference in antithrombotic action. *Br J Haematol* 1998;101 No 4:638-646.

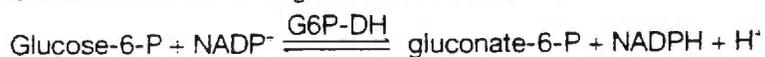
# ANNEXES

Illustration de la méthode de quantification de l'infarctus et de la zone à risque :



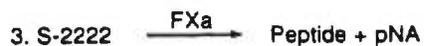
## Principe du dosage des créatines kinases avec l'appareil BM-Hitachi 917

### Principe



## Principe du dosage du facteur anti-Xa avec le test COTEST Heparin

### 1. PRINCIPLE



## REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent d'abord à mes parents et à mon collègue de travail, Jean-François Théorêt, qui m'ont apporté énergie et encouragements au cours de ma maîtrise et plus particulièrement pendant l'écriture ardue de ce mémoire. Merci à Robin pour sa patience et sa compréhension à tous les niveaux.

J'aimerais chaleureusement remercier Dr Guy Rousseau et Monsieur Robert Clément pour leur précieuse collaboration apportée lors des travaux. Merci également à Dr Louis Perrault qui m'a conseillé lors de la rédaction de cette ouvrage et qui m'a permis de prendre quelques moments de répit.

***Dare to dream. Dare to try. Dare to fail. Dare to succeed.***

***Go ahead. I dare you!***

***La persévérance est plus précieuse que l'habileté.***