

Université de Montréal

Protection de la fonction endothéliale coronaire par le préconditionnement  
ischémique lors de l'ischémie et de la reperfusion

par

Jean-François Bouchard

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D)

en pharmacodynamie biochimique

décembre, 1999

©Jean-François Bouchard, 1999



QV  
705  
U58  
2000  
v.007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
Protection de la fonction endothéliale coronaire par le préconditionnement  
ischémique lors de l'ischémie et de la reperfusion

présentée par :  
Jean-François Bouchard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Albert Adam, Ph.D	président du jury
Daniel Lamontagne, Ph.D	directeur de recherche
Pierre Moreau, Ph.D.	membre du jury
John Kingma, Ph.D	examineur externe
François Peronnet, Ph.D.	représentant du doyen

Thèse acceptée le :

## SOMMAIRE

La présente thèse traite d'un mécanisme protecteur développé par l'organisme au fil de l'évolution. Ce mécanisme adaptatif protégeant le cœur et divers organes contre les effets délétères de l'ischémie et de la reperfusion fut nommé préconditionnement ischémique (PCI). En fait au milieu des années 80, Murry et ses collaborateurs découvrirent que le fait d'exposer le cœur à de courtes périodes d'ischémie pouvait le protéger contre une ischémie subséquente d'intensité supérieure. Ainsi, exposer le cœur à une courte période d'ischémie entraîne la libération de plusieurs médiateurs qui agissent comme agents cardioprotecteurs. Mais au début de nos travaux peu était connu sur l'effet que pouvait produire ce phénomène et ses médiateurs au niveau de la protection de la fonction endothéliale coronaire. Donc au fil des années, nous nous sommes employés à vérifier si le PCI était reproductible au niveau de la fonction endothéliale et à découvrir quels étaient les mécanismes impliqués dans ce phénomène adaptatif.

La première partie de nos travaux porta sur la reproductibilité de ce phénomène dans nos conditions expérimentales. Pour ce faire, nous avons développé un modèle expérimental chez le cœur de rat isolé perfusé à débit constant où nous avons vérifié la fonction endothéliale et celle du muscle lisse à l'aide respectivement de vasodilatateur dépendant (la sérotonine) ou indépendant (le nitroprussiate de sodium) de l'endothélium. L'intensité et la durée de l'ischémie furent ajustées afin d'affecter uniquement la vasodilatation à la sérotonine, c'est à dire celle dépendante de l'endothélium.

Dès lors, il devenait possible à partir de ce modèle expérimental, d'évaluer les mécanismes impliqués dans le PCI. Le premier médiateur étudié fut l'adénosine. En effet, au niveau du myocarde, l'adénosine avait été rapportée comme possédant des effets cardioprotecteurs. Cet effet protecteur fut reproductible dans nos conditions. Ainsi, l'adénosine semble protéger la fonction endothéliale contre les effets délétères de l'ischémie et de la reperfusion.



Par la suite, nous voulions tester si le PCI était également reproductible dans un modèle pathologique où des modifications de la réactivité vasculaire furent rapportées par le passé. En effet, certains avaient rapporté que chez le rat dans un modèle de diabète induit par l'injection de streptozotocine, la vasodilatation dépendante de l'endothélium était diminuée. Nos résultats démontrèrent que le PCI et que l'adénosine étaient également protecteurs chez ces rats diabétiques mais que cette protection semblait plus difficile à obtenir. En effet, une seule période d'ischémie ou quinze minutes de perfusion d'adénosine se sont avérées insuffisantes pour protéger la fonction endothéliale contre les dommages occasionnés par l'ischémie et la reperfusion chez le rat diabétique, contrairement au rat témoin.

La contribution de divers autres médiateurs probables du PCI fut évaluée. Parmi eux, nous retrouvons : les kinines, les prostaglandines et les cannabinoïdes. Par le passé, plusieurs auteurs ont observé, au niveau de la cardioprotection induite par le PCI, une participation des kinines endogènes particulièrement celle de la bradykinine et de son récepteur B<sub>2</sub>. Dans nos travaux, nous avons démontré que le PCI produit son effet protecteur au niveau de la fonction endothéliale via une libération de kinines mais, cette fois-ci, cette réponse semble être produite uniquement par l'activation du récepteur B<sub>1</sub>. C'est d'ailleurs la première fois qu'il était rapporté que l'activation du récepteur B<sub>1</sub> participait à l'action bénéfique du PCI.

Il y a quelques années, certaines équipes démontrèrent que la protection cardiaque induite par le PCI activait également la voie des prostaglandines. Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé que cette protection impliquait aussi les produits de la cascade de la cyclooxygénase et, pour la première fois, tout particulièrement la prostaglandine E<sub>2</sub>.

On a également rapporté que d'autres produits dérivés des acides gras tels : l'arachidonylethanolamide (AEA), le palmitoylethanolamide (PEA) et le sn-2 arachidonyleglycerol (2-AG) pouvaient être naturellement produits par la membrane cellulaire de divers organes. Au niveau du système nerveux central, ces agents se lient aux récepteurs des cannabinoïdes et possèdent une activité immunosuppressive et agissent comme antioxydants. Pour l'instant, leur effet au niveau cardiaque demeure inconnu, mais toutes ces propriétés font de ces agents d'excellents candidats pour la cardioprotection. C'est pour cette raison que nous avons étudié leur implication dans le PCI. Au cours de nos travaux, nous avons démontré que le PCI était produit en partie par l'activation des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> aux cannabinoïdes.

Maintenant que nous avons déterminé quelques médiateurs, nous voulions savoir quels mécanismes étaient impliqués dans ce phénomène. Au niveau du myocarde, les mécanismes qui semblent des points de convergence du PCI sont les canaux potassiques dépendants de l'ATP et les protéine kinases C. Dans nos conditions expérimentales, les canaux potassiques dépendants de l'ATP et les protéine kinases C semblent impliqués dans la protection de la fonction endothéliale induite par le PCI. Les canaux potassiques dépendants de l'ATP semblent activés par la voie de l'adénosine mais non par celle de la prostaglandine E<sub>2</sub>. De leur côté, les protéine kinases sont activées par la des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine et par la prostaglandine E<sub>2</sub>. Pour l'instant, les voies de signalisation intracellulaire activées par les cannabinoïdes endogènes lors du PCI restent inconnues.

En résumé, au cours de cette thèse, nous avons démontré que le PCI protège la fonction endothéliale coronaire du rat contre les dommages provoqués par l'ischémie et la reperfusion tant chez l'animal sain que chez l'animal diabétique. À l'intérieur de ces deux modèles, l'adénosine représente un des médiateurs du PCI. Chez l'animal non diabétique, les kinines sont impliquées dans le PCI. Nos travaux démontrent pour la première fois la participation des prostaglandines E<sub>2</sub>,

de la des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine et des cannabinoïdes endogènes à cette réponse protectrice. L'effet protecteur du PCI sur la fonction endothéliale est médié par les récepteurs à l'adénosine, les récepteurs B<sub>1</sub> aux kinines, les récepteurs EP aux prostaglandines ainsi que les récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> aux cannabinoïdes. De plus, les protéine kinases C ainsi que les canaux potassiques dépendants de l'ATP semblent contribuer à cette réponse.

TABLE DES MATIÈRES	
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XV</b>
<b>SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XIX</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>XXIV</b>
CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
<b><i>1.1 LE MYOCARDE.....</i></b>	<b>2</b>
1.1.1 Pathogenèse de l'effet délétère de l'ischémie sur le myocarde .....	2
1.1.2 Reperfusion cardiaque et effets délétères associés à la reperfusion ..	4
<b><i>1.2 L'ENDOTHELIUM CORONAIRE.....</i></b>	<b>6</b>
1.2.1 Facteurs synthétisés par l'endothélium.....	6
<b>1.2.1.1 Facteurs vasodilatateurs.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1.2 Facteurs vasoconstricteurs.....</b>	<b>9</b>
1.2.2 Pathologies impliquant une dysfonction endothéliale .....	11
1.2.3 Le rôle de l'endothélium dans le remodelage vasculaire.....	13
1.2.4 Le rôle de l'endothélium dans la coagulation.....	14

1.2.5 Dysfonction endothéliale et infarctus du myocarde.....	16
<b>1.3 INTERVENTIONS CARDIOPROTECTRICES.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 PRÉCONDITIONNEMENT ISCHÉMIQUE.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Historique.....	19
1.4.2 La « seconde fenêtre » du préconditionnement ischémique .....	21
1.4.3 Les fonctions physiologiques affectées par le préconditionnement ischémique et leurs conséquences.....	22
<b>1.4.3.1 Ralentissement de la déplétion des taux d'ATP .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.3.2 Récupération de la fonction contractile .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.3.3 Altérations électrocardiographiques.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.3.4 Effets vasculaires.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.3.5 L'agrégation plaquettaire .....</b>	<b>26</b>
1.4.4 Modèles pathologiques ou sénescents .....	26
<b>1.4.4.1 Modèles pathologiques.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.4.2 Modèles d'animaux sénescents .....</b>	<b>27</b>
1.4.5 Les mécanismes proposés impliqués dans le préconditionnement ischémique .....	28
<b>1.4.5.1 Hypothèse anatomique .....</b>	<b>28</b>
1.4.5.1.1 Vaisseaux collatéraux .....	28
1.4.5.1.2 Étourdissement ( <i>stunning</i> ) du myocarde .....	28

1.4.5.1.3 Effet anti-inflammatoire.....	29
<b>1.4.5.2 Hypothèse des mécanismes moléculaires .....</b>	<b>30</b>
<b>1.4.5.3 Médiateurs impliqués ou probablement impliqués dans le préconditionnement ischémique .....</b>	<b>30</b>
1.4.5.3.1 Adénosine .....	30
1.4.5.3.2 Les catécholamines .....	34
1.4.5.3.3 Les kinines .....	35
1.4.5.3.4 Le monoxyde d'azote.....	36
1.4.5.3.5 Les prostaglandines.....	36
1.4.5.3.6 Les cannabinoïdes .....	37
1.4.5.3.7 Les opiacés.....	37
<b>1.4.5.4 L'amplification du signal engendré par le préconditionnement ischémique .....</b>	<b>39</b>
1.4.5.4.1 Les protéines G .....	39
1.4.5.4.2 Les protéine kinases C .....	39
1.4.5.4.3 Phospholipases D et tyrosine kinases .....	42
1.4.5.4.4 Mitogen-activated protein kinases .....	43
1.4.5.4.5 5'-nucléotidase et preconditionnement ischémique .....	44
1.4.5.4.6 Le rôle joué par le calcium.....	45

<b>1.4.5.5 Mécanismes effecteurs du préconditionnement ischémique</b>	<b>45</b>
1.4.5.5.1 Les canaux potassiques dépendants de l'ATP .....	45
<b>1.5 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL</b> .....	<b>48</b>
1.5.1 Reproductibilité du préconditionnement ischémique et implication des canaux potassiques dépendants de l'ATP au niveau de l'endothélium .....	49
1.5.2 Reproductibilité du préconditionnement ischémique dans un modèle pathologique, le diabète .....	49
1.5.3 Implication des kinines dans le préconditionnement ischémique au niveau de l'endothélium.....	50
1.5.4 Implication des prostaglandines dans la protection endothéliale induite par le préconditionnement ischémique .....	51
1.5.5 Implication des cannabinoïdes endogènes dans le préconditionnement ischémique .....	52
<b>1.6 OBJECTIFS GÉNÉRAL ET SPÉCIFIQUES</b> .....	<b>53</b>
 CHAPITRE DEUX : MECHANISMS OF PROTECTION AFFORDED BY PRECONDITIONING TO ENDOTHELIAL FUNCTION AGAINST ISCHEMIC. ....	
<b>2.1 ABSTRACT</b> .....	<b>54</b>
<b>2.2 INTRODUCTION</b> .....	<b>55</b>
<b>2.3 METHODS</b> .....	<b>56</b>
<b>2.4 RESULTS</b> .....	<b>59</b>
<b>2.5 DISCUSSION</b> .....	<b>60</b>

CHAPITRE TROIS : PROTECTION AFFORDES BY PRECONDITIONING TO THE DIABETIC HEART AGAINST ISCHAEMIC.....	70
<b>3.1 ABSTRACT</b> .....	70
<b>3.2 INTRODUCTION</b> .....	71
<b>3.3 METHODS</b> .....	72
<b>3.4 RESULTS</b> .....	75
<b>3.5 DISCUSSION</b> .....	78
CHAPITRE QUATRE : ROLE OF KININS IN THE ENDOTHELIAL PROTECTIVE EFFECT OF ISCHAEMIC PRECONDITIONING. ....	90
<b>4.1 ABSTRACT</b> .....	90
<b>4.2 INTRODUCTION</b> .....	91
<b>4.3 METHODS</b> .....	92
<b>4.4 RESULTS</b> .....	95
<b>4.5 DISCUSSION</b> .....	99
CHAPITRE CINQ : PARTICIPATION OF PROSTAGLANDIN E2 IN THE ENDOTHELIAL PROTECTIVE EFFECT OF ISCHAEMIC PRECONDITIONING IN ISOLATED RAT HEART. .....	110
<b>5.1 ABSTRACT</b> .....	110
<b>5.2 INTRODUCTION</b> .....	111
<b>5.3 METHODS</b> .....	112



<b>5.4 RESULTS</b> .....	117
<b>5.5 DISCUSSION</b> .....	121
CHAPITRE SIX: ISCHEMIC PRECONDITIONING IN ISOLATED RAT HEART IS MEDIATED BY ENDOGENOUS CANNABINOIDS. ....	132
<b>6.1 ABSTRACT</b> .....	132
<b>6.2 INTRODUCTION</b> .....	133
<b>6.3 METHODS</b> .....	134
<b>6.4 RESULTS</b> .....	138
<b>6.5 DISCUSSION</b> .....	141
CHAPITRE SEPT : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS.....	149
<b>7.1 Implication probable des canaux potassiques dépendants de l'ATP mitochondriaux</b> .....	151
<b>7.2 Interaction probable entre les kinines et de les prostaglandines</b> .....	153
<b>7.3 Participation des Mitogen Activated Protein Kinases et des tyrosine kinases</b> .....	154
<b>7.4 Mécanismes impliqués lors de l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes</b> .....	155
<b>7.5 Limitations du modèle de cœur isolé dans le préconditionnement ischémique</b> .....	157
<b>7.6 Application clinique du préconditionnement ischémique et de ses mécanismes</b> .....	159

<b>7.7 Préconditionnement du cœur humain</b> .....	159
7.7.1 Première évidence : l'angioplastie .....	159
7.7.2 L'angine , une adaptation « physiologique » à l'ischémie.....	160
<b>7.8 Utilisation du préconditionnement ischémique comme traitement des maladies ischémiques cardiaques</b> .....	162
7.8.1 Utilisation du préconditionnement ischémique dans un contexte chirurgical.....	162
7.8.2 Induction pharmacologique du préconditionnement ischémique ..	163
<b>7.9 Utilisation du préconditionnement ou de ses médiateurs dans la prévention de la dysfonction endothéliale chez l'humain</b> .....	165
<b>7.10 CONCLUSIONS</b> .....	166
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	168
<b>ANNEXE I CURRICULUM VITAE</b> .....	XXV

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.I PARAMÈTRES PROTÉGÉS PAR LE PRÉCONDITIONNEMENT ISCHÉMIQUE .....	23
TABLEAU II.I EFFECT OF U-46619 0.1 $\mu$ M INFUSION ON CORONARY RESISTANCE	65
TABLEAU II.II EFFECT OF 5-HT 10 $\mu$ M AND SNP 3 $\mu$ M ON PERFUSION PRESSURE, AND CORONARY RESISTANCE.....	66
TABLEAU III.I EFFECT OF U-46619 0.1 $\mu$ M INFUSION ON CORONARY RESISTANCE	84
TABLEAU IV.I EFFECT OF U-46619 0.1 $\mu$ M INFUSION ON CORONARY RESISTANCE .....	104

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : FACTEURS VASOACTIFS PRODUITS PAR L'ENDOTHÉLIUM .....	8
FIGURE 1.2 : COMPLICATIONS DE LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE .....	12
FIGURE 1.3: MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE PRÉCONDITIONNEMENT ISCHÉMIQUE .....	31
FIGURE 2.1: DIAGRAM SHOWING THE DIFFERENT EXPERIMENTAL PROTOCOLS.....	67
FIGURE 2.2: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE PRODUCED BY 10 $\mu$ M SEROTONIN IN UNTREATED HEARTS AND IN HEARTS TREATED WITH EITHER 0.3 $\mu$ M GLIBENCLAMIDE OR 5 $\mu$ M 8-PHENYLTHEOPHYLLINE .....	68
FIGURE 2.3: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE PRODUCED BY 3 $\mu$ M SODIUM NITROPRUSSIDE IN UNTREATED HEARTS AND IN HEARTS TREATED WITH EITHER 0.3 $\mu$ M GLIBENCLAMIDE OR 5 $\mu$ M 8-PHENYLTHEOPHYLLINE .	69
FIGURE 3.1: DIAGRAMS SHOWING THE DIFFERENT EXPERIMENTAL PROTOCOLS.....	85
FIGURE 3.2: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE INDUCED BY 10 $\mu$ M SEROTONIN AND 3 $\mu$ M SODIUM NITROPRUSSIDE IN NON-DIABETIC HEARTS .....	86
FIGURE 3.3 CHANGE IN $dP/dT_{MAX}$ ( $\Delta\%$ ) OBSERVED DURING 30 MIN PARTIAL ISCHAEMIA (1 ML MIN <sup>-1</sup> ) AND 20 MIN REPERFUSION IN NON-DIABETIC AND IN DIABETIC HEARTS.....	87

FIGURE 3.4: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE (%) INDUCED BY 10 $\mu$ M SEROTONIN (5-HT) AND 3 $\mu$ M SODIUM NITROPRUSSIDE (SNP) IN NON-DIABETIC AND IN DIABETIC HEARTS. ....	88
FIGURE 3.5: CHANGE IN DP/DT <sub>MAX</sub> ( $\Delta$ %) OBSERVED DURING 30 MIN PARTIAL ISCHAEMIA (1 ML MIN <sup>-1</sup> ) AND 20 MIN REPERFUSION IN NON-DIABETIC AND IN DIABETIC HEARTS .....	89
FIGURE 4.1: DIAGRAMS SHOWING THE DIFFERENT EXPERIMENTAL PROTOCOLS.	105
FIGURE 4.2: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE ( $\Delta$ %) INDUCED BY 10 $\mu$ M SEROTONIN AND 3 $\mu$ M SODIUM NITROPRUSSIDE IN CONTROL HEARTS, IN HOE 140 PRETREATED HEARTS, AND IN [LYS <sup>0</sup> ,LEU <sup>8</sup> ,DES-ARG <sup>9</sup> ]-BRADYKININ (LLDBK) PRETREATED HEARTS .....	106
FIGURE 4.3: CHANGE IN DP/DT <sub>MAX</sub> ( $\Delta$ %) OBSERVED DURING 30 MIN LOW-FLOW ISCHAEMIA (1 ML MIN <sup>-1</sup> ) AND 20 MIN REPERFUSION IN UNTREATED, HOE 140 AND IN [LYS <sup>0</sup> ,LEU <sup>8</sup> ,DES-ARG <sup>9</sup> ]-BRADYKININ (LLDBK) PRETREATED HEARTS. ....	107
FIGURE 4.4: CHANGE IN DP/DT <sub>MIN</sub> ( $\Delta$ %) OBSERVED DURING 30 MIN LOW-FLOW ISCHAEMIA (1 ML MIN <sup>-1</sup> ) AND 20 MIN REPERFUSION IN UNTREATED, HOE 140 AND IN [LYS <sup>0</sup> ,LEU <sup>8</sup> ,DES-ARG <sup>9</sup> ]-BRADYKININ (LLDBK) PRETREATED HEARTS. ....	108
FIGURE 4.5: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE ( $\Delta$ %) INDUCED BY 10 $\mu$ M SEROTONIN AND 3 $\mu$ M SODIUM NITROPRUSSIDE IN BRADYKININ (BK) PRETREATED HEARTS, AND IN DES-ARG <sup>9</sup> -BRADYKININ (DBK) PRETREATED HEARTS.....	109
FIGURE 5.1: DIAGRAMS SHOWING THE DIFFERENT EXPERIMENTAL PROTOCOLS....	126

- FIGURE 5.2: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE ( $\Delta\%$ ) INDUCED BY  $10\mu\text{M}$  SEROTONIN AND  $3\mu\text{M}$  SODIUM NITROPRUSSIDE IN UNTREATED HEARTS, AND IN  $10\mu\text{M}$  INDOMETHACIN PRETREATED HEARTS ..... 127
- FIGURE 5.3: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE ( $\Delta\%$ ) INDUCED BY  $10\mu\text{M}$  SEROTONIN AND  $3\mu\text{M}$  SODIUM NITROPRUSSIDE IN  $0.3\mu\text{M}$  GLIBENCLAMIDE PRETREATED HEARTS , AND IN  $1\mu\text{M}$  CHELERYTHRINE PRETREATED HEARTS ..... 128
- FIGURE 5.4: CORONARY EFFLUENT CONCENTRATION OF 6-KETO  $\text{PGF}_{1\alpha}$  (pM) AFTER STABILISATION PERIOD (T20), AT THE BEGINNING OF THE 5-MIN ZERO-FLOW ISCHAEMIA (T35), 10 MIN BEFORE LOW-FLOW ISCHAEMIA (T40), AT THE END OF THE LOW-FLOW ISCHAEMIA (T79) AND 30 SEC AFTER THE BEGINNING OF REPERFUSION (T80.5).. ..... 129
- FIGURE 5.5: CORONARY EFFLUENT CONCENTRATION OF  $\text{PGE}_2$  (pM) AFTER STABILISATION PERIOD (T20), AT THE BEGINNING OF THE 5-MIN ZERO-FLOW ISCHAEMIA (T35), 10 MIN BEFORE LOW-FLOW ISCHAEMIA (T40), AT THE END OF THE LOW-FLOW ISCHAEMIA (T79) AND 30 SEC AFTER THE BEGINNING OF REPERFUSION (T80.5) ..... 130
- FIGURE 5.6: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE ( $\Delta\%$ ) INDUCED BY  $10\mu\text{M}$  SEROTONIN AND  $3\mu\text{M}$  SODIUM NITROPRUSSIDE IN UNTREATED HEARTS , IN GLIBENCLAMIDE PRETREATED HEARTS, AND IN CHELERYTHRINE PRETREATED HEARTS ..... 131
- FIGURE 6.1: DIAGRAMS SHOWING THE DIFFERENT EXPERIMENTAL PROTOCOLS.. 145

FIGURE 6.2: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE ( $\Delta\%$ ) INDUCED BY 10 $\mu$ M SEROTONIN AND 3 $\mu$ M SODIUM NITROPRUSSIDE IN UNTREATED HEARTS , IN 1 $\mu$ M SR141716A AND IN 1 $\mu$ M AM630 PRETREATED HEARTS.....	146
FIGURE 6.3: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE ( $\Delta\%$ ) INDUCED BY 10 $\mu$ M SEROTONIN AND 3 $\mu$ M SODIUM NITROPRUSSIDE UNTREATED HEARTS (PANELS A AND B), AND IN 1 $\mu$ M SR144528 PRETREATED HEARTS...	147
FIGURE 6.4: CHANGE IN CORONARY RESISTANCE ( $\Delta\%$ ) INDUCED BY 10 $\mu$ M SEROTONIN AND 3 $\mu$ M SODIUM NITROPRUSSIDE IN ANANDAMIDE, IN PALMITOYLETHANOLAMIDE ,AND IN 2-ARACHIDONYLGLYCEROL (2-AG) PRETREATED HEARTS .....	148
FIGURE 7.1: MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA PROTECTION DE L'ENDOTHÉLIUM CORONAIRE DE RAT INDUITE PAR LE PRÉCONDITIONNEMENT ISCHÉMIQUE. RÉSUMÉ DES TRAVAUX PRÉSENTÉS DANS CETTE THÈSE. .....	150
FIGURE 7.2: INTERACTIONS MAJEURES PROBABLES ENTRE CHACUN DES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE PRÉCONDITIONNEMENT ISCHÉMIQUE AU NIVEAU DE L'ENDOTHÉLIUM. ....	152

## SIGLES ET ABRÉVIATIONS

<b>ACh :</b>	Acétylcholine
<b>AngII:</b>	Angiotensine II
<b>ADO:</b>	Adénosine
<b>ADP:</b>	Adénosine diphosphate
<b>AEA:</b>	Arachidonyléthanolamide
<b>AMPc:</b>	3', 5'-adenosine monophosphate
<b>ARN<sub>m</sub>:</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ATP:</b>	Adénosine triphosphate
<b>AngI:</b>	Angiotensine I
<b>BK:</b>	Bradykinine
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b>	Ion calcium
<b>5-HD:</b>	Acide 5-hydroxydécanoïque
<b>5-HT:</b>	5-hydroxytryptamine (sérotonine)
<b>CK:</b>	Créatine kinase
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dioxyde de carbone
<b>COX:</b>	Cyclooxygénase
<b>DAG:</b>	1,2-diacylglycérol
<b>DBK:</b>	Des-Arg <sup>9</sup> -bradykinine
<b>2-AG:</b>	sn-2 arachidonylglycerol
<b>DMSO:</b>	<i>Dimethyl</i> sulfoxyde
<b>DOCA:</b>	Acétate de déoxycorticostéroïde
<b>dP/dt:</b>	Première dérivée de la pression sur le temps
<b>EDHF:</b>	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
<b>EIA:</b>	Essai immunoenzymatique
<b>eNOS:</b>	NO synthase provenant de l'endothélium (forme constitutive)
<b>ET-1:</b>	Endothéline-1
<b>g:</b>	Gramme
<b>GC/MS:</b>	Chromatographie gazeuse associée à une spectre de masse



<b>Gli:</b>	Glibenclamide
<b>GMPc:</b>	Guanylate monophosphate cyclique
<b>H<sup>+</sup>:</b>	Ion hydrogène
<b>Hsp27:</b>	<i>Heat shock proteins</i> (petites protéines de choc thermique)
<b>8-PT:</b>	8-phénylthéophylline
<b>Indo:</b>	Indométhacine
<b>iNOS:</b>	Forme inductible de la NO synthase
<b>IPC:</b>	Préconditionnement ischémique
<b>IPC1:</b>	Préconditionnement ischémique induit par une période ischémique
<b>IPC3:</b>	Préconditionnement ischémique induit par trois périodes ischémiques
<b>IP<sub>3</sub>:</b>	Inositol 1,4,5-trisphosphate
<b>IU:</b>	Unités internationales
<b>K<sup>+</sup>:</b>	Ion potassium
<b>K<sub>ATP</sub>:</b>	Canaux potassiques dépendants de l'ATP
<b>LLDBK:</b>	[Lys <sup>0</sup> , Leu <sup>8</sup> , des-Arg <sup>9</sup> ]-bradykinine
<b>M :</b>	Molaire
<b>Max:</b>	Maximum
<b>MAPKs :</b>	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
<b>Mg<sup>2+</sup>:</b>	Ion magnésium
<b>Min:</b>	Minute ou minimum
<b>ml:</b>	Millilitre
<b>mmHg:</b>	Millimètre de mercure
<b>NA:</b>	Noradrénaline (norépinéphrine)
<b>Na<sup>+</sup>:</b>	Ion sodium
<b>nNOS:</b>	NO synthase neuronale (forme constitutive)
<b>NO:</b>	Monoxyde d'azote
<b>NS:</b>	Non statistiquement différent
<b>OAG:</b>	1-oleyl-2-acétyl glycerol
<b>PCI:</b>	Préconditionnement ischémique

<b>PDGF:</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<b>PEA:</b>	Palmitoyléthanolamide
<b>PGE<sub>2</sub>:</b>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub>:</b>	Prostaglandine I <sub>2</sub> (prostacycline)
<b>PGs:</b>	Prostaglandines
<b>PIP<sub>2</sub>:</b>	Phosphoinositol diphosphate
<b>PKCs:</b>	Protéine kinases C
<b>PLA<sub>2</sub>:</b>	Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PLC:</b>	Phospholipase C
<b>PLD:</b>	Phospholipase D
<b>PMA:</b>	4β-phorbol 12-myristate 13-acétate
<b>s:</b>	seconde
<b>SAPK:</b>	<i>Stress activated c-jun N-terminal kinase</i>
<b>SEM:</b>	Erreur-type
<b>SHR:</b>	Rat spontanément hypertendu
<b>SNP:</b>	Nitroprussiate de sodium
<b>SPT:</b>	8-p-sulfophényl théophylline
<b>TIMI:</b>	<i>Thrombolysis in Myocardial Infarction</i> (étude)
<b>TGFβ<sub>1</sub>:</b>	<i>Transforming growth factor β<sub>1</sub></i>
<b>Thr:</b>	Thrombine
<b>TK:</b>	Tyrosine kinase
<b>TNFα:</b>	<i>Tumor necrosis factor α</i>
<b>t-PA:</b>	Activateur tissulaire du plasminogène
<b>TXA<sub>2</sub>:</b>	Thromboxanes A <sub>2</sub>
<b>U-46619:</b>	9,11-dideoxy-11α, 9α-epoxymethano-prostaglandine F <sub>2α</sub>

À mes parents, pour m'avoir continuellement  
encouragé à poursuivre mes idéaux

À Élisabeth, pour m'avoir soutenu indéfectiblement

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à exprimer ma gratitude au Docteur Daniel Lamontagne, professeur à la Faculté de pharmacie, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui a eu la patience de superviser jour après jour mes travaux de recherche. Sa rigueur scientifique, son engouement pour la recherche, ses qualités de pédagogue et ses judicieux conseils m'ont profondément marqué.*

*Je remercie messieurs Jérôme Chouinard et Philippe Lépicier, ainsi que madame Anne-Marie Boileau qui ont travaillé comme étudiants d'été dans notre laboratoire et sans qui je ne serais jamais rendu où je suis. J'aimerais également remercier mes collaborateurs les docteurs Éric Dumont, Aderville Cabassi, Véronique Bodart, Huy Ong, Jean-Guy Besner, Orval A. Mamer, Jacques de Champlain, Marie Joyeux, Christophe et Diane Ribuoit qui m'ont permis d'explorer d'autres horizons.*

*Merci aux docteurs Albert Adam, Nobuharu Yamaguchi, Pierre Moreau pour m'avoir transmis leur passion de la recherche.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement ma famille Irénée, Mariette, Élisabeth et Gaétan pour le soutien et leur appui inconditionnel au fil des années.*

*Mes remerciements à l'ACIM-FRS-CRM, au Conseil de recherches médicales du Canada, à la Faculté de pharmacie, à la Fondation des maladies du cœur du Québec, au Fonds de la recherche en santé du Québec, au Groupe de recherche sur le système nerveux autonome, à Hoffman-La Roche, à Merck Canada, à Novartis Pharma Canada et à Parke-Davis Canada pour leurs encouragements et leur soutien financier.*

*Et à tous les autres qui ont contribué de près ou de loin à ce que je suis devenu aujourd'hui, merci!*

## AVANT-PROPOS

Cette thèse sera divisée en sept chapitres. Le premier chapitre sera composé de l'introduction générale. Les cinq chapitres suivants constitueront le corps de la thèse et ont été rédigés sous forme d'articles qui ont été ou seront publiés dans des journaux dotés d'évaluation par comité de pairs. Le manuscrit intitulé *Mechanisms of protection afforded by preconditioning to endothelial function against ischemic injury* constituant le deuxième chapitre fut publié en 1996 dans l'*American Journal of Physiology*. Le troisième chapitre présentera l'article qui fut publié en 1998 dans la revue *Cardiovascular Research* et qui s'intitulait *Protection afforded by preconditioning to the diabetic heart against ischaemic preconditioning*. Le chapitre quatre comprendra le manuscrit publié en 1998 dans le *British Journal of Pharmacology* et intitulé *Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning*. L'article intitulé *Participation of prostaglandin E<sub>2</sub> in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning in the isolated rat heart* fut publié dans la revue *Cardiovascular Research* et il constituera le cinquième chapitre. Le sixième chapitre traitera d'un article soumis à la revue *British Journal of Pharmacology* qui s'intitule *Ischemic preconditioning in isolated rat heart is mediated by endogenous cannabinoids*. Finalement, la discussion générale et la conclusion constitueront le dernier chapitre.

## Chapitre premier : Introduction générale

Les maladies ischémiques cardiaques représentent aujourd'hui encore un problème de santé majeur dans les pays industrialisés. En effet, elles comptent parmi les maladies les plus débilantes et une mortalité importante leur est associée (1).

C'est pourquoi, au cours des dernières années, nous avons assisté à un engouement important pour la pathophysiologie et les mécanismes impliqués lors de l'ischémie et de la reperfusion. Le but de ces travaux était de découvrir les mécanismes adaptatifs déployés par le cœur et ses diverses composantes lors de l'ischémie et de la reperfusion. Ces études furent conduites dans l'ultime but de mieux comprendre les mécanismes de défense du cœur contre l'ischémie. Une meilleure compréhension du cœur nous permettra un jour de le rendre plus résistant aux effets délétères de l'ischémie et par le fait même améliorer l'arsenal thérapeutique déjà existant.

Au cours des 10 dernières années, l'utilisation d'agents thrombolytiques s'est répandue et les procédures invasives de revascularisation révolutionnèrent et améliorèrent le sombre pronostic associé aux maladies ischémiques cardiaques. Cette technique demeure cependant, à ce jour, la seule option thérapeutique disponible pour rétablir la circulation coronaire. Les agents pharmacologiques actuellement disponibles agissant seulement sur les symptômes de l'angine tels les bêtabloquants, les bloquants des canaux calciques et les dérivés nitrés n'ont malheureusement produit que de modestes succès (2).

L'introduction de cette thèse relatera succinctement les effets délétères produits par l'ischémie et la reperfusion au niveau du myocarde et de l'endothélium. Également seront traitées dans ce chapitre, les différentes interventions ayant pour but la prévention des dommages produits par l'ischémie et la reperfusion. Nous

nous attarderons tout particulièrement à un de ces phénomènes appelé préconditionnement ischémique.

## 1.1 LE MYOCARDE

### 1.1.1 Pathogenèse de l'effet délétère de l'ischémie sur le myocarde

L'ischémie cardiaque survient lors d'un déséquilibre entre l'apport coronaire en oxygène et en nutriments et la demande du myocarde pour ces derniers. Le travail mécanique du myocarde dépend grandement du métabolisme aérobie, qui produit de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La respiration aérobie se produit dans les mitochondries qui occupent environ le tiers du volume de chaque myocyte. La respiration mitochondriale ainsi que la phosphorylation oxydative sont étroitement couplées et régulées par la disponibilité de l'oxygène et de l'adénosine 5<sup>1</sup>-diphosphate (ADP) (3). Donc, on comprend aisément que la survie du cœur et de ses diverses composantes dépendent grandement de l'oxygène.

Une diminution du débit coronaire et de la quantité d'oxygène provoquent donc d'importantes et progressives altérations métaboliques (4). Dans les mitochondries, le manque d'oxygène se traduit par un arrêt du transport électronique quelques secondes après le début de l'ischémie. De façon concomitante, la glycolyse et la glycolyse anaérobie sont accélérées, causant une augmentation des concentrations de NADH, de lactates et d'ions hydrogènes (H<sup>+</sup>) (3).

Comme la glycolyse anaérobie est beaucoup moins efficace à produire de l'ATP (2μM d'ATP par 1μM de glucose au lieu de 38), les réserves cardiaques d'ATP diminuent rapidement (3). En effet, les réserves en ATP sont très limitées. Le myocarde contient environ 20μM d'ATP par gramme de tissu sec. Donc, par

conséquent, ces faibles réserves permettent de maintenir une activité contractile normale pendant moins de 30 secondes.

À ce manque d'ATP, s'ajoute l'accumulation rapide des produits de diverses voies métaboliques. Parmi ces produits, l'on retrouve les lactates, les ions  $H^+$  (résultant en une acidose cellulaire), les phosphates inorganiques, les purines, l'ammoniaque ainsi que l'alanine. Tous ensemble, ces métabolites créent une charge osmotique considérable dans les myocytes ischémiés (3).

De son côté, l'accumulation d'ions  $H^+$  entre autres, augmente l'échange  $Na^+/H^+$  entraînant l'échange  $Na^+/Ca^{2+}$  ce qui contribue à la surcharge en ions calciques ( $Ca^{2+}$ ) (5).

L'accumulation de lactates semble reliée à divers problèmes tels : une altération du potentiel d'action, un gonflement et une diminution de la capacité des mitochondries à phosphoryler (3).

Lors de l'ischémie surviennent également des dysfonctions membranaires associées à des altérations des flux ioniques. Ces modifications jouent un rôle prépondérant dans la pathogenèse des complications associées à l'ischémie cardiaque. La dissociation électromécanique, la rigidité et la contracture semblent être expliquées par la déplétion des réserves en ATP et l'accumulation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  qui sont provoquées par ces dysfonctions membranaires et ioniques(6;7). De plus, les dommages progressifs encourus par la membrane cellulaire ont été démontrés comme étant le mécanisme fondamentalement responsable de l'irréversibilité du dommage associé à l'ischémie (8;9).

Lors de l'ischémie cardiaque, les altérations du métabolisme cellulaire se déroulent suivant ces trois étapes. En premier lieu, on assiste à de faibles modifications du transport ionique, particulièrement des ions potassiques ( $K^+$ ), sodiques ( $Na^+$ ), du magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et du  $Ca^{2+}$ , deuxièmement, la perméabilité



de la couche lipidique membranaire augmente et finalement, on assiste à la perforation de la membrane cellulaire (9). Au moins quatre voies seraient impliquées dans la perte d'intégrité membranaire : premièrement, une dégradation des phospholipides membranaires (10), deuxièmement la production et l'insertion de lipides amphipathiques qui altèrent la fluidité membranaire (3), troisièmement la génération de radicaux libres qui entraînent subséquemment un peroxydation des lipides membranaires (11;12) et quatrièmement, les dommages infligés au cytosquelette (13;14).

L'influx de calcium, lui, amène l'activation de phospholipases et de protéases (3). De son côté, l'influx de sodium et d'eau entraîne l'œdème cellulaire. L'accumulation de sodium et d'eau dans une cellule possédant une membrane cellulaire métaboliquement perturbée et détachée de son cytosquelette entraîne la rupture de la membrane de cette cellule œdémateuse, produisant ainsi un dommage irréversible (14;15).

### **1.1.2 Reperfusion cardiaque et effets délétères associés à la reperfusion**

La reperfusion cardiaque représente le moment où est rétabli le débit sanguin coronaire après une période d'occlusion coronaire. En clinique, ce phénomène est présent chez un patient souffrant d'angine instable, de vasospasmes coronaires ou lors d'angioplastie ou de thrombolyse coronaire.

Les effets délétères associés à la reperfusion peuvent parfois être irréversibles. Ces effets résultant de la reperfusion viennent s'ajouter à ceux déjà présents chez un cœur métaboliquement affecté par l'ischémie. Les effets délétères associés à la reperfusion sont multiples. Ils comprennent des anomalies métaboliques post-ischémiques, des dysfonctions contractiles, des troubles du rythme, des obstructions microvasculaires post-ischémiques qui ont pour effet de diminuer grandement ou tout simplement empêcher toute reperfusion du territoire irrigué par ces vaisseaux (3). Également, la reperfusion peut entraîner la mort de

myocytes qui étaient encore viables au début de cette procédure. Elle peut également accélérer la dégénération cellulaire, affaiblir le myocarde en augmentant le nombre de neutrophiles et la production de radicaux libres et en accélérant la libération d'enzymes intracellulaires et de protéines provenant de cellules endommagées (8).

Au moins trois voies participent aux effets délétères de la reperfusion (16). Le premier mécanisme implique une surcharge calcique. En effet, la reperfusion exacerbe la surcharge calcique via les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . L'importante surcharge calcique entraîne la calcification de mitochondries et la mort des myocytes (17;18). Le second mécanisme se rapporte à la surcharge osmotique intracellulaire secondaire à l'accumulation de métabolites au cours de l'ischémie. Lors de la reperfusion, le volume extracellulaire prend de l'expansion et l'hyperosmolarité de la cellule crée un flux osmotique ce qui provoque l'œdème cellulaire pouvant même aller jusqu'à la rupture de la membrane cellulaire. Une production massive de radicaux libres à partir de l'oxygène constitue la troisième voie pouvant expliquer les dommages cellulaires observés lors de la reperfusion (3).

Mais heureusement, la reperfusion a également le potentiel de sauver le myocarde ischémique. L'effet net dépend donc de la sévérité et de la durée de l'ischémie précédant la reperfusion (19).

Donc, la reperfusion post-ischémique peut accélérer la progression vers la mort des myocytes durement affectés par l'ischémie et sauver ceux qui furent légèrement atteints. De façon générale, la reperfusion permet de sauver le myocarde surtout si elle est effectuée de façon précoce. Elle demeure l'alternative la plus efficace dans le traitement des maladies ischémiques cardiaques aiguës (20;21).

## 1.2 L'ENDOTHELIUM CORONAIRE

Il y a seulement quelques années, l'endothélium coronaire était considéré uniquement comme une barrière non-thrombogénique séparant le sang des cellules musculaires lisses vasculaires. On préconisait alors que le tonus vasculaire était surtout sous le contrôle du système nerveux sympathique et des hormones vasoactives.

La découverte que l'endothélium pouvait également synthétiser des vasodilatateurs tels le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline déclencha un énorme engouement pour la fonction endothéliale et pour son rôle physiologique et pathologique dans le contrôle du tonus vasculaire. D'autres substances produites par l'endothélium possèdent également un effet vasomoteur, parmi elles l'on retrouve : le facteur hyperpolarisant de l'endothélium (22) et l'endothéline (23). Depuis ces travaux, il est maintenant établi que l'endothélium est un organe métaboliquement actif tant au niveau paracrine qu'autocrine.

L'endothélium influence non seulement le tonus vasculaire, il affecte également le remodelage vasculaire, l'homéostasie et la coagulation en modulant l'action des plaquettes et en synthétisant divers composés ayant des effets anticoagulants et fibrinolytiques. D'autre part, l'endothélium semble être un important modulateur de l'inflammation. Donc, toute anomalie de la fonction endothéliale joue un rôle de premier plan dans la pathogenèse de la maladie coronaire.

### 1.2.1 Facteurs synthétisés par l'endothélium

#### 1.2.1.1 Facteurs vasodilatateurs

L'endothélium produit des substances vasodilatatrices en réponse à divers stimuli comme les neurotransmetteurs, les hormones, les facteurs dérivés des plaquettes et les facteurs impliqués dans la coagulation (fig.1). Les forces de cisaillement exercées par le sang circulant induisent également une vasodilatation dépendante

de l'endothélium. Un des premiers médiateurs de la vasodilatation dépendante de l'endothélium à être identifié fut le monoxyde d'azote (NO) (24). Le NO est formé à partir de la L-arginine par l'oxydation de l'azote situé sur la guanidine terminale (24). L'enzyme catalysant cette réaction est la NO synthase et est présente de façon constitutive sous différentes isoformes dans les cellules endothéliales (eNOS), les plaquettes et dans le cerveau (nNOS) (25). Il existe également une forme inductible (iNOS) présente au niveau du muscle lisse vasculaire, de l'endothélium et des macrophages. Elle est synthétisée lors de processus inflammatoires (26).

Lorsque produit, le NO diffuse autant de façon abluminale que de façon luminale permettant une interaction avec les éléments figurés du sang ainsi qu'avec le muscle lisse vasculaire sous-jacent.

Le NO exerce son action en activant une guanylate cyclase soluble, ce qui amène la formation de GMPc (26). Dans les plaquettes, une augmentation du GMPc se solde par une diminution de leur agrégation et de leur adhésion. D'ailleurs, les plaquettes possèdent leurs propres NO synthases qui régule leur capacité à s'agréger (26). Plus intéressant encore, les plaquettes sécrètent des substances telles l'adénosine di ou triphosphate et de la sérotonine qui à leur tour amènent la libération endothéliale de NO et de prostacycline (27). De plus, l'enzyme jouant un rôle majeur dans la cascade de la coagulation, la thrombine, stimule la formation de NO par l'endothelium (28). En conséquence, lorsque les plaquettes et la cascade de la coagulation sont activées, immédiatement, les cellules endothéliales relâchent du NO et de la prostacycline. Ce phénomène induit une vasodilatation et inhibe l'agrégation plaquettaire et par le fait même, prévient la vasoconstriction et la formation de thrombus (26) (fig.2).

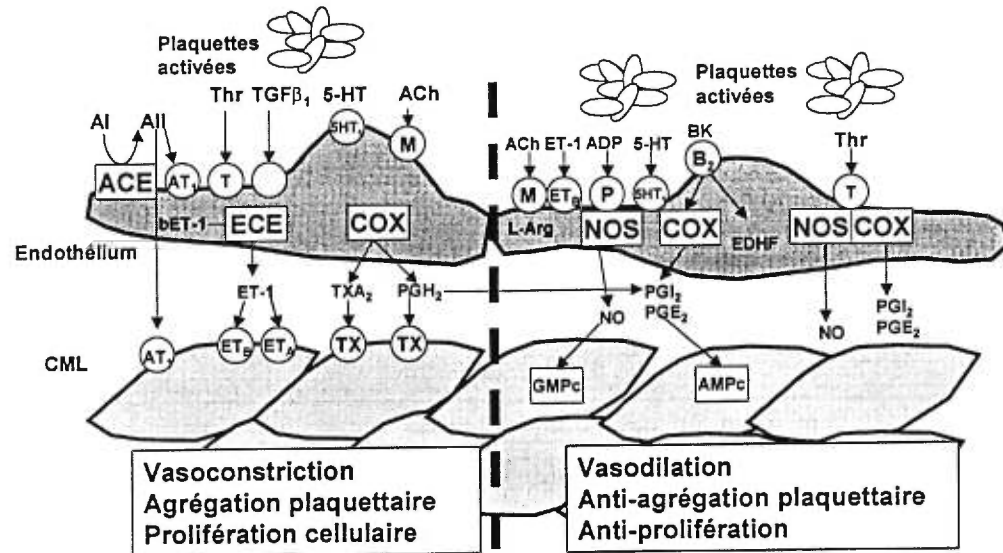


Figure 1.1 : Facteurs vasoactifs produits par l'endothélium. Adapté de (26)

En plus du NO, la prostacycline est libérée des cellules endothéliales en réponse aux forces de cisaillement, à l'hypoxie et plusieurs autres agonistes qui amènent la libération de NO (26). Elle produit son effet principalement en activant l'adénylate cyclase, ce qui augmente les taux de 3', 5'-adenosine monophosphate (AMPC) dans le muscle lisse et les plaquettes (29) (fig.1). Au niveau des plaquettes, le NO et la prostacycline inhibent de façon synergique l'agrégation plaquettaire (30)(fig.2).

Pour ce qui est de la circulation coronaire, la vasodilatation à la sérotonine ou à la bradykinine ne peut être complètement abolie par l'utilisation concomitante d'inhibiteurs de la voie du NO et de celle des prostaglandines (31;32). Cette vasodilatation impliquant un ou des médiateurs inconnus semble être provoquée par une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires. C'est pourquoi, ces substances inconnues furent nommées facteurs hyperpolarisant dérivés de l'endothélium (EDHF)(33) (fig.1). Depuis, certains candidats ont été proposés. Par exemple, l'équipe de Busse suggère que l'EDHF pourrait être un produit du cytochrome P450 2C8/34 tel que l'acide 11,12-epoxyeicosatrienoïque (34). Certains avancent que le facteur hyperpolarisant pourrait être simplement du potassium libéré des cellules endothéliales par les canaux potassiques dépendants du calcium (35), mais ce dernier candidat est remis en question par une autre équipe (36). D'autres suggèrent que des cannabinoïdes synthétisés de façon endogène pourraient être cet inconnu (37-39), mais cette fois-ci encore la véracité de cette hypothèse est discutée (40).

### 1.2.1.2 Facteurs vasoconstricteurs

L'endothélium peut également produire des facteurs vasoconstricteurs(41) (fig.1). Parmi eux, l'on retrouve : l'endothéline, les produits du système rénine-angiotensine et des prostaglandines vasoconstrictrices telles la thromboxane A<sub>2</sub> et la prostaglandine H<sub>2</sub>.

L'endothéline endothéliale est synthétisée sous la forme de préproendothéline, qui est par la suite convertie en *big* endothéline avant d'être à son tour transformée en endothéline sous l'action de deux enzymes, l'enzyme de conversion de l'endothéline 1 et 2. Sa synthèse est stimulée par la thrombine, le *transforming growth factor*  $\beta_1$ , l'interleukine-1, l'épinéphrine, l'angiotensine II et la vasopressine (42) (fig.1).

L'endothéline possède deux actions, elle peut agir à la fois comme un vasoconstricteur et comme un vasodilatateur. Lorsqu'elle agit sur la cellule endothéliale, l'endothéline stimule la libération de NO et de prostacycline qui à leur tour diminuent la production d'endothéline et du même coup son effet vasoconstricteur sur le muscle lisse.

Il existe deux sous-types de récepteurs à l'endothéline, le récepteur  $ET_A$  et le récepteur  $ET_B$  (43;44). Tous deux sont des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés à une protéine G et liés aux phospholipases C et aux protéine kinases C. Les cellules endothéliales expriment le récepteur  $ET_B$  qui est associé à la formation de NO et de prostacycline, ce qui explique l'effet dilatateur transitoire observé chez des animaux où l'endothélium est fonctionnel. De leur côté, les cellules musculaires lisses vasculaires expriment les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  qui médient la vasoconstriction et la prolifération cellulaire (26).

D'autres substances sont également synthétisées par la cellule endothéliale. Certains auteurs ont rapporté la présence d'enzyme de conversion de l'angiotensine qui participe à la synthèse de l'angiotensine (45). D'autres groupes ont observé que dans certains vaisseaux, l'acétylcholine, l'histamine et la sérotonine pouvaient induire des vasoconstrictions qui étaient dépendantes de l'endothélium et qui étaient médiées par les thromboxanes  $A_2$  ou par les prostaglandines  $H_2$  (26)(fig.1).

### **1.2.2 Pathologies impliquant une dysfonction endothéliale**

Par le passé, la majorité des études sur la fonction endothéliale furent effectuées dans des conditions non-pathologiques où l'endothélium répond normalement à divers stimuli tels les forces de cisaillement ou encore divers agents pharmacologiques.



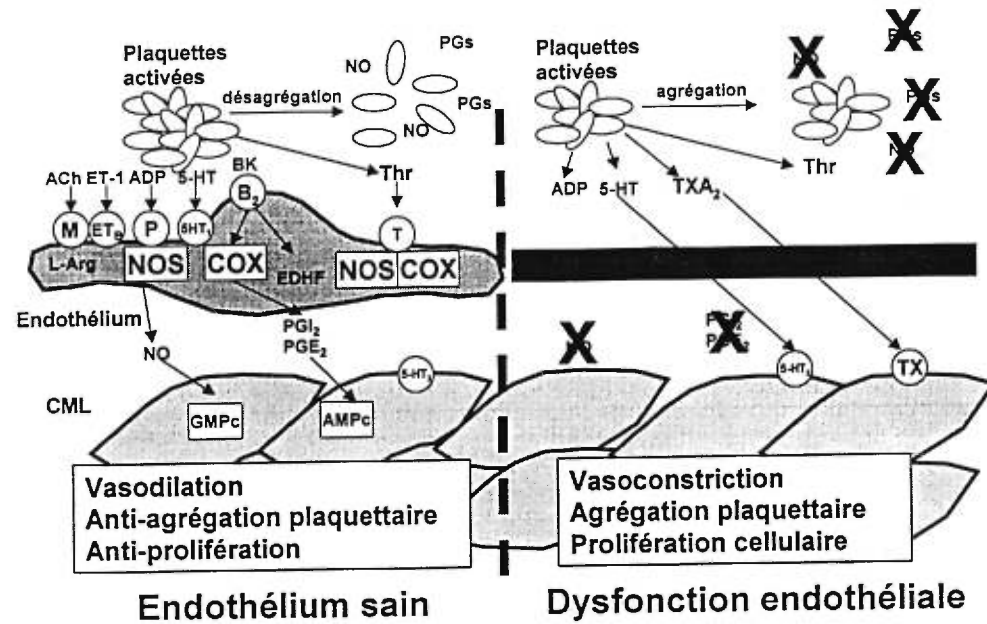


Figure 1.2 : Complications de la dysfonction endothéliale

Récemment, des dysfonctions endothéliales ont été documentées chez des patients souffrant d'athérosclérose (46-48), d'hypercholestérolémie (49), d'hypertension (50), de diabète (51), chez les fumeurs (52) et chez les personnes âgées (53;54). Également, certains auteurs ont rapporté que l'ischémie et la reperfusion pouvaient altérer la fonction endothéliale, et ce autant dans les vaisseaux coronaires de conductance (55;56) que dans ceux de résistance (57). De plus, cette dysfonction semble s'étendre au-delà de la zone d'atteinte primaire. En fait, des patients souffrant d'angine stable due à l'atteinte d'une seule artère démontrent une capacité vasodilatatrice réduite non seulement dans les territoires perfusés par l'artère sténosée, mais également dans des régions irriguées par des artères diagnostiquées comme normales à l'angiographie (58-60).

### 1.2.3 Le rôle de l'endothélium dans le remodelage vasculaire

La dénudation mécanique de l'endothélium entraîne l'activation des plaquettes et l'adhésion des leucocytes. Pis encore, après quelques jours, une hyperplasie intimale se développe au site de la lésion (26). Cela suggère que les cellules endothéliales jouent un rôle important en freinant le remodelage de la structure vasculaire. Lorsqu'il y a dénudation endothéliale, les plaquettes causent une vasoconstriction (via la libération de thromboxanes  $A_2$  et de sérotonine (61)) et stimulent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (fig.2) (via entre autres la libération du *platelet-derived growth factor* (PDGF) (62)).

D'autre part, les cellules endothéliales sont une source importante de facteurs influençant la croissance cellulaire. En conditions physiologiques, l'effet anti-prolifératif prévaut, ce qui explique pourquoi les cellules de la paroi des vaisseaux sanguins demeurent quiescentes et ne prolifèrent pas (26). Dans ces conditions, les héparan sulfates, le NO et le  $TGF\beta_1$  inhibent la migration et la prolifération du muscle lisse vasculaire (63-65). Lors de processus pathologiques, l'endothélium produit majoritairement des facteurs de croissance, particulièrement le PDGF et

l'*epidermal growth factor* et l'on assiste alors à la prolifération cellulaire (66). Donc, en présence de dysfonction endothéliale, la production de facteurs inhibant la croissance cellulaire est diminuée et parfois même inexistante, ce qui peut entraîner un remodelage vasculaire inapproprié (fig.2).

#### **1.2.4 Le rôle de l'endothélium dans la coagulation**

Les plaquettes, ces fragments cellulaires anucléés provenant de la moelle osseuse, possèdent des mécanismes de reconnaissance des sites vasculaires endommagés. Lorsqu'elles sont en présence de ces sites, elles s'activent et adhèrent rapidement à la zone lésée (26). Les plaquettes sont régulièrement impliquées dans la pathogenèse de syndromes coronaires aigus. Lorsque activées, les plaquettes libèrent plusieurs substances possédant des effets vasculaires, comme l'adénosine diphosphate (ADP) et triphosphates (ATP), les thromboxanes A<sub>2</sub>, la thrombine et la sérotonine (26). Ces agents possèdent un effet sur les autres plaquettes et sur la paroi vasculaire (fig.2).

La thrombine, un puissant stimulateur de l'agrégation plaquettaire, amène l'endothélium à produire et libérer du NO et/ou de la prostacycline qui eux sont d'importants inhibiteurs de la fonction plaquettaire (26)(fig.1). Également, l'activation des plaquettes pousse l'endothélium à produire du NO par la libération d'ADP, d'ATP et de sérotonine. Ce phénomène a été observé entre autres chez l'humain au niveau des artères coronaires et de l'artère thoracique interne (61). En conséquence, en présence d'endothélium intact, les plaquettes produisent une vasodilatation dépendante de l'endothélium et inhibent l'agrégation plaquettaire via la production par les cellules endothéliales de NO et de prostacycline aux sites où les plaquettes sont activées, ce qui tend à désagréger et à éliminer la formation et les résidus du caillot. En contrepartie, lorsque l'endothélium vasculaire est endommagé, par exemple post-angioplastie ou post-ischémie, les plaquettes provoquent une contraction vasculaire et s'agrègent, particulièrement dans le cas où elles furent stimulées par la thrombine (67) (fig.2).

Tous ces résultats suggèrent très fortement que la dysfonction endothéliale peut aider à identifier les patients à risque de développer des maladies ischémiques cardiaques. De plus, le processus d'athérosclérose semble intimement relié à la présence et à la sévérité de la dysfonction endothéliale. Par exemple, la dysfonction endothéliale semble impliquée dans la pathogenèse de l'angine stable. Dans des lits vasculaires coronaires sains, la résistance vasculaire est déterminée par la microvasculature. Lors d'athérosclérose, la lumière de ces vaisseaux est rétrécie, ce qui augmente la résistance (68). De plus, on assiste à une dysfonction endothéliale qui entraîne une aggravation de la régulation du flux sanguin déjà altéré. Il a été démontré que la dysfonction endothéliale seule peut mener à l'ischémie cardiaque (69), et ce même en absence de sténose (70). D'ailleurs, la dysfonction endothéliale elle-même peut amener un déséquilibre entre l'apport en oxygène et sa demande (68). Ceci peut probablement expliquer en bonne partie le phénomène circadien de l'angine de poitrine qui survient préférentiellement le matin lorsque le tonus sympathique est à son plus haut.

Maintenant, comment la dysfonction endothéliale peut-elle contribuer à l'ischémie et à l'infarctus du myocarde?

Une réponse anormale à la sérotonine en présence de dysfonction endothéliale peut s'avérer particulièrement grave dans certaines maladies coronaires impliquant la participation des plaquettes dans la physiopathologie (71). En présence de dysfonctionnement endothélial, la réponse vasoconstrictrice exagérée en réponse aux produits relargués par les plaquettes peut initier la rupture de la plaque d'athérome. En effet, la formation de thrombus entraîne la libération de diverses substances vasoactives, en particulier la sérotonine et la thrombine (72;73). Lors de dysfonctionnement endothélial, ces deux agents deviennent de puissants vasoconstricteurs bien qu'en présence d'endothélium sain, ces derniers produisent une vasodilatation (74). Comme décrit précédemment, en conditions physiologiques, l'endothélium prévient donc la formation de thrombus en libérant

des substances anti-coagulantes comme le NO, la prostacycline, par les molécules d'héparines présentes à sa surface et en produisant des activateurs tissulaires du plasminogène (t-PA) (68). Bref, lorsque l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium est atteinte, il y a promotion de la formation de thrombus.

De plus, une dysfonction endothéliale peut entraîner de graves problèmes au niveau de la microcirculation coronaire (46;47). En effet, lors d'exercice, on assiste à une augmentation de la demande en oxygène et en nutriments. En présence d'un endothélium sain, il y aura libération de diverses substances vasodilatatrices qui équilibre l'offre à la demande. Si l'endothélium n'est pas parfaitement fonctionnel, on assistera à une ischémie cardiaque et peut-être même à un infarctus (48).

De plus, après un infarctus, la vasodilatation coronaire dépendante de l'endothélium dans la zone infarctiée reste profondément affectée, malgré une recanalisation produite par thrombolyse (75-77). Cette détérioration fut attribuée à la dysfonction endothéliale des vaisseaux de résistances présents dans le tissu infarctié (77). Uren et son équipe démontrèrent que, chez les patients souffrant d'infarctus du myocarde aigu, la vasodilatation coronaire est significativement affectée tant au niveau de la zone infarctiée, qu'au niveau de la zone dite saine (59). Ils observèrent même une importante réduction de la réponse aux vasodilatateurs dépendants de l'endothélium qui perdura pendant six mois, suggérant que cette détérioration de la fonction endothéliale persiste longtemps après la recanalisation.

### **1.2.5 Dysfonction endothéliale et infarctus du myocarde**

Lorsque fonctionnel, l'endothélium vasculaire empêche la formation de thrombus et exerce un effet vasodilatateur sur le système cardio-vasculaire tout entier (78). Une atteinte des cellules endothéliales ou l'exposition de celles-ci à certaines cytokines ayant un effet pro-inflammatoire se solde par l'expression de facteurs

tissulaires, de molécules d'adhésion et par l'induction de la coagulation (78-80). De plus, ces processus inflammatoires et leurs médiateurs ont été démontrés comme affectant la vasodilatation dépendante de l'endothélium (81;82).

La production continue de NO produit un effet vasodilatateur basal sur le système cardio-vasculaire humain, inhibe l'adhésion des plaquettes et des leucocytes aux parois vasculaires, prévient l'agrégation plaquettaire et inhibe la croissance cellulaire du muscle lisse (83;84). Un endothélium intact est essentiel à la prévention de la vasoconstriction et des effets pro-aggrégants induits par les plaquettes. Récemment, il a été démontré que certaines cytokines pro-inflammatoires (particulièrement le  $\text{TNF}\alpha$ ) pouvaient inhiber la capacité des cellules endothéliales à générer du NO et/ou certaines prostaglandines vasodilatatrices et anti-coagulantes (82;84-86). Ces effets délétères ont été observés tant chez l'animal (86) que chez les sujets sains (81;82) et perduraient plusieurs jours.

Les mécanismes soutenant cette dysfonction temporaire de la fonction endothéliale sont encore pour l'instant inconnus. Cependant, des traitements à l'aide de glucocorticoïdes, d'aspirine à dose anti-inflammatoire ou d'antioxydants offrirent tous une protection dans les modèles expérimentaux (81;82;87), suggérant que les prostaglandines et/ou la génération de superoxydes semblent participer à ce phénomène.

Ces modifications de la réactivité vasculaire provoquent un déséquilibre qui favorise les facteurs impliqués dans la thrombose et le vasospasme. Ceci semble expliquer du moins en partie la pathogenèse des maladies thromboemboliques (88). Certaines études expérimentales et épidémiologiques suggèrent même que la dysfonction endothéliale suivant l'ischémie ou l'inflammation peut constituer un facteur de risque important de l'infarctus du myocarde et de l'angine instable et donc, doit être prévenue.

Dans le territoire vasculaire atteint où se développe l'infarctus, on observe une hyper-réactivité des vaisseaux de résistance (probablement due à une dysfonction endothéliale pré-existante) en réponse aux substances libérées par les plaquettes (comme la sérotonine, l'ADP et les thromboxanes) (89). Ces dernières ont un effet vasoconstricteur sur le muscle lisse vasculaire de la zone où se forme le thrombus mais elles produisent également une constriction des vaisseaux situés en aval, tel que suggéré par une perfusion intracoronaire de sérotonine (71). Lors de dysfonction endothéliale, il y a une augmentation de la réponse des vaisseaux de résistance aux stimuli vasoconstricteurs, ce qui a pour effet d'étendre l'ischémie au pourtour de la zone infarctiée contribuant à l'atteinte de la fonction ventriculaire et à l'extension de la nécrose(89).

Comme la fonction endothéliale joue un rôle primordial dans la survie du cœur entier, il est donc impératif de la protéger lors d'agression comme l'ischémie cardiaque. La prévention et le traitement de la dysfonction endothéliale doit devenir la pierre angulaire du traitement de certains syndromes comme l'angine, qu'elle soit stable ou instable, et de l'infarctus du myocarde. Mais pour arriver à une prévention et à un traitement efficaces, il faut s'efforcer de connaître le rôle physiologique et pathophysiologique joué par l'endothélium en conditions normales ou pathologiques, comme par exemple lors de l'ischémie et de la reperfusion. De cette façon, on pourra prévenir les complications associées à une dysfonction endothéliale.

### **1.3 INTERVENTIONS CARDIOPROTECTRICES**

Au cours des dernières décennies, les conséquences physiopathologiques de l'ischémie du myocarde chez l'homme ont reçu beaucoup d'attention. Mais aucune thérapie, sauf celles visant la reperfusion du myocarde, n'eurent de succès tangible. Cependant, en 1986, Murry et ses collaborateurs firent une intéressante observation qui pouvait paraître paradoxale à première vue (90). En fait, ils démontrèrent que le myocarde possédait une certaine aptitude à s'adapter à



l'ischémie. Ce phénomène fut baptisé préconditionnement ischémique. Cette découverte permit d'espérer qu'un jour, on trouvera enfin un traitement efficace et qu'on pourra peut être prévenir les maladies ischémiques cardiaques.

#### **1.4 PRÉCONDITIONNEMENT ISCHÉMIQUE**

Jusqu'à tout récemment, il était convenu que des périodes intermittentes d'ischémie amènent des dommages cumulatifs au myocarde (91).

Cependant, quelques chercheurs ont démontré qu'il existait vraisemblablement un mécanisme protecteur endogène du myocarde. En effet, de courtes périodes d'ischémie suivies par des périodes de reperfusion, paradoxalement, augmentaient la résistance du cœur au dommage ischémique subséquent (90).

##### **1.4.1 Historique**

En 1986, Reimer et coll. examinaient la contribution de la déplétion des réserves d'ATP et d'ADP et de l'accumulation de catabolites dans le développement du dommage ischémique. Ils développèrent des protocoles où les concentrations d'ATP et de catabolites étaient mesurées après une série de quatre périodes d'occlusion coronaire de 10 minutes. Ces résultats furent comparés aux concentrations d'ATP obtenues après une seule occlusion de 40 minutes (92). Après 40 minutes, les taux d'ATP chez les chiens ayant subi les quatre occlusions de 10 minutes étaient supérieurs à ceux des chiens qui n'avaient subi qu'une seule période d'ischémie de 40 minutes (92). De plus, ils notèrent que sur les sept chiens exposés aux quatre occlusions, six ne développèrent pas de nécrose du myocarde (92). Ce paradoxe, démontrant que des périodes intermittentes d'ischémie ne sont pas additives mais produisent un effet protecteur, fut testé en 1986 par Murry et coll. (90). Ils exposèrent les cœurs de chien à quatre cycles d'ischémie suivis par quatre périodes de reperfusion. Par la suite, les cœurs furent exposés à une période d'ischémie prolongée de quatre-vingt-dix minutes. En



utilisant ce protocole, ils observèrent une diminution de la taille de l'infarctus dans le groupe ayant subi 4 périodes d'ischémie-reperfusion comparativement au groupe contrôle.

Depuis, l'efficacité du PCI fut démontrée dans plusieurs espèces (rat (93), lapin (94), cochon (95) et humain (96)). Il fut également observé que le PCI était reproductible dans plusieurs autres organes comme le cerveau (97;98), la moelle épinière (99), la rétine (100), le foie (101), les poumons (102), le rein (103), l'intestin grêle et le muscle squelettique (104;105).

Le nombre de périodes ischémiques requises pour induire le PCI dépend de l'organe et de l'espèce. Murry et coll ont établi que quatre périodes de 5 minutes étaient suffisantes pour induire le PCI chez le cœur de chien. Liu et coll démontrèrent que trois cycles de trois minutes d'ischémie-reperfusion pouvaient preconditionner le cœur de rat (106). Une unique période ischémique de cinq minutes fut suffisante pour induire le PCI dans le cœur de lapin (94). Au niveau de cœur humain, deux cycles de deux minutes induisirent le PCI (107).

Presque, mais pas toutes (108;109) les études conclurent que ces courtes périodes d'ischémie n'entraînaient pas d'effet « cumulatif ou dose-dépendant » (110;111). En effet, Liu et coll. démontrèrent qu'il n'y avait pas d'avantage à utiliser plusieurs périodes ischémiques, comparativement à une seule, afin d'induire le preconditionnement (110). Même, certains groupes ont rapporté qu'en plus de ne pas avoir d'effet additif, le fait de preconditionner en utilisant plusieurs périodes d'ischémie pouvait diminuer la réponse protectrice produite par le PCI et même en soi causer un infarctus (112;113).

Il existe également de très grandes variations inter-espèces dans la durée de la protection induite par le PCI. Par exemple, la protection cardiaque est perdue après 30 minutes chez le cœur de lapin (114), après une heure chez le rat (93) et

deux heures chez le chien (115). La durée d'action du PCI chez l'humain demeure pour l'instant encore inconnue.

D'autres stimuli tels : la tachycardie, l'hypoxie et les agents pharmacologiques ont été rapportés comme pouvant préconditionner le myocarde (116). Par exemple de brèves périodes d'hypoxie (117;118) et de courts épisodes de dilatation du myocarde (119) peuvent remplacer l'ischémie et rendre le cœur de rat, de lapin et de chien plus résistant à une ischémie subséquente.

Une autre façon peu orthodoxe de préconditionner le cœur est *l'ischémie à distance*. En fait, une évidence développée à l'aide d'un modèle mathématique dans les laboratoires de Kloner prédisait qu'une brève période ischémique produite dans n'importe quelle partie du cœur pouvait initier une protection globale et rendre le myocarde non-ischémié plus résistant à l'infarctus (120). Ce qui fut confirmé la même année par le même groupe chez le chien (121). On nomma ce phénomène *préconditionnement à distance*. Certaines études rapportèrent même qu'il était possible d'induire une cardioprotection chez le rat et chez le lapin à partir de brèves périodes d'ischémie produites au niveau des reins, du lit mésentérique et du muscle squelettique (122;123), suggérant qu'un bref stimulus ischémique provenant d'un tissu non-cardiaque pouvait préconditionner le cœur.

#### **1.4.2 La « seconde fenêtre » du préconditionnement ischémique**

Comme mentionné précédemment dans cette thèse, l'efficacité du PCI, comme défini initialement par Murry et coll (90), disparaît si la période séparant la préconditionnement et l'ischémie subséquente dépasse une à deux heures (115;124). Cependant, en 1993, deux laboratoires ont simultanément rapporté que la réponse produite par le PCI est biphasique et réapparaît au bout de vingt-quatre heures. Ces travaux furent reproductibles tant chez le lapin (125) que chez le chien (126). Le terme *seconde fenêtre de protection* fut à la fois inventé pour

décrire cette deuxième phase de protection à apparition différée et pour distinguer ce préconditionnement à retardement de celui considéré comme « classique ».

Comme le but de cette thèse n'est pas d'étudier la seconde phase du préconditionnement ischémique, nous arrêterons ici la description de ce phénomène.

#### **1.4.3 Les fonctions physiologiques affectées par le préconditionnement ischémique et leurs conséquences**

En plus de diminuer la taille de l'infarctus (90;127), le PCI peut réduire l'incidence des arythmies associées à l'ischémie-reperfusion (128-130), améliorer la récupération de la fonction ventriculaire (131;132), diminuer l'accumulation de catabolites et ralentir le métabolisme ischémique (127) (tableau 1).

**Tableau I.I** Paramètres protégés par le préconditionnement ischémique

<b>Paramètres</b>	<b>Commentaires</b>
Réduction de la taille de l'infarctus	Étalon maître du PCI (reproductible dans presque tous les modèles)
Ralentissement de la déplétion des taux d'ATP	Déterminer la première fois chez le chien; peut être inchangé ou accéléré chez le rat et le lapin
Amélioration de la récupération de la fonction contractile	Peut survenir secondairement à la diminution de la taille de l'infarctus ou à l'augmentation de la survie des cardiomyocytes
Réduction de l'incidence des arythmies associées à l'ischémie et à la reperfusion	Dépendant de l'espèce et du modèle. Par exemple, le PCI produit un effet antiarythmique chez le rat, mais peut être proarythmique chez le chien
Diminution de l'apoptose	Récemment observée chez le rat, reste à être confirmée chez les autres espèces
Préservation de la fonction endothéliale	Rapportée chez le chien et le rat, reste à être démontrée chez les autres espèces
Diminution de la thrombose induite par les plaquettes	Récemment documentée dans le modèle canin. Reste à être confirmée ou infirmée dans les autres modèles

### 1.4.3.1 Ralentissement de la déplétion des taux d'ATP

Murry et ses collaborateurs furent les premiers à démontrer que le PCI pouvait diminuer le rythme de la déplétion des taux d'ATP chez les chiens préconditionnés (133). Mais ceci ne fut pas reproductible dans tous les modèles expérimentaux. Dans les modèles de cœur isolé de rat et de lapin globalement ischémiés, il a été rapporté que la vitesse de déplétion de l'ATP était inchangée (134) et même dans certains cas accélérée (135).

### 1.4.3.2 Récupération de la fonction contractile

Un des paramètres les plus étudiés de la cardioprotection induite par le PCI est, particulièrement dans des modèles de cœurs isolés, la récupération de la fonction contractile du ventricule gauche. En 1984 (c'est à dire avant que soit publié le premier rapport sur les effets protecteurs du PCI), Neely et Grotyohann rapportèrent, chez le cœur de rat isolé, qu'une perfusion de 10-15 minutes à l'aide d'un tampon anoxique améliorait la récupération ventriculaire post-ischémique (136). Par la suite d'autres études vinrent confirmer que le PCI pouvait améliorer la récupération post-ischémique du ventricule gauche (137;138). Cependant, contrairement aux résultats obtenus à l'aide de cœurs isolés, certaines études ont démontré que, chez le chien et le porc *in vivo*, le PCI n'a pu prévenir l'effet d'étourdissement (stunning) de la fonction ventriculaire observé à la reperfusion (95;139).

### 1.4.3.3 Altérations électrocardiographiques

Birnbaum et coll. démontrèrent que cinq brèves périodes ischémiques pouvaient prévenir les modifications à l'électrocardiogramme chez le cœur de lapin (140). Cependant, chez le porc, quatre périodes de 15 minutes de ligature coronaire exacerbèrent la détérioration électrocardiographique (141). Cette controverse vient peut être du fait que la durée (15 minutes) de la période ischémique utilisée

par ce groupe pour induire le PCI était trop longue et provoquait elle-même un dommage important au niveau du myocarde.

L'analyse des travaux étudiant l'effet du PCI au niveau des troubles du rythmes associés à l'ischémie et à la reperfusion entraîne les mêmes controverses. Chez le rat, il existe une multitude d'évidences que le PCI est associé à une réduction des extrasystoles, des tachycardies ventriculaires et des fibrillations réversibles (93;128;130;142). En revanche, chez le chien, les résultats sont plutôt contradictoires (142;143). La situation devient d'autant plus compliquée lorsqu'on ajoute le modèle porcin. En effet chez le porc, le PCI semble être proarythmique, l'incidence de fibrillations ventriculaires y est augmentée, le seuil de la fibrillation abaissé et la durée du potentiel d'action diminuée (141;144). Cette fois-ci encore, cette disparité peut être partiellement expliquée par la durée de la période ischémique utilisée afin d'induire le PCI.

#### **1.4.3.4 Effets vasculaires**

Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'ischémie en plus d'infliger des dommages aux cardiomyocytes, produit un effet délétère sur la vasculature coronaire et une perte de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, ce qui se solde par une diminution de la réserve coronaire dépendante de l'endothélium.

DeFily et Chilian démontrèrent à l'aide d'un modèle de microscopie sur les artérioles coronaires provenant de l'épicarde de chien, que la vasodilatation dépendante de l'endothélium était préservée chez les cœurs préconditionnés (57). De leur côté, Richard et coll. (145) ainsi que Kaeffer et coll. (146) à l'aide de segments d'artères coronaires de rat, rapportèrent que le PCI pouvait protéger la fonction endothéliale de ces artères contre les effets délétères de l'ischémie et de la reperfusion. Donc le PCI est reproductible au niveau de la fonction endothéliale.

#### **1.4.3.5 L'agrégation plaquettaire**

Continuant dans la même veine, Kloner et son équipe voulurent savoir si le PCI, en préservant la fonction endothéliale, pouvait prévenir l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Ils découvrirent, à l'aide d'un modèle de chiens anesthésiés, que la thrombose dans les coronaires ou les carotides endommagées et sténosées était significativement atténuée chez les chiens ayant subi un PCI avant la sténose coronaire ou carotidienne, comparativement aux animaux témoins (147;148).

#### **1.4.4 Modèles pathologiques ou sénescents et préconditionnement ischémique**

Jusqu'à maintenant le PCI, sauf quelques rares exceptions, fut étudié et caractérisé chez des animaux sains, jeunes et ne présentant aucune maladie cardiovasculaire. Il est évident que ces modèles ne représentent pas parfaitement la population type chez laquelle le PCI ou un de ces mécanismes pourront être appliqués. Donc, il s'avère primordial d'étudier les effets du PCI chez des animaux plus âgés ou souffrant de diabète, d'hypertension, d'hypertrophie cardiaque ou d'hypercholestérolémie, ce qui à notre avis reflète beaucoup mieux la population cible.

##### **1.4.4.1 Modèles pathologiques**

Il y a de plus en plus d'évidences démontrant que le PCI est reproductible chez les rats souffrant d'hypertension, d'hypertrophie cardiaque ou de diabète. En effet, en utilisant un modèle d'hypertension et d'hypertrophie induites par le DOCA (acétate de déoxycorticostérone) et le sel, Speechly et coll. rapportèrent une diminution de la taille de l'infarctus chez les animaux ayant été préconditionnés (149). Chez le rat spontanément (SHR) (150) ou transgéniquement (151) hypertendu, il fut également démontré que le PCI pouvait améliorer la récupération de la contractilité du ventricule gauche lors de la reperfusion post-ischémique.

De leur côté, Liu et coll. démontrèrent que le PCI produisait une diminution de la taille de l'infarctus chez des rats diabétiques, malgré le fait que l'induction du diabète par la streptozotocine semble rendre les cœurs plus résistants à l'ischémie (152).

Des résultats contradictoires furent obtenus chez le lapin souffrant d'hypercholestérolémie. Par exemple, Szilvassy et coll. démontrèrent que l'effet protecteur du PCI au niveau de la récupération ventriculaire et de la pression diastolique était inexistant chez les animaux ayant reçus une diète enrichie en cholestérol (153).

#### **1.4.4.2 Modèles d'animaux sénescents**

Actuellement, peu de données sont disponibles sur l'effet qu'a le vieillissement sur le PCI. Deux études, toutes deux utilisant comme modèle le cœur de rat isolé soumis à une ischémie globale et la récupération du ventricule gauche comme index de cardioprotection, conclurent que le PCI était inefficace chez les rats Fisher âgés de plus de 50 semaines (154) et chez les rats Wistar âgés de plus de 24 mois (155). Contrairement à ce qui était attendu, ces chercheurs assistèrent à une diminution de la pression développée par le ventricule gauche, à une augmentation de l'activité des créatine kinases et à une augmentation de l'incidence des fibrillations ventriculaires (154). Bien que les résultats de ces deux études soient dérangeants, d'autres études utilisant d'autres modèles expérimentaux et d'autres paramètres (taille de l'infarctus) sont nécessaires avant de conclure que les effets bénéfiques du PCI disparaissent avec l'âge.



## 1.4.5 Les mécanismes proposés impliqués dans le préconditionnement ischémique

### 1.4.5.1 Hypothèse anatomique

#### 1.4.5.1.1 Vaisseaux collatéraux

Initialement, on croyait que la protection produite par le PCI était due à un accroissement du débit coronaire via la circulation collatérale (156). Cette hypothèse fut par la suite abandonnée, car tous les aspects du PCI ne peuvent être uniquement expliqués par l'augmentation du flot collatéral. Afin de vérifier cette hypothèse, Murry et coll. injectèrent des microsphères radiomarquées dans l'appendice auriculaire du cœur de chien et par la suite, mesurèrent la radioactivité tissulaire. Ils démontrèrent qu'il n'y avait pas de différence au niveau du débit collatéral entre les chiens préconditionnés et leurs témoins (90).

Enfin, il existe également une autre évidence qui va à l'encontre de l'hypothèse de l'augmentation du flot collatéral coronaire. Certaines espèces possédant une circulation coronaire collatérale très limitée, telles le lapin et le rat, peuvent tout de même être préconditionnées (93;94). De plus, le PCI est également reproductible dans des modèles où les collatérales deviennent d'aucune utilité comme par exemple, lorsque le cœur est globalement ischémié.

#### 1.4.5.1.2 Étourdissement (*stunning*) du myocarde

Les périodes ischémiques utilisées afin d'induire le PCI produisent des changements réversibles au niveau de la contractilité. Ce phénomène est dénommé étourdissement du myocarde. Il fut suggéré que ce phénomène, en diminuant les demandes énergétiques, puisse protéger le myocarde contre les dommages causés par une ischémie subséquente (157). Si cette hypothèse s'avérait vraie, la durée de la protection induite par le PCI se limiterait à la

période où le cœur est étourdi. Mais ce n'est pas le cas car dans le PCI « classique », la protection induite au niveau du myocarde contre les effets délétères de l'ischémie et de la reperfusion est perdue bien avant le retour de la contractilité du myocarde à des niveaux normaux (115).

D'ailleurs, le degré d'étourdissement ne correspond pas au degré de protection. En effet, Miura et coll. démontrèrent que le degré d'étourdissement était plus important lorsqu'ils utilisèrent un PCI de cinq minutes comparativement à un de deux minutes, alors que, la protection induite par ces deux PCIs fut identique (111). De leur côté, Matsuda et coll. démontrèrent que le rétablissement de la fonction contractile du myocarde à l'aide de la dobutamine au cours de la période d'étourdissement ne diminuait pas la protection produite par le PCI (158). Ces résultats suggèrent donc que « l'étourdissement du myocarde » n'est pas un acteur important du PCI.

#### **1.4.5.1.3 Effet anti-inflammatoire du préconditionnement ischémique**

Certains groupes proposèrent que le PCI pouvait protéger le myocarde via l'effet anti-inflammatoire que possèdent l'adénosine et la noradrénaline (159-164). Parmi les effets anti-inflammatoires produits par l'adénosine on retrouve : une diminution de la production du  $TNF\alpha$  (160), une diminution de l'expression de la NO synthase inductible (164), une inhibition de l'adhésion des neutrophiles et des dommages causés aux cardiomyocytes (159) et une diminution de l'accumulation des neutrophiles suivant l'ischémie et la reperfusion (163). Similairement, les agonistes adrénergiques diminuèrent la production de  $TNF\alpha$  chez l'humain (161) et diminuèrent la libération de monoxyde d'azote et de superoxydes produits par les macrophage (162). Comme l'ischémie et la reperfusion induisent des dommages au myocarde en partie par des mécanismes inflammatoires, le PCI via une production d'adénosine et de noradrénaline pourrait exercer un certain effet anti-inflammatoire sur le myocarde et du même coup induirait une protection, mais ceci reste encore à déterminer.

### **1.4.5.2 Hypothèse des mécanismes moléculaires**

Comme n'importe quel autre phénomène biochimique, le PCI consiste en une cascade d'évènements. En réponse aux stimuli engendrés par le PCI, un signal est rapidement généré et il est aussitôt traduit en un message intracellulaire. Par la suite, ce message agira sur un effecteur. Le PCI est un phénomène multifactoriel activant maintes cascades interagissant les unes sur les autres et démontrant une certaine complexité (fig.3). Dans cette thèse, bien que pleinement conscient que ceci ne reflète pas la réalité, nous essayerons de réduire ces phénomènes à leur plus simple expression, afin de faciliter la compréhension de cet ouvrage.

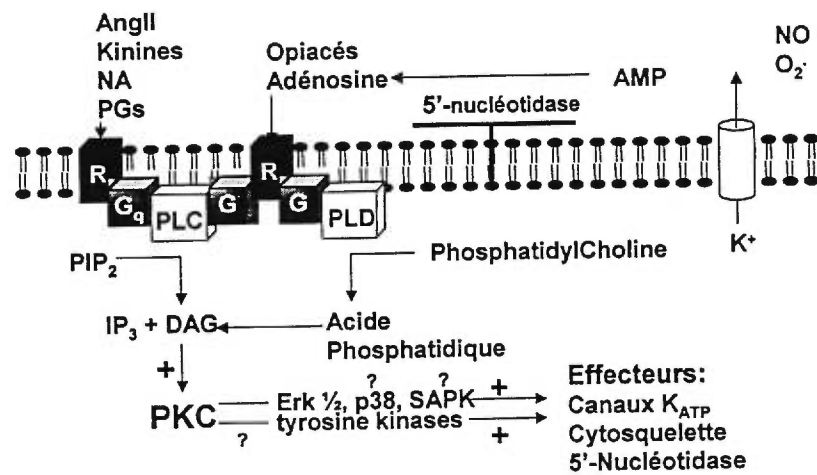
### **1.4.5.3 Médiateurs impliqués ou probablement impliqués dans le préconditionnement ischémique**

Plusieurs agents neuroendocriniens, paracriniens et exogènes ont été identifiés comme étant des stimuli du PCI. Dans cette liste nous retrouvons : l'adénosine (165), l'acétylcholine (166;167), l'angiotensine II (168), la bradykinine (169), le calcium (170), les catécholamines (171), l'endothéline (172), l'éthanol (173), le monoxyde d'azote (174), les opiacés (175) et les radicaux libres (176) pour n'en nommer que quelques uns.

#### **1.4.5.3.1 Adénosine**

Par le passé, de nombreuses études démontrèrent que l'adénosine, un nucléoside endogène produit principalement par la dégradation de l'ATP, pouvait diminuer et même prévenir les dommages causés par l'ischémie et particulièrement par la reperfusion. Cet effet protecteur est médié par une multitude de mécanismes incluant : une adhérence et une cytotoxicité réduites des neutrophiles face à l'endothélium, une diminution de la production des ions superoxydes, une augmentation de la stabilité membranaire et une diminution de la lyse de cette dernière, ainsi qu'une hyperpolarisation des myocytes via l'activation des canaux

potassiques dépendants de l'ATP entraînant une diminution de l'influx calcique (177).



**Figure 1.3:** Mécanismes impliqués dans le préconditionnement ischémique

Comme l'adénosine est rapidement formée et atteint des concentrations élevées lors de l'ischémie (178), elle fut rapidement pointée du doigt comme étant un médiateur du PCI. C'est pourquoi, la majorité des travaux publiés sur le PCI porte sur l'adénosine.

L'adénosine produit son effet physiologique principalement par l'activation de trois sous-types de récepteurs purinergiques présents à la membrane cellulaire. Au niveau du cœur, le récepteur A<sub>1</sub> est principalement localisé sur les cellules du myocarde, de son côté, le récepteur A<sub>2</sub> est généralement situé sur les cellules endothéliales coronaires ainsi que sur les membranes des leucocytes et des plaquettes (156). Pour ce qui est du troisième sous-type de récepteur, le A<sub>3</sub>, sa distribution tissulaire demeure encore nébuleuse, quoiqu'une étude suggère qu'il serait présent sur les macrophages (165). Quel récepteur est donc impliqué dans la réponse cardioprotectrice induite par le PCI?

L'effet d'une perfusion exogène d'agonistes sélectifs du récepteur A<sub>1</sub> fut étudié chez des cœurs de lapin (179), de chien (180) et de cochon (181). L'activation du récepteur A<sub>1</sub> par divers agonistes mimait l'effet protecteur du PCI (182). De leur côté, Downey et coll. rapportèrent que le prétraitement à l'aide de 8-p-sulfophenyl théophylline (SPT) ou de PD 115-199, des antagonistes non-sélectifs des récepteurs à l'adénosine, inhiba l'effet du PCI chez le lapin (179). Cependant, l'administration de ces antagonistes après le protocole de préconditionnement n'entraîna pas la perte de la cardioprotection (179). Ces résultats suggèrent donc que l'adénosine joue un rôle important dans l'induction du PCI mais n'est pas requise dans le maintien de ce phénomène cardioprotecteur.

Des études subséquentes effectuées à l'aide d'agents pharmacologiques sélectifs pour les sous-types de récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub> permirent d'identifier que les sous-types A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub> (mais pas le A<sub>2</sub>) sont spécifiquement impliqués dans cette cardioprotection (165;182;183).

À partir de ces résultats intéressants, plusieurs autres laboratoires promptement adoptèrent cette hypothèse et vérifièrent si ce phénomène était reproductible dans d'autres modèles et espèces. La plupart des études, mais pas toutes (178;184;185), en activant ou en inhibant les récepteurs A<sub>1</sub> ou en manipulant les concentrations cardiaques d'adénosine à l'aide d'inhibiteurs du transport des nucléosides ou d'inhibiteurs de l'adénosine déaminase, conclurent que chez le lapin, le chien et le porc, l'adénosine joue un rôle dans la réduction de la taille de l'infarctus induite par le PCI (181;186-191). Également, une surexpression des récepteurs A<sub>1</sub>, chez la souris transgénique, protégea le cœur des effets délétères de l'ischémie et de la reperfusion (192;193)

Il y a de plus en plus d'évidences soutenant que l'adénosine joue un rôle important dans l'induction du PCI chez l'humain. La perfusion d'adénosine avant un pontage coronaire améliore les paramètres hémodynamiques et réduit les taux de créatine kinase (CK) lors de la reperfusion (194). Leeser et coll (195) démontrèrent, chez des patients subissant une angioplastie, qu'un prétraitement à l'aide d'adénosine pouvait diminuer les douleurs rétrosternales ainsi que les modifications à l'électrocardiogramme.

L'acadesine, un inhibiteur de la dégradation de l'adénosine, diminua de 64% l'incidence de développer un infarctus au cours d'un pontage coronaire (196). Finalement, Lawson a démontré dans un modèle d'oreillette humaine isolée que la tolérance à l'hypoxie pouvait être diminuée en présence d'antagonistes des récepteurs à l'adénosine (197).

Certains résultats contradictoires semblent indiquer que l'adénosine n'est pas le seul médiateur du PCI. Premièrement, le rôle joué par l'adénosine dans le cœur de rat semble mitigé. Bien que les mêmes manipulations pharmacologiques (décrites un peu plus haut) modifiant les taux d'adénosine ainsi que l'activation de ses récepteurs furent effectuées chez le rat, les résultats furent tout à fait différents. Chez le rat, ces manipulations ne purent mimer ou bloquer l'effet

protecteur du PCI (106;138;198-200). Par exemple, la perfusion exogène d'adénosine confère une protection, mais les antagonistes  $A_1$  n'abolissent pas l'effet bénéfique du PCI (156). Également, mais cette fois-ci dans un autre modèle expérimental, Yao et coll. notèrent, chez le cœur de chien, une différence entre la durée de la protection induite par l'injection d'adénosine et celle produite par le PCI (191). Dans ce cas, la protection produite par l'injection d'adénosine disparaissait au bout de soixante minutes, alors que celle produite par le PCI dépassait allégrement cette période.

À partir de ces résultats, il fut suggéré que le PCI est un phénomène impliquant plusieurs médiateurs.

#### **1.4.5.3.2 Les catécholamines**

Les résultats impliquant les catécholamines dans la réponse protectrice induite par le PCI sont controversés. Banerjee et coll. proposèrent que la norépinéphrine, reconnue pour être libérée en réponse à un courte période ischémique (201), pouvait préconditionner le cœur de rat via une activation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques (171). Utilisant la récupération ventriculaire gauche comme index de cardioprotection, Banerjee et coll. rapportèrent que deux minutes d'ischémie globale déclenchaient la libération de norépinéphrine dans l'effluent coronaire et préconditionnaient significativement le cœur contre l'ischémie et la reperfusion (171). D'ailleurs, une perfusion exogène de norépinéphrine ou de phényléphrine, un agoniste  $\alpha$ -1, a pu mimer l'effet du PCI. Une perfusion de phentolamine, un antagoniste  $\alpha$  non-sélectif ou de BE-2254, un antagoniste sélectif du récepteur  $\alpha$ -1 bloqua la protection induite par le PCI ou par la norépinéphrine. De leur côté, Toombs et coll rapportèrent que, dans un modèle de cœur de lapin où les réserves de noradrénaline furent épuisées à l'aide de réserpine, l'effet protecteur du PCI face à l'infarctus fut aboli (202). Un autre groupe démontra que la stimulation des récepteurs  $\alpha$ -1b chez le rat induisait une protection contre l'ischémie (203).

Ces résultats suggèrent que les catécholamines sont de potentiels médiateurs du PCI.

Cependant, la noradrénaline ne semble pas libérée dans l'effluent coronaire des cœurs de lapin préconditionnés (204). Seyfarth et coll rapportèrent que le PCI abolit la libération de la noradrénaline au cours de la période d'ischémie subséquente (205). Selon ces résultats, le PCI protège le cœur non pas via une augmentation de la libération des catécholamines au cours de la période de PCI, mais bel et bien en réduisant le dommage induit par les catécholamines durant la période d'ischémie prolongée.

#### 1.4.5.3.3 Les kinines

La contribution des kinines à l'effet protecteur induit par le PCI fut également étudiée chez le cœur de rat isolé, chez le chien et le lapin *in vivo*. Goto et coll. démontrèrent que dans le cas de cœur de lapin isolé, des perfusions de bradykinine pouvaient mimer l'effet protecteur du PCI (169). Un prétraitement à l'aide d'un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub>, le Hoe140, bloqua cette réponse cardioprotectrice. D'autres études révélèrent que l'activation du récepteur B<sub>2</sub> était impliquée dans l'effet bénéfique du PCI au niveau des arythmies induites par l'ischémie et la reperfusion (206), de la taille de l'infarctus (169;207) et de la récupération de la fonction contractile post-ischémique (208).

Plusieurs études ont également démontré qu'une perfusion exogène de bradykinine pouvait avoir un effet protecteur contre les fibrillations ventriculaires induites par l'ischémie et la reperfusion (209). De plus, il a été démontré qu'une perfusion exogène de bradykinine et de des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine diminuait la libération de catécholamines et les arythmies à la reperfusion via le récepteur B<sub>1</sub> (210).



#### 1.4.5.3.4 Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote semble être un autre médiateur du PCI. En effet, Vegh et coll. démontrèrent que l'administration intracoronaire d'un agent interférant avec l'effet du monoxyde d'azote sur la guanylate cyclase, le bleu de méthylène, et l'administration intraveineuse d'un inhibiteur de la NO synthase, atténuent l'effet antiarythmique du PCI (211). De plus, la bradykinine libérée au cours du PCI semble protéger le cœur via une production de monoxyde d'azote et de prostacycline (212). Certains groupes rapportèrent que le monoxyde d'azote pouvait augmenter l'activité des canaux potassiques dépendants de l'ATP (213;214) qui comme nous le verrons plus loin, semblent impliqués dans le PCI.

#### 1.4.5.3.5 Les prostaglandines

Au niveau de la circulation coronaire, l'ischémie et l'hypoxie sont reconnues comme de puissants stimuli de la libération de prostaglandines (215-219). Plusieurs équipes ont même suggéré que les produits de la cyclooxygénase (COX) pouvaient être des médiateurs du PCI. Vegh et coll, rapportèrent que le meclofenamate, un inhibiteur des COX, pouvait abolir l'effet antiarythmique du PCI (220). Un autre groupe démontra, cette fois dans le cœur isolé de rat, qu'une perfusion d'aspirine pouvait abolir l'effet bénéfique du PCI sur les tachyarythmies (221). D'autre part, certains groupes ne purent démontrer l'effet inhibiteur de l'aspirine sur le PCI et ce tant au niveau de la taille de l'infarctus (222) qu'au niveau de l'incidence des arythmies (222;223).

Certains groupes ont démontré que la perfusion exogène de prostaglandines pouvait également préserver le métabolisme du myocarde (224) et diminuer la taille de l'infarctus (225). D'ailleurs, le defibrotide, un agent pouvant induire la production et la libération endothéliale de prostacycline, peut significativement protéger le cœur, le rein et le foie de rat contre les dommages causés par l'ischémie (226). Mais certaines études rapportèrent des résultats contraires au

niveau des fibrillations ventriculaires associées à l'ischémie et à la reperfusion (227-229). Donc, le rôle des prostaglandines comme médiateur du PCI demeure controversé.

#### **1.4.5.3.6 Les cannabinoïdes**

Il fut rapporté que le delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol, l'agent psychoactif dérivé de la marijuana, se lie aux récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> des cannabinoïdes (230). Donc, l'existence de ces récepteurs implique implicitement la présence de ligands endogènes. Confirmant cette hypothèse, il y a quelques années, on a démontré que l'arachidonyléthanolamide (AEA) (231), le palmitoylethanolamide (PEA) (232) et le sn-2 arachidonylglycérol (2-AG) (233;234) pouvaient être naturellement produits par la membrane cellulaire de divers organes. De plus, ces produits endogènes se lient aux récepteurs CB<sub>1</sub> et/ou CB<sub>2</sub> et démontrent des effets semblables à ceux des agents dérivés du cannabis. Les cannabinoïdes possèdent une activité immunosuppressive (232;235) et peuvent agir comme agents antioxydants (236). D'ailleurs, il fut démontré que ces produits possédaient certains effets au niveau du système cardiovasculaire (237;238) et l'ARN<sub>m</sub> codant pour leurs récepteurs est présent dans le cœur (239). Toutes ces propriétés font des cannabinoïdes endogènes d'excellents candidats pour la cardioprotection.

Cependant, pour le moment, rien n'est connu sur le rôle joué par les cannabinoïdes endogènes lors du PCI. Alors, un des buts des travaux exécutés au cours de cette thèse était de vérifier si ces agents produits de façon endogène pouvaient protéger le cœur et la fonction endothéliale contre les effets délétères causés par l'ischémie et la reperfusion.

#### **1.4.5.3.7 Les opiacés**

En 1995, Schultz et coll. observèrent, chez le rat, qu'il était possible de bloquer l'effet protecteur produit par le PCI sur la taille de l'infarctus à l'aide de la

naloxone, un antagoniste non-sélectif des récepteurs aux opiacés (175). Ces résultats furent également reproductibles chez le lapin (240). Chez le rat, il semble que cette cardioprotection soit due à l'activation des récepteurs delta-1 aux opiacés périphériques (241-244) et non aux sous-types mu ou kappa (242). Mais ces résultats semblent controversés. En effet, Wu et coll démontrèrent l'implication des récepteurs kappa (245) chez le rat.

Chez le lapin (246) et chez le rat (245), les opiacés semblent induire le PCI via l'activation des protéine kinases C. Fait intéressant à noter, les opiacés semblent également être impliqués dans le PCI chez l'humain (247).

En 1996, Schultz et coll. démontrèrent que des opiacés perfusés de façon exogène tel la morphine pouvaient avoir un effet cardioprotecteur chez le rat et que cet effet pouvait être bloqué par le glibenclamide, suggérant donc la participation des canaux potassiques dépendants de l'ATP (248). D'autres chercheurs rapportèrent que chez le rat, la morphine protégeait le myocarde via une diminution de l'activité des neutrophiles (249). Schultz et ses collègues observèrent également qu'un agoniste sélectif des récepteurs delta-1 aux opiacés, le Tan-67, pouvait diminuer la taille de l'infarctus chez le rat via l'activation d'une protéine Gi et des canaux potassiques dépendants de l'ATP (250). De leur côté, Liang et coll. observèrent, à l'aide de cardiomyocytes en culture, que la réponse cardioprotectrice induite par la morphine était surtout produite via l'activation des canaux potassiques dépendants de l'ATP présents sur la membrane des mitochondries (251).

#### 1.4.5.4 L'amplification du signal engendré par le préconditionnement ischémique

##### 1.4.5.4.1 Les protéines G

Le message produit par le PCI est généré via l'activation de récepteurs présent à la surface de la membrane cellulaire couplés à des protéines G. En effet, les récepteurs de l'adénosine ( $A_1$ ), des cannabinoïdes ( $CB_1$  et  $CB_2$ ), des kinines ( $B_1$  et  $B_2$ ), de l'acétylcholine (muscarinique  $M_2$ ) de la noradrénaline ( $\alpha-1$ ), des opiacés ( $\sigma$ ) et des prostaglandines (IP et EPs), sont tous des récepteurs possédant sept passages transmembranaires et donc couplés à des protéines G (156). Le thème commun semble être que tous ces récepteurs sont couplés à des protéines G inhibitrices sensibles à la toxine pertussique (203;252). Lorsque stimulées, ces protéines modulent l'activité de certains canaux ioniques ou enzymes comme les phospholipases C et D (253) et l'adénylate cyclase. Les deux premiers enzymes catalysent l'hydrolyse des phospholipides membranaires, augmentant ainsi les niveaux intracellulaires de diacylglycérol et de inositol trisphosphate (253). De son côté, l'inhibition de l'adénylate cyclase amène une diminution de la production d'AMPc.

##### 1.4.5.4.2 Les protéine kinases C

Le diacylglycérol active les protéine kinases C (PKC), une famille d'enzymes proposée comme jouant un rôle primordial dans le PCI. Cette famille possédant la capacité de phosphoryler divers substrats spécifiques contenant des résidus sérine et thréonine participe à l'homéostasie en régulant l'échange ionique, le tonus vasculaire, la contractilité du myocyte et beaucoup d'autres processus cellulaires (254;255). Les PKCs possèdent deux domaines fonctionnels, un domaine régulateur hydrophobe contenant des sites de liaison pour les phospholipides, le calcium, le diacylglycérol et les esters de phorbol et un domaine catalytique hydrophile contenant les sites de liaison à l'ATP et au

substrat protéinique (256;257). Les PKCs catalysent le transfert du phosphate  $\gamma$ -terminal de l'ATP vers le groupement hydroxyl des résidus sérine et/ou thréonine de divers substrats protéiques (253;258).

La famille des PKC est composée de douze isoenzymes classés en trois sous-familles distinctes. La première sous-famille comprend les isoformes classiques ou conventionnelles  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\gamma$  et leur activation requiert la présence de calcium et de lipides (la phosphatidylserine, le DAG ou le 4 $\beta$ -phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)). La sous-famille des nouvelles isoformes de la PKC comprend les PKCs  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\mu$  et leur activation requiert uniquement la présence de lipides. La dernière sous-famille comprend les isoformes atypiques  $\zeta$ ,  $\iota$  et  $\lambda$ . Lors de son activation, la PKC  $\zeta$  requière seulement la phosphatidylserine (259).

Les nouvelles PKCs  $\delta$  et  $\epsilon$  sont les principales isoformes retrouvées dans le cœur de rat adulte. On y retrouve également, mais en plus faibles concentrations, les isoformes  $\eta$  (nouvelles),  $\iota$  et  $\zeta$  (atypiques). Les isoformes conventionnelles ne constituent qu'une infime proportion des PKCs retrouvées dans le cœur de rat (260-263).

À l'état de repos, les PKCs sont préférentiellement localisées dans le cytosol. Lorsqu'elles sont activées, elles subissent une translocation, selon leur isoforme, vers la membrane cellulaire, le noyau, les myofibrilles ou tout autre endroit en périphérie de la cellule (254).

Les premières évidences suggérant l'implication des PKCs dans le PCI furent, cette fois encore, obtenues à l'aide de l'approche pharmacologique classique, c'est-à-dire celle utilisant comme outils les agonistes et les antagonistes. Par exemple, au niveau du cœur de lapin, l'administration d'inhibiteurs des PKCs bloque la réponse protectrice induite par le PCI, et la perfusion exogène d'activateurs des PKCs mime les effets bénéfiques du PCI (264). Également, Ytrehus et coll. (265) and Liu et coll. (266) rapportèrent que des inhibiteurs des

PKCs, la staurosporine et la polymyxin B, administrés après la période de PCI, inhibaient l'effet protecteur du PCI sur la taille de l'infarctus. D'autres études effectuées chez des cœurs isolés de lapin démontrèrent que les inhibiteurs des PKCs étaient efficaces seulement lorsqu'ils étaient donnés très tôt au début de la période ischémique (267). De plus, l'administration d'activateurs des PKCs comme le (PMA) et le 1-oleyl-2-acétyl glycérol (OAG) protégea le cœur isolé de lapin contre une occlusion coronaire de 30 minutes (265;266). Finalement, une série d'articles récents ont rapporté que la réponse protectrice induite par d'autres agents activant des récepteurs couplés aux protéines G tels : la noradrénaline (268), l'angiotensine II (269) et la bradykinine (169), pouvait être bloquée par des antagonistes des PKCs.

Des études d'immunobuvardage ont permis de déterminer que lors du PCI, les principales isoformes de PKC activées sont les  $\epsilon$  et  $\eta$  chez le lapin (270) et les  $\delta$  et  $\epsilon$  chez le rat (260).

L'implication des PKCs dans le PCI a également été démontrée dans le cœur de rat (271). Goto et coll. proposèrent que, pour que le PCI survienne, le niveau seuil de l'activation des PKCs doit être atteint (169). À partir de cette hypothèse, le PCI devient un processus multifactoriel requérant l'implication de plusieurs agonistes, leurs actions conjointes et concertées permettant l'atteinte du niveau seuil de l'activation des PKCs.

Comme décrit précédemment, lorsque activé, l'enzyme semble devoir migrer vers la membrane cellulaire (266). En 1992, Strasser et coll. (272) démontrèrent à l'aide de cœurs isolés de rat que 10 minutes d'ischémie globale entraînait une modeste mais significative translocation des PKCs. L'activité totale des PKCs dans le cytosol diminua, mais leur activité augmenta au niveau du noyau et des membranes. Ces travaux amenèrent Ytrehus et ses collaborateurs (265) à proposer que les brèves périodes ischémiques utilisées afin d'induire le PCI entraînent l'activation et la translocation des PKCs du cytosol vers la membrane

cellulaire, positionnant ainsi ces enzymes tout près de leurs cibles. Ceci permet la phosphorylation d'effecteurs membranaires et induit les effets bénéfiques du PCI. Plus récemment, ces chercheurs raffinèrent leur hypothèse en spécifiant que la translocation des PKCs doit être manifeste au début de la période d'ischémie prolongée et non durant l'ischémie induisant le PCI (267).

Chez le rat, des études immunohistochimiques ont permis d'identifier la présence des PKCs dans le sarcolemme tout juste après le PCI (260). Chez le lapin, l'inhibition de l'activité microtubulaire à l'aide de colchicine, un agent perturbant l'intégrité du cytosquelette et prévenant la migration des PKCs à la membrane, inhibe la réponse cardioprotectrice induite par le PCI (266).

Ces résultats semblent démontrer que les PKCs pourraient être la voie de signalisation unifiant tous les médiateurs du PCI. Cependant de récentes études remettent ce rôle en question. Vahlhaus et coll., utilisant la staurosporine comme inhibiteur de la PKC, furent incapable de bloquer la réponse cardioprotectrice induite par le PCI chez le porc (273). De leur côté, Simkhovich et coll., ne purent démontrer une translocation des PKCs lors du PCI (274). Bien que ces controverses puissent provenir d'une variation inter-espèce, le rôle des PKCs dans la réponse cardioprotectrice associée au PCI demeure incertain.

#### **1.4.5.4.3 Phospholipases D et tyrosine kinases**

Bien que les PKCs représentent sans aucun doute la voie de signalisation impliquée dans le PCI la plus étudiée et la plus chaudement débattue, elles ne sont pas les seules candidates proposées. Par exemple, de récentes évidences rapportées par Cohen et coll. semblent suggérer que, du moins chez le lapin et le rat, il existerait un autre activateur des PKCs produits par la phospholipase D (PLD) (275). Cette hypothèse est supportée par le fait que l'activité de la PLD est doublée après l'induction du PCI autant chez le lapin (275) que chez le rat (276). De plus, l'utilisation d'un activateur de la PLD, l'oléate de sodium, ou d'un

inhibiteur de la PLD, le propranolol, mima et bloqua respectivement l'effet du PCI sur la taille de l'infarctus chez le cœur de lapin (275). Malheureusement, dans cette étude, l'utilisation du propranolol est discutable. En effet, ce médicament possède entre autre un effet marqué sur les récepteurs  $\beta$  du système adrénergique, ce qui peut causer une interférence marquée sur les résultats observés.

D'autres voies de signalisation furent également étudiées, une de ces voies étant celle des tyrosine kinases. Maulik et ses collaborateurs observèrent que l'augmentation de l'activité de la PLD par le PCI pouvait être bloquée par la génistéine, un inhibiteur des tyrosine kinases (276). Pour le moment, il y a d'autres évidences pharmacologiques suggérant l'implication des tyrosine kinases dans le PCI au niveau du cœur de lapin et de porc. Chez le lapin, la génistéine bloqua la diminution de la taille de l'infarctus induite par le PCI (277). Chez le porc, le PCI fut bloqué par l'administration conjointe de génistéine et d'un inhibiteur des PKCs, la staurosporine (278). Pour l'instant, nous ne sommes qu'au début de l'investigation sur les voies de signalisation alternatives du PCI. D'autres études seront nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer la participation de ces nouveaux joueurs.

#### 1.4.5.4 Mitogen-activated protein kinases

En plus des PKCs et des tyrosine kinases, d'autres cascades de protéine kinases semblent être impliquées dans le PCI, spécialement celles des *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs). Trois importantes familles de MAPKs sont présentes chez les eukaryotes, la cascade « classique » p42/p44 MAPKs (également dénommée p42/p44 ERK1/2), la cascade p38 et la cascade de la *stress activated c-jun N-terminal kinase* (SAPK ou JNK).

Il a été démontré que les PKCs peuvent phosphoryler et activer la kinase raf-1, ce qui relie directement la voies de PKCs à celle des MAPKs de la famille des



p42/p44 MAPKs. Maulik et coll. ont rapporté que de courtes périodes ischémiques comme celles utilisées pour induire le PCI pouvaient rapidement augmenter l'activité des p42/p44 MAPKs (276;279). Également, ils démontrèrent que ce phénomène impliquait l'activation de tyrosine kinases qui à leur tour activaient la voie p42/44 MAPKs (276;280). D'autres groupes ont suggéré que l'ischémie pouvait amener l'activation de la cascade des p38 kinases (281) et de celle des SAPKs (279;281).

L'implication des MAPKs dans le PCI est encore toute récente et mal expliquée. Par exemple, on ne sait pas quelle est leur interaction avec les canaux ioniques ou les différents enzymes impliqués dans le PCI. D'autres études pharmacologiques et biochimiques sur différents modèles et effectuées sur différents paramètres du PCI doivent être réalisées avant que l'on puisse confirmer leur implication dans le PCI.

#### **1.4.5.4.5 5'-nucléotidase et préconditionnement ischémique**

Kitakaze et coll. ont proposé que la stimulation des récepteurs  $\alpha$ -1 adrénergiques au cours du PCI activait les PKCs et entraînait une régulation à la hausse des 5'-nucléotidases, enzymes responsables de la déphosphorylation de l'adénosine monophosphate en adénosine (282;283). Ceci augmente les taux d'adénosine, amplifie l'activation des PKC via un récepteur couplé aux protéines G et potentialise la cardioprotection. Afin de supporter leur hypothèse, ce groupe démontra une augmentation des concentrations d'adénosine dans le sang coronaire veineux chez les animaux préconditionnés. De plus, chez le chien, un traitement à l'aide d'adénosine 5'-diphosphate  $\alpha,\beta$ -méthylène, un inhibiteur de la 5' nucléotidase ectosolique abolit l'effet du PCI (282-285). Également, Kitakaze et coll. démontrèrent qu'une perfusion intracoronaire d'un inhibiteur spécifique des PKCs, le GF109203X, bloquait l'augmentation de l'activité des 5'-nucléotidases ectosoliques et du même coup diminuait la réponse protectrice induite par le PCI (286).

#### 1.4.5.4.6 Le rôle joué par le calcium

De courtes périodes d'ischémie, comme celles utilisées afin d'induire le PCI, produisent d'éphémères et réversibles augmentations de concentrations intracytosoliques de calcium (287). Comme décrit précédemment, l'homéostasie ionique, particulièrement celle du calcium, est cruciale à la viabilité des cellules cardiaques. De plus, le calcium est impliqué dans une multitude de voies de signalisation. Ces résultats nous permettent d'imaginer qu'il puisse jouer un rôle important dans le PCI.

L'effet de courtes infusions intracoronaires de  $\text{CaCl}_2$  fut étudié. Celles-ci rendirent le cœur plus résistant à l'ischémie (288;289). Il n'est donc pas surprenant de s'apercevoir que certains groupes aient proposé que de brèves augmentations du calcium intracellulaire produites par un ou de courtes périodes ischémiques puissent agir comme second messenger du PCI (170;288;289).

D'autres chercheurs proposèrent que le PCI puisse produire des modifications favorables dans l'homéostasie du calcium. Par exemple, chez le cœur de rat, il fut démontré que le PCI atténue, lors de l'ischémie subséquente, l'augmentation des taux de capture et de libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique (108;154). Également, il fut rapporté que le PCI diminuait la libération de calcium sarcoplasmique induite par le calcium (290).

#### 1.4.5.5 Mécanismes effecteurs du préconditionnement ischémique

##### 1.4.5.5.1 Les canaux potassiques dépendants de l'ATP

En 1983, Noma identifia le « *outward injury current* » qu'il observa chez le myocarde ischémié. Ce courant était produit par l'efflux de potassium à travers les canaux potassiques dépendants de l'ATP (291). Les canaux potassiques

dépendants de l'ATP sont des canaux potassiques composés de récepteurs aux sulfonylurées couplés aux unités Kir6.2 d'un canal « *inward rectifier* » (292). Ces canaux doivent leur nom à leur capacité de s'ouvrir lorsque les concentrations d'ATP diminuent. Ceci produit une hyperpolarisation de la membrane raccourcissant ainsi le potentiel d'action cardiaque et, via une diminution du courant calcique médiée par les canaux calciques dépendants du voltage, induit une relaxation des myocytes et produit une certaine cardioplégie. Également, cette diminution de l'influx calcique atténue la surcharge en ions calcium ce qui augmente la survie des myocytes (291;293). Mis ensemble, ces effets convergent vers l'hypothèse que les canaux potassiques dépendants de l'ATP peuvent participer à la cardioprotection.

Cependant, les canaux potassiques dépendants de l'ATP sont inhibés à des concentrations d'ATP beaucoup plus basses que celles observées au cours de l'ischémie (294). Alors, l'efflux potassique observé durant l'ischémie ne peut être complètement expliqué par une diminution de l'ATP.

C'est pourquoi, il a été proposé que le PCI produit une phosphorylation des canaux potassiques dépendants de l'ATP, ceci entraînant leur ouverture et la cardioprotection. Plusieurs évidences observées dans des modèles animaux convergent vers l'implication des canaux potassiques dépendants de l'ATP dans le PCI (295) et ces résultats sont reproductibles chez l'humain.

Nombre d'études ont rapporté que des substances impliquées dans le PCI, comme l'adénosine (182) et l'acétylcholine (167) produisaient leur effet via l'activation des canaux potassiques dépendants de l'ATP. Par exemple, en 1992, Gross et Auchampach (296), à partir de l'hypothèse que les récepteurs A<sub>1</sub> étaient couplés aux canaux potassiques dépendants de l'ATP via une protéine G<sub>i</sub> (297), proposèrent que l'ouverture de ce type de canaux était impliquée dans le PCI. Afin de tester leur hypothèse, le glibenclamide, un bloquant sélectif des canaux potassiques dépendants de l'ATP, fut administré à des chiens soit avant ou

immédiatement après les brèves périodes d'ischémie servant à induire le PCI. Ils observèrent que le glibenclamide bloqua l'effet protecteur qu'avait le PCI sur la taille de l'infarctus (296). Dans cette étude et dans les subséquentes, les investigateurs établirent que l'acide 5-hydroxydécanoïque (une autre bloquant de canaux potassiques dépendants de l'ATP) prévenait et que les activateurs de ces mêmes canaux tel le bimakalim et l'aprikalim mimaient la réduction de la taille de l'infarctus produite par le PCI. Ils démontrèrent également le lien et le synergisme existant entre l'activation des récepteurs à l'adénosine, l'ouverture des canaux potassiques dépendants de l'ATP et la cardioprotection (187;191;298). De plus, Speechly-Dick et coll., en utilisant le glibenclamide comme bloquant dans canaux potassiques dépendants de l'ATP, ont démontré leur implication au niveau de l'oreillette humaine (299).

Également, il semble exister une étroite relation entre les récepteurs à sept passages transmembranaires, les protéines  $G_i$ , les PKCs et les canaux potassiques dépendants de l'ATP. En effet, il fut démontré que les récepteurs à l'adénosine sont reliés à la phospholipase C et produisent le diacylglycérol via un système couplé aux protéines G (300). De plus, les PKCs peuvent phosphoryler les canaux potassiques dépendants de l'ATP, ce qui favorise leur ouverture même à des niveaux d'ATP physiologiques (301). Il fut également rapporté que la réponse protectrice induite par un activateur des PKCs, le dioctanoylglycérol, pouvait être abolie par le glibenclamide (299). D'ailleurs, il semble que l'action de l'adénosine et des PKCs sur les canaux potassiques dépendants de l'ATP soit synergique (302).

Les canaux potassiques présents au niveau de la membrane cellulaire furent les plus étudiés et semblent avoir un rôle à jouer dans le PCI. Actuellement, l'implication des canaux potassiques dépendants de l'ATP présents sur les membranes des mitochondries est à l'étude. Bien que leur identité moléculaire pour l'instant ne soit pas très bien connue et que leur effet lors du PCI ne soit pas identifié, tout porte à croire qu'ils représentent de bons candidats. Une de leurs

fonctions connues, en concert avec l'échangeur  $K^+/H^+$ , est de maintenir l'homéostasie du potassium dans les mitochondries et de réguler leur volume et leur pression osmotique, qui en retour influence la consommation énergétique et la destinée des mitochondries et du même coup module la survie de la cellule toute entière (303). Ceci amena Garlid et coll. à proposer leur implication lors du PCI. En utilisant la diazoxide, un puissant activateur des canaux potassiques dépendants de l'ATP présents au niveau de mitochondries, ces auteurs démontrèrent un important effet cardioprotecteur chez le rat (304). Mais présentement, il est encore trop tôt pour confirmer hors de tout doute l'implication de ces canaux lors du PCI.

D'autres effecteurs du PCI ont également été suggérés, comme par exemple ceux impliqués dans les effets du PCI sur la consommation énergétique (133;305) et sur les modifications du cytosquelette (306).

## 1.5 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

Ayant maintenant démontré le rôle primordial joué par l'endothélium dans l'homéostasie cardiovasculaire toute entière et les dommages infligés à celui-ci par l'ischémie et la reperfusion, il est facilement compréhensible que l'on veuille protéger son intégrité et sa fonctionnalité des effets délétères de l'ischémie. Comme illustré précédemment, plusieurs méthodes s'offrent à nous, mais l'une des plus efficaces semble être celle du PCI et de ces médiateurs. D'ailleurs certains groupes ont déjà démontré que le PCI pouvait protéger la fonction endothéliale des effets délétères de l'ischémie (57;145).

C'est donc pour cette raison que nous avons choisi cette approche et que nous voulions savoir si, dans nos conditions expérimentales, le PCI était reproductible au niveau de l'endothélium coronaire de rat et si oui, nous voulions en connaître les mécanismes qui n'étaient pas encore identifiés à ce moment.

### **1.5.1 Reproductibilité du préconditionnement ischémique et implication des canaux potassiques dépendants de l'ATP au niveau de l'endothélium**

Il y a quelques années, certaines études ont démontré que les effets bénéfiques du PCI n'étaient pas seulement limités aux cardiomyocytes, mais pouvaient être observés au niveau des cellules endothéliales de certains modèles expérimentaux tels : les vaisseaux coronaires de résistance de chien *in vivo* (57) et les artères de conductance de rat *in vitro* (145).

Par le passé, il fut démontré que l'ischémie et la reperfusion entraînait une dysfonction endothéliale des grands (55;56) et des petits vaisseaux coronaires isolés (57). Mais au début des travaux de cette thèse, peu était connu sur les effets que pouvait avoir le PCI sur la fonction endothéliale du lit coronaire de rat.

Le premier but de l'article présenté au deuxième chapitre était donc d'évaluer si l'effet protecteur induit par le PCI était reproductible au niveau de la fonction endothéliale chez le cœur de rat isolé. Le second but était d'identifier par quel mécanisme le PCI produisait sa protection. Deux mécanismes furent évalués : premièrement l'activation des récepteurs à l'adénosine au cours du PCI, et deuxièmement la participation des canaux potassiques dépendants de l'ATP à ce phénomène.

### **1.5.2 Reproductibilité du préconditionnement ischémique dans un modèle pathologique, le diabète**

Il y a quelques années, une étude rapporta que, dans un modèle de rat diabétique non insulino-dépendant, le PCI réduisait la taille de l'infarctus (152). Par contre, dans ce même modèle, le PCI n'a pu réduire l'incidence des arythmies ventriculaires et n'a pu améliorer la fonction ventriculaire (307;308).

Mais pour l'instant, l'effet du PCI sur la fonction endothéliale de rat diabétique est inconnu et l'on ne sait pas non plus si l'adénosine peut mimer l'effet protecteur du PCI dans ce modèle pathologique. Comme le diabète est associé à des dysfonctions endothéliales (309;310) et contractiles (311;312) et que les animaux diabétiques ne réagissent pas de la même façon à l'ischémie (313;314), les réponses amenées par cette étude revêtiront une grande importance tant au niveau fondamental que clinique.

Le premier but de l'article composant le chapitre 3 fut d'évaluer si le PCI était reproductible au niveau de la fonction endothéliale et de la contractilité cardiaque du rat diabétique. Le second but fut de vérifier si une perfusion exogène d'adénosine pouvait mimer l'effet protecteur du PCI dans ce modèle pathologique.

### **1.5.3 Implication des kinines dans le préconditionnement ischémique au niveau de l'endothélium**

La contribution des kinines à la protection induite par le PCI fut étudiée à l'aide de différents modèles expérimentaux. Ces travaux révélèrent l'implication des récepteurs B<sub>2</sub> dans la réduction des arythmies associées à l'ischémie et à la reperfusion (206), dans la diminution de la taille de l'infarctus (207) et dans l'amélioration de la récupération ventriculaire post-ischémique (208) induites par le PCI. Également, de nombreuses études démontrèrent qu'une perfusion exogène de bradykinine prévenait l'apparition de fibrillations ventriculaires post-ischémiques (209;315). De plus, Chahine et coll. démontrèrent qu'une perfusion exogène de bradykinine ou de des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine diminue l'incidence des arythmies et la libération de catécholamines via le récepteur B<sub>1</sub> (210).

Cependant, cette fois-ci encore, peu de choses sont connues sur le rôle joué par les kinines lors du PCI au niveau de l'endothélium. Donc le but initial du manuscrit présenté au quatrième chapitre était de déterminer si les kinines étaient impliquées

dans la réponse protectrice induite par le PCI au niveau de la fonction endothéliale. Le deuxième objectif était d'évaluer si une perfusion exogène de bradykinine ou de des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine pouvait mimer l'effet bénéfique produit par le PCI.

#### **1.5.4 Implication des prostaglandines dans la protection endothéliale induite par le préconditionnement ischémique**

Il fut démontré que l'ischémie et l'hypoxie étaient d'importants modulateurs de la libération de prostacycline de la circulation coronaire (215-219). De plus, de nombreuses études ont suggéré que les produits de la cyclooxygénase (COX) participent à l'effet protecteur du PCI. D'ailleurs, Vegh et coll. observèrent que l'effet antiarythmique du PCI était aboli par un prétraitement à l'aide du meclofenate, un inhibiteur des COXs (220). Utilisant le modèle de cœur isolé perfusé selon Langendorff, un autre groupe rapporta que l'aspirine abolissait l'effet qu'avait le PCI sur les tachycardies associées à la reperfusion (221).

D'autres études démontrèrent que des perfusions exogènes de prostaglandines préservaient le métabolisme cardiaque (224) et diminuaient la taille de l'infarctus (225) lors de l'ischémie. D'ailleurs, le défibrotide, un agent augmentant la production endothéliale de prostacycline, protégea le cœur, le rein et le foie de rat contre les dommages infligés par l'ischémie (226).

Cependant, à cette époque, le rôle joué par les prostaglandines produites de façon endogène lors du PCI demeurait encore inconnu. Alors l'objectif premier de l'étude présentée au cinquième chapitre fut de déterminer si le PCI produisait son effet protecteur sur la fonction endothéliale via l'activation de la production et la libération de prostaglandines. Le second but de cette étude était de vérifier si une perfusion exogène de prostaglandines pouvait mimer l'effet bénéfique du PCI.



### 1.5.5 Implication des cannabinoïdes endogènes dans le préconditionnement ischémique

Le delta<sup>9</sup>-Tetrahydrocannabinol, l'agent psychoactif dérivé de la marijuana, se lie à des récepteurs spécifiques (CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>) (230). L'existence de ces récepteurs implique donc la présence de ligands endogènes. L'arachidonyléthanolamide (AEA) (231), le palmitoyléthanolamide (PEA) (232) et le *sn*-2 arachidonylglycérol (2-AG) (233;234) sont des constituants apparentés aux prostaglandines produits de façon endogène par la membrane de divers organes. De plus, ces agents se lient aux récepteurs CB<sub>1</sub> et/ou CB<sub>2</sub> aux cannabinoïdes et démontrent des propriétés pharmacologiques comparables à ceux des dérivés du cannabis.

Il a été démontré que les cannabinoïdes possèdent une action suppressive sur le système immunitaire (232;235) et sont des agents antioxydants (236). De plus, ces produits démontrent des effets cardiovasculaires (237;238) et l'ARNm codant pour leurs récepteurs spécifiques fut détecté dans le cœur (239). Certains auteurs ont même rapportés que les cannabinoïdes produits de façon endogène pourraient être l'EDHF (37-39). Comme nous avons vu précédemment, une hyperpolarisation de la membrane raccourcit le potentiel d'action cardiaque, induit une relaxation des myocytes et produit une certaine cardioplégie. Également, elle atténue la surcharge en ions calcium ce qui augmente la survie des myocytes. Toutes ces propriétés font des cannabinoïdes des candidats probables de la cardioprotection.

Pour le moment, aucune équipe n'a étudié si les cannabinoïdes endogènes étaient impliqués dans le PCI. Donc, le but de cette étude était 1) de vérifier si les cannabinoïdes endogènes étaient produits au niveau du cœur et s'ils étaient impliqués dans le PCI et 2) d'évaluer si une perfusion exogène de ces produits mimait l'effet du PCI.

## 1.6 OBJECTIFS GÉNÉRAL ET SPÉCIFIQUES

L'objectif général de cette thèse était d'étudier à l'aide d'une approche fonctionnelle et parfois biochimique les médiateurs et les mécanismes impliqués dans le preconditionnement ischémique au niveau de la fonction endothéliale dans des modèles sain et pathologique.

Plus spécifiquement, les protocoles expérimentaux utilisés au cours de cette thèse avaient de pour but d'(de):

- 1- Évaluer si le PCI était reproductible au niveau de la fonction endothéliale du cœur de rat
- 2- Évaluer si le PCI était reproductible chez l'animal diabétique
- 3- Déterminer les médiateurs impliqués dans ce phénomène. Dans cette thèse furent évalués : l'adénosine, la bradykinine, la des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine, la prostacycline, la prostaglandine E<sub>2</sub>, l'arachidonylethanolamide, le palmitoylethanolamide et le *sn*-2 arachidonyleglycérol.
- 4- Déterminer les récepteurs impliqués lors du PCI. Parmi ceux-ci furent évalués : les récepteurs à l'adénosine, aux prostaglandines, aux kinines et aux cannabinoïdes.
- 5- Déterminer quelles étaient les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le PCI. Les canaux potassiques dépendants de l'ATP et les protéine kinases C furent évalués au cours de cette thèse.

CHAPITRE DEUX : MECHANISMS OF PROTECTION AFFORDED BY PRECONDITIONNING  
TO ENDOTHELIAL FUNCTION AGAINST ISCHEMIA.

## 2.1 ABSTRACT

The aim of this study was to assess whether the cardioprotective effect of ischemic preconditioning (IPC) on endothelial function in resistance coronary arteries of the rat involves adenosine and/or activation of ATP-sensitive  $K^+$  channels ( $K_{ATP}$  channels). Isolated rat hearts perfused under constant flow conditions were exposed to 30 min of partial ischemia (flow rate 1 ml/min) followed by 20 min of reperfusion. Preconditioning was performed with 5 min ischemia and 10 min reperfusion before the 30-min ischemia. After the 20-min reperfusion period, coronaries were precontracted with U-46619  $0.1\mu\text{M}$ , and the coronary response to the endothelium-dependent vasodilator, serotonin (5-HT,  $10\mu\text{M}$ ), was compared to that of the endothelium-independent vasodilator, sodium nitroprusside (SNP,  $3\mu\text{M}$ ).  $K_{ATP}$  channels or adenosine receptors were blocked with perfusion of either glibenclamide  $0.3\mu\text{M}$  or 8-phenyltheophylline  $5\mu\text{M}$  (8-PT) respectively, starting 15 min before IPC or a corresponding sham period. In untreated hearts, ischemia diminished selectively 5-HT-induced vasodilation, compared to sham hearts (without ischemia). The vasodilation by SNP was unaffected after ischemia and reperfusion. Preconditioning in untreated hearts preserved the vasodilation produced by 5-HT. Treatment of hearts with either glibenclamide or 8-PT halved the vasodilation produced by both 5-HT and SNP in sham hearts. Glibenclamide reduced by half, whereas 8-PT completely blocked the protective effect of IPC on endothelium-dependent vasodilation. These results suggest that IPC affords protection to endothelial function in resistance coronary arteries of the rat partially by activation of  $K_{ATP}$  channels. Adenosine plays a major role in that protection.

## 2.2 INTRODUCTION

Short periods of ischemia, single or repetitive, render the heart more resistant to a subsequent longer ischemia. This phenomenon, called ischemic preconditioning (IPC), reduces myocardial infarct size (90;94), decreases the number and severity of reperfusion-induced arrhythmias (128;130), and improves systolic ventricular function recovery (94). The cardioprotective effect of IPC has been documented in different species, including pigs (316), dogs (90), rabbits (94), rats (222;317), and humans. (96)

Recent studies have demonstrated that the beneficial effect of IPC is not limited to the cardiomyocytes, but can be observed in endothelial cells in various experimental models including dog resistance coronary arteries *in vivo* (57), and conduit coronary arteries of the rat *in vitro* (145). Some studies have demonstrated that ischemia-reperfusion attenuated endothelial function in large coronary vessels (55;56) and in coronary microvessels (57). Little is known about the effect of IPC on endothelial function in intact rat coronary circulation, and the mechanisms involved in this endothelial protection remain unknown.

The first aim of this study was therefore to evaluate whether IPC affords protection against ischemic injury to the endothelium of coronary vessels in the isolated rat heart. The second aim was to identify the mechanisms whereby IPC provides this protection. Two mechanisms were postulated to explain this protective effect of IPC, 1) activation of adenosine receptors by adenosine released during IPC, and 2) participation of ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$  channels).

## 2.3 METHODS

### *Preparation of hearts*

The investigation was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (300-350 g) were narcotized with CO<sub>2</sub> until a complete loss of consciousness and rapidly decapitated. The thorax was rapidly opened and the heart excised and immersed in ice-cold heparinised buffer (10 IU ml<sup>-1</sup>). It was immediately mounted on the experimental setup and perfused at constant flow by means of a digital roller pump. A 20-ml compliance chamber along the perfusion line ensured a continuous flow. The flow rate was adjusted during the stabilization period to obtain a coronary perfusion pressure of approximately 75 mmHg and was held constant, with the exception of the ischemic periods during which flow was either stopped (zero-flow ischemia) or reduced to 1 ml min<sup>-1</sup> (low-flow ischemia). A second adjustment of the flow rate was made at the end of the long reperfusion period, before the perfusion of U-46619, to correct any deviation of the coronary perfusion pressure from 75 mmHg, and was held constant thereafter. Flow rate was measured throughout the experiment with an in-line ultrasonic flow probe and meter (Transonic Systems Inc., model T106). Perfusion pressure was monitored to calculate coronary resistance. The normal perfusion solution consisted of a modified Krebs-Henseleit buffer containing (in mM): NaCl 118, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 24, D-glucose 5, sodium pyruvate 2. The perfusate was gassed with 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4) and kept at a constant temperature of 37 °C. All drugs were administered through a Y connector in the aortic cannula with syringe pumps (Harvard Apparatus, model 11) at one hundredth of the coronary flow rate. Adequate mixing of the drugs was ensured by the turbulent flow created in the reverse drop shaped aortic cannula. All concentrations mentioned in the text and figures refer to the final concentration after mixing. Coronary perfusion pressure was measured with a pressure transducer connected to a side arm of the aortic

perfusion cannula. Isovolumetric left ventricular pressure and its first derivative (dP/dt) was measured by a fluid filled latex balloon inserted into the left ventricle through a pulmonary vein and connected to a second pressure transducer. The volume of the balloon was adjusted to obtain a diastolic pressure of between 5 and 10 mmHg. Heart rate was derived from the left ventricular pressure trace by a tachograph. Data were recorded on a polygraph system (Grass Model 79 polygraph).

### *Experimental protocols*

The animals were randomised into nine groups (fig 1). The hearts in all groups were subjected to a 20-min stabilisation period. Drugs or vehicle infusion was then started, followed by an additional 15-min perfusion period. The ischemic groups (I) were subjected to a 15-min sham period, followed by 30 min of partial ischemia (flow rate 1 ml/min) prior to a 20-min reperfusion period. In the preconditioned groups (IPC), the hearts were exposed to 5 min global ischemia (zero flow) plus 10 min of reperfusion before the 30-min ischemia and 20-min reperfusion periods. The sham groups were not exposed to ischemia-reperfusion, but to a time-matched normal perfusion. After these periods, coronary arteries were precontracted with 0.1 $\mu$ M U-46619 administered throughout the end of the experiment. 15 min after the beginning of U-46619 infusion, the endothelial function was evaluated by the vasodilation produced by 10 $\mu$ M serotonin (5-HT), whereas coronary smooth muscle function was evaluated with 3 $\mu$ M sodium nitroprusside (SNP). These infusions were maintained for 10 min, which was long enough to reach a steady state. A washout period of 10 min was allowed between each infusion. Vasodilation was evaluated by computing percent changes in coronary resistance (coronary perfusion pressure divided by coronary flow), measured immediately before each drug infusion, and after a new steady state. The concentrations of 5-HT and SNP were determined in preliminary dose-response experiments to produce near-maximal vasodilation.

Sham, I, and IPC hearts were treated with either 0.3 $\mu$ M glibenclamide, 5 $\mu$ M 8-phenyltheophylline (8-PT), or vehicles starting after the 20-min stabilisation period, and lasting throughout the experiments.

### *Statistical analysis*

Values represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by a two way analysis of variance with Scheffe post-hoc test. In the presence of an interaction between the different groups, one way analysis of variance were used for each group. A commercially available software (Systat for Windows) was used. Only probability values (p) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

### *Drugs*

U-46619 was a kind gift of Upjohn Canada. All others drug were obtained from Sigma. A stock solution of glibenclamide (10 mM) was prepared in 100 % dimethylsulphoxide (DMSO). This stock solution was added directly to Krebs-Henseleit buffer. U-46619 (28.5 mM) was dissolved in 100% ethanol and diluted with 0.9% NaCl solution to obtain the desired final concentration. A stock solution of 8-PT (0.5 mM) was prepared in a 10 mM NaOH solution with DMSO (2%). This stock solution was not directly added to Krebs-Henseleit buffer, but was administered through the Y connector with syringe pump at one hundredth of the flow rate. Ethanol (0.003%), DMSO (0.02%), and NaOH (0.1 mM), at the concentrations obtained in the final dilutions, had no effect on any of the hemodynamic variables studied and on the dilator responses to 5-HT and SNP. All the other drugs were dissolved in 0.9% NaCl solution.

## 2.4 RESULTS

### *Untreated groups*

Coronary resistance measured just before 0.1 $\mu$ M U-46619 perfusion (n=24) was  $5.92 \pm 0.29$  mmHg min ml<sup>-1</sup>, for a coronary flow rate of  $6.72 \pm 0.22$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $1.90 \pm 0.05$  g). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M, n=24) induced a significant (p<0.05) vasoconstriction in all untreated groups (sham, I, and IPC, Table 1). Vasodilation produced by 10 $\mu$ M 5-HT in sham hearts was  $-25.2 \pm 3.3\%$ . Ischemia significantly diminished the vasodilation by more than half (fig 2). Ischemic preconditioning prevented the deleterious effect of ischemia on endothelium-dependent vasodilation: the vasodilation produced by 5-HT in preconditioned hearts was comparable to that of sham hearts (fig 2). Endothelium-independent vasodilation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in the three untreated groups (sham, ischemic, and preconditioned, fig 3). The values of coronary flow, perfusion pressure, and coronary resistance, before and during infusion on 5-HT and SNP in all groups, are shown in Table 2.

### *Glibenclamide-treated groups*

Blockade of K<sub>ATP</sub> channels with glibenclamide (0.3 $\mu$ M) was accompanied by significant increases in coronary resistance when measured just before 0.1 $\mu$ M U-46619 perfusion (glibenclamide-treated vs untreated hearts, p<0.05) (Table 1). The perfusion rate was  $5.30 \pm 0.13$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $1.94 \pm 0.04$  g). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M, n=24) induced a significant (p<0.05) vasoconstriction in all glibenclamide-treated groups (Table 1). Vasodilation produced by 10  $\mu$ M 5-HT ( $-10.6 \pm 1.6\%$  in sham hearts, n=8) was totally abolished in the ischemic group (fig 2). Ischemic preconditioning in glibenclamide-treated hearts failed to prevent completely the deleterious effect of ischemia on 5-HT-induced vasodilation (fig 2). Vasodilation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in the three glibenclamide-treated groups (sham, ischemic, and



preconditioned, fig 3). The vasodilation produced by SNP (fig 3) and 5-HT (fig 2) in glibenclamide-treated groups were significantly smaller compared to the values in the corresponding untreated group.

#### *8-Phenyltheophylline-treated groups*

Blockade of adenosine receptors with 8-PT was accompanied by significant increases in coronary resistance when measured just before 0.1 $\mu$ M U-46619 perfusion (8-PT-treated vs untreated hearts,  $p < 0.05$ ) (Table 1). The perfusion rate was  $5.06 \pm 0.13 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (mean heart weight of  $2.02 \pm 0.04 \text{ g}$ ). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M,  $n=21$ ) induced a significant ( $p < 0.05$ ) vasoconstriction in all three groups (Table 1). Vasodilation produced by 10  $\mu$ M 5-HT ( $-10.5 \pm 1.6\%$  in sham hearts,  $n=7$ ) was practically abolished in the ischemic group (fig 2). Ischemic preconditioning in 8-PT-treated hearts was unable to prevent the deleterious effect of ischemia on 5-HT-induced vasodilation (fig 2). Vasodilation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in all 8-PT-treated groups (sham, ischemic, and preconditioned, fig 3). The vasodilation produced by SNP (fig 3) and 5-HT (fig 2) in the 8-PT treated groups were significantly different from the values in the corresponding untreated group, but were not significantly different from those in the corresponding glibenclamide-treated group.

## **2.5 DISCUSSION**

In the present study, we evaluated whether IPC, in addition to its well known protective effect on myocardial function, could also prevent endothelial cell dysfunction induced by ischemia-reperfusion injury in the coronary circulation. The contribution of adenosine and/or  $K_{ATP}$  activation in that protection was also evaluated. The major findings of this study were: 1) that IPC by a single short period of ischemia prevented endothelial dysfunction produced by ischemia-reperfusion; 2) that  $K_{ATP}$  channel activation explains partially that protection; 3) whereas adenosine is a major contributor to the beneficial role of IPC.

### *Effect of preconditioning on endothelial dysfunction*

In the present study, the vasodilation to 5-HT was used as an index of endothelial function. 5-HT has been shown to be an endothelium-dependent vasodilator in several isolated vessel preparations (318) as well as in isolated rat hearts (319). In isolated hearts, the coronary vasodilation to 5-HT is blocked after treatment with NO-synthase inhibitors (319). Thus, the vasodilatory response to 5-HT is indicative of the ability of endothelial cells to generate and release NO. Our data show that endothelium-dependent vasodilation of coronary arteries to 5-HT is drastically decreased after ischemia-reperfusion injury. However the same vessels retained the ability to dilate to SNP, an endothelium-independent vasodilator. This indicates that, under our experimental conditions, ischemia-reperfusion altered selectively the functionality of the endothelium without affecting that of smooth muscle cells. IPC prevented the reduction in the vasodilation to 5-HT, suggesting that IPC can protect endothelial function in coronary arteries against the deleterious effect of ischemia-reperfusion. A similar protective effect of IPC was observed on endothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation of epicardial coronary arteries in dogs (57), and in rat isolated left coronary arteries *in vitro* (145). In contrast, in an anesthetized open-chest canine model, IPC could not prevent the reduction in both endothelium-dependent and independent dilator responses observed after one hour coronary occlusion and 4 hours of reperfusion (320). However, it is currently unclear whether this discrepancy is species-related or due to a different severity of the ischemic insult.

### *Role of $K_{ATP}$ channels in IPC*

In the glibenclamide-treated groups, the protective effect of IPC on endothelial function was diminished by half, as reflected by the reduction of endothelium-dependent vasodilation to 5-HT in the preconditioning group, compared to the glibenclamide-treated sham group. The unaltered dilator response to SNP in all

glibenclamide-treated groups implies that the decreased vasodilation to 5-HT in glibenclamide-treated preconditioned group was not the result of a non-specific smooth muscle dysfunction, but rather a specific diminution of the protective effect of IPC on endothelium-mediated dilation. These data suggest that  $K_{ATP}$  channel activation is one of the mechanisms involved in the protection afforded by IPC against endothelial dysfunction observed with ischemia-reperfusion.

#### *Role of adenosine receptors in IPC*

In the 8-PT-treated preconditioned group, the vasodilation to 5-HT was completely abolished whereas the vasodilation to SNP was not significantly different from that observed in the sham group. These data suggest that adenosine, acting on its receptors, plays a predominant role in the endothelial protection afforded by IPC.

The protective role of IPC against endothelial dysfunction and the mechanisms whereby it produces this effect seem to share similarities with those observed in cardiomyocytes. It is widely recognised that IPC limits infarct size (90;127;133;321), reduces the risk of ischemia-reperfusion arrhythmias (128-130), improves recovery of ventricular function (131;132), reduces catabolites accumulation, and slows ischemic metabolism (127;133).  $K_{ATP}$  channels (322;323) and adenosine receptors (165;324) are mechanisms that have been proposed to explain the protective effect of IPC on these different end-points. The contribution of adenosine or  $K_{ATP}$  channels can differ depending of the animal species or the end-points used. For example, there is evidence in the dog, rabbit, and pig, but not in the rat, to support the hypothesis that  $K_{ATP}$  channel activation may contribute to the beneficial effect of IPC on infarct size (322).

The intracellular mechanisms by which IPC protects the myocardium or the coronary endothelium from the ischemic damage are not completely understood, but some hypothesis have been proposed. In the myocardium, activation of  $K_{ATP}$

channels possibly inhibits ischemic depolarisation, which could reduce  $\text{Ca}^{2+}$  entry via voltage-gated channels, resulting in a reduction in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels and decreased myocardial contractility (323). Furthermore, recent studies have shown the presence of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels in mitochondrial membranes. The role of these channels remains unknown, but it may maintain membrane polarity or even control mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (323). This control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration via  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels activation can prevent mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload, a key factor in myocardial ischemic damage. Some evidences indicate that activation of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels during ischemia can also preserve the myocardial energy status (325;326). Although the presence of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels in the endothelium of rat coronary arteries has not been directly demonstrated, patch clamp studies have shown of the presence of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels on rat aorta and brain microvascular endothelial cells (327). In endothelial cells, activation of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels also produces hyperpolarisation. Because endothelial cells lack voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, hyperpolarisation will have an unusual effect on  $\text{Ca}^{2+}$  influx in these cells: it will increase the electrochemical gradient and facilitate  $\text{Ca}^{2+}$  entry (327;328), which will enhance nitric oxide release from endothelial cells (329). The contribution of nitric oxide in the protection of the endothelium afforded by IPC remains unknown.

Adenosine has often been reported to be a mediator of protection against ischemia afforded by IPC (165;324). Adenosine, released from ischemic tissues and acting on its  $\text{A}_1$  receptors, can activate  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels via a G protein (297) and produce effects similar to those described for  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. A recent study has reported adenosine  $\text{A}_2$  receptors on guinea pig coronary endothelial cells (330). However, cyclic AMP production was used to rank the different agonists: since  $\text{A}_1$  receptors may be coupled to effectors different from adenylate cyclase, the presence of  $\text{A}_1$  receptors might have been overlooked. Recently, Liu et al. (165) have reported that adenosine acting through  $\text{A}_3$  receptors may mediate the protection afforded by preconditioning. The physiological role of the  $\text{A}_3$  receptor is still poorly characterised, but has recently been implicated as an activator of mast cells (331).

According to this hypothesis, mast cells would release mediators (histamine, leukotrienes, free radicals, thromboxanes, cytokines) during the preconditioning period (transient ischemia), producing little or no damage to myocytes, being washed away too rapidly. During the subsequent prolonged ischemic insult, depleted mast cells could no longer release these deleterious mediators, resulting in a reduced damage (332). It remains to be established whether these mechanisms can also explain the protective effect of IPC on endothelial function.

It has been reported that IPC attenuates reperfusion-induced myocardial edema (333). This reduction in myocardial edema could presumably improve coronary perfusion through a reduction in external compression of coronary microvessels. However, in the present study, vasodilation to SNP was unaffected by ischemia-reperfusion, suggesting that myocardial edema under our conditions was not severe enough to affect vasodilator function. On the other hand, we cannot rule out the possibility that IPC attenuates edema of endothelial cells, which could improve endothelial-dependent vasodilation.

Treatment with either glibenclamide or 8-PT reduced the vasodilation produced by 5-HT and SNP, compared to the untreated groups. This effect is probably due to the increase in coronary resistance observed in all treated hearts. It is important to note that for each treatment, coronary resistance measured before infusion of vasodilators in sham, ischemic, and preconditioned hearts, was comparable.

In conclusions, these data suggest that ischemic preconditioning affords protection to endothelial function against subsequent ischemic injury in the intact coronary circulation of the rat. The reduced protective effect of ischemic preconditioning in presence of glibenclamide suggests that this protection may be mediated partially by  $K_{ATP}$  channel activation. The complete inhibitory action of 8-PT on ischemic preconditioning suggests that adenosine may play a major role in the protection of the endothelial function.

**Tableau II.1:** Effect of U-46619 0.1 $\mu$ M infusion on coronary resistance (R, mmHg min ml<sup>-1</sup>)

	Before U-46619	After U-46619
Untreated (n=8 per group)		
Sham	5.87 $\pm$ 0.35	10.10 $\pm$ 0.82 *
Ischemia	5.96 $\pm$ 0.82	11.53 $\pm$ 0.75 *
PC + Ischemia	5.94 $\pm$ 0.31	11.58 $\pm$ 0.55 *
With GLI (n=8 per group) <sup>a</sup>		
Sham	10.00 $\pm$ 0.50	13.86 $\pm$ 0.62 *
Ischemia	8.15 $\pm$ 0.69	12.84 $\pm$ 0.95 *
PC + Ischemia	8.52 $\pm$ 0.68	14.16 $\pm$ 0.68 *
With 8-PT (n=7 per group) <sup>a</sup>		
Sham	12.79 $\pm$ 1.50	16.21 $\pm$ 1.25 *
Ischemia	9.64 $\pm$ 0.46	14.32 $\pm$ 0.70 *
PC + Ischemia	8.59 $\pm$ 0.66	13.37 $\pm$ 0.96 *

The values are means  $\pm$  SEM

PC=preconditioning

R=coronary perfusion pressure(mmHg)/ coronary perfusion flow (ml min<sup>-1</sup>)

<sup>a</sup> p<0.05 compared to the corresponding control value

\* p<0.05 compared to the corresponding "before U-46619" value

**Tableau II.II:** Effect of 5-HT 10 $\mu$ M and SNP 3 $\mu$ M on perfusion pressure (mmHg), and on coronary resistance (R, mmHg min ml<sup>-1</sup>)

	Perfusion pressure (mmHg)			Coronary resistance (mmHg min ml <sup>-1</sup> )					
	Coronary flow	Before 5-HT	After 5-HT	Before SNP	After SNP	Before 5-HT	After 5-HT	Before SNP	After SNP
<b>Untreated (n=8 per group)</b>									
Sham	6.64±0.41	129.22±4.81	96.88±6.03*	126.25±7.23	90.00±7.63*	10.09±0.85	7.64±0.90*	9.92±1.02	6.97±0.69*
Ischemia	6.17±0.38	143.13±4.11	128.44±7.30*	153.59±5.79	112.97±5.06*	11.58±0.73	10.55±1.09	12.45±0.91	9.15±0.69*
PC + Isch.	7.36±0.23	140.16±3.03	97.34±4.56*	146.88±4.28	111.25±2.95*	11.72±0.57	8.08±0.41*	12.29±0.66	9.28±0.40*
<b>With Gli (n=8 per group)</b>									
Sham	5.06±0.21 <sup>a</sup>	139.06±8.69	125.00±9.39*	142.81±9.05	120.94±9.07*	13.91±0.87 <sup>a</sup>	12.50±0.94 <sup>a</sup>	14.28±0.91 <sup>a</sup>	12.09±0.91*
Ischemia	5.24±0.20	129.56±7.02	130.63±7.02	143.78±6.74	116.88±5.42*	12.55±0.79	12.66±0.81 <sup>a</sup>	13.94±0.83	11.33±0.65*
PC + Isch.	5.70±0.24 <sup>a</sup>	150.47±6.07	144.38±7.55 <sup>a</sup>	154.84±6.20	131.41±5.76*	14.54±0.60 <sup>a</sup>	13.96±0.76 <sup>a</sup>	14.97±0.63	12.72±0.64*
<b>With 8-PT (n=7 per group)</b>									
Sham	5.04±0.22 <sup>a</sup>	165.49±11.78 <sup>a</sup>	148.00±9.33 <sup>a</sup> *	172.86±10.38 <sup>a</sup>	152.68±9.13 <sup>a</sup> *	16.59±1.18 <sup>a</sup>	14.80±0.93 <sup>a</sup> *	17.29±1.04 <sup>a</sup>	15.27±0.97 <sup>a</sup> *
Ischemia	4.84±0.16 <sup>a</sup>	145.89±7.25	142.86±5.47	159.82±8.50	143.21±8.24 <sup>a</sup> *	14.59±0.72 <sup>a</sup>	14.29±0.55 <sup>a</sup>	15.98±0.85 <sup>a</sup>	14.32±0.82 <sup>a</sup> *
PC + Isch.	5.31±0.27 <sup>a</sup>	143.57±7.99	145.36±9.58 <sup>a</sup>	162.50±12.90	141.07±11.07 <sup>a</sup> *	13.90±1.02	14.11±1.20 <sup>a</sup>	15.79±1.53	13.73±1.38 <sup>a</sup> *

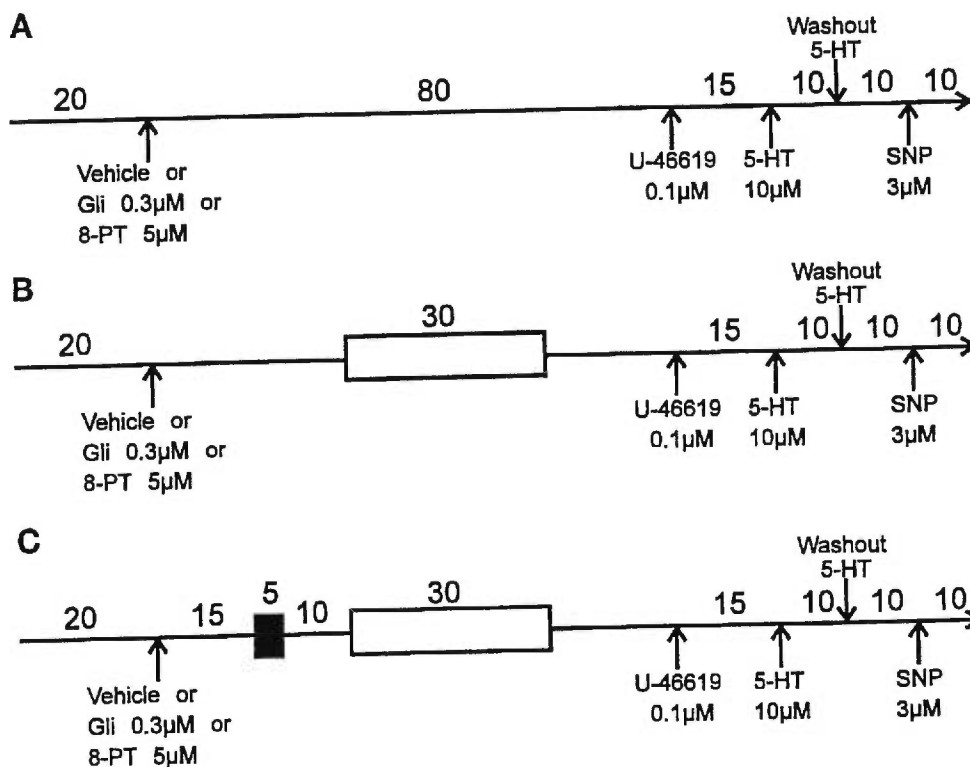
The values are means ± SEM

PC=preconditioning, Isch.= ischemia

R=coronary perfusion pressure (mmHg)/ coronary flow (ml min<sup>-1</sup>)

<sup>a</sup> p< 0.05 compared to the corresponding untreated value

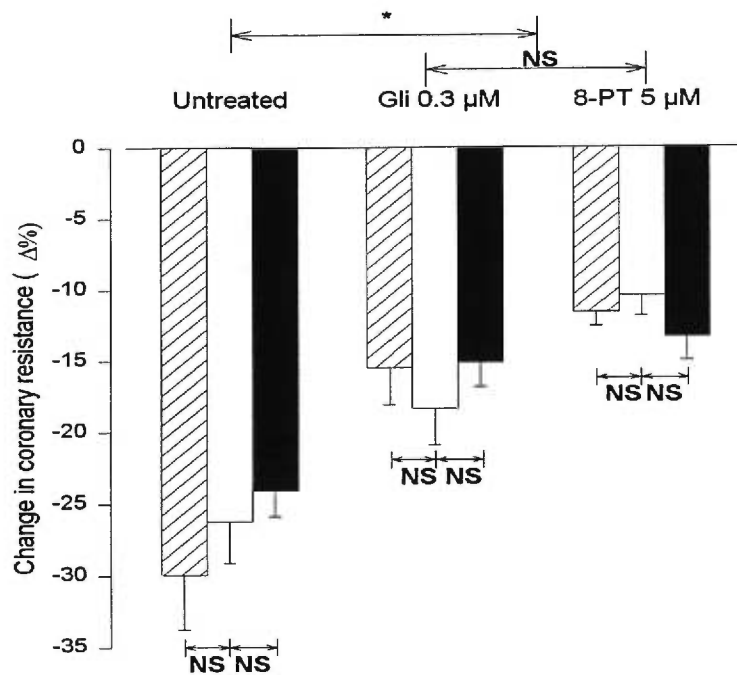
\* p< 0.05 compared to the corresponding "before 5-HT or SNP" value



**Figure 2.1:** Diagram showing the different experimental protocols. Each experiment started with a 20-min stabilisation period, followed by infusion of either glibenclamide (Gli, 0.3 $\mu$ M), 8-phenyltheophylline (8-PT, 5 $\mu$ M), or vehicle. Hearts in the ischemia protocol underwent 30 min of low-flow (1 ml/min) ischemia and 20 min of reperfusion, after an additional 30-min stabilisation period. Hearts in the ischemia + preconditioning protocol were submitted to a preconditioning 5 min zero-flow ischemia and 10 min reperfusion, before the 30-min low-flow ischemia. For each group, endothelial and smooth muscle function was tested after the 20-min reperfusion period. Hearts in the sham protocol were used as time-matched controls. Coronary arteries were precontracted by a continuous infusion of 0.1 $\mu$ M U-46619. After 15 min, infusion of 5-HT (10 $\mu$ M) was started for 10 min. A wash-out period of 10 min was allowed between 5-HT and SNP (3 $\mu$ M, 10 min) infusions. The numbers above the bars represent the time in minutes.







**Figure 2.3:** Change in coronary resistance produced by  $3\mu\text{M}$  sodium nitroprusside in untreated hearts and in hearts treated with either  $0.3\mu\text{M}$  glibenclamide (Gli) or  $5\mu\text{M}$  8-phenyltheophylline (8-PT). Hatched, open, and closed columns represent sham, ischemic, and preconditioning plus ischemic hearts, respectively.  $*p<0.05$ . NS=non-significant.  $n=8$  per column.

CHAPITRE TROIS : PROTECTION AFFORDES BY PRECONDITIONING TO THE DIABETIC  
HEART AGAINST ISCHAEMIC

### 3.1 ABSTRACT

**Objective :** The aim of this study was to assess whether the cardioprotective effect of ischaemic preconditioning (IPC) on endothelial function in coronary arteries and myocardial function is affected in the streptozotocin-induced diabetic rat heart. **Methods :** Isolated hearts, perfused under constant flow conditions, were exposed to 30 min of partial ischaemia (flow rate  $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) followed by 20 min of reperfusion. **Results :** In the diabetic group (without ischaemia or IPC), infusion of  $10 \mu\text{M}$  serotonin (5-HT), an endothelium-dependent, and  $3 \mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP), an endothelium-independent vasodilator, in the coronary bed precontracted with  $0.1 \mu\text{M}$  U-46619 induced a marked vasodilation. Ischaemia, either without or with preconditioning with a single 5-min ischaemia and 10-min reperfusion (IPC1) before ischaemia, was accompanied by a reduced 5-HT-induced vasodilation in diabetic hearts. In contrast, IPC1 preserved the response to 5-HT in non-diabetic hearts. A more extensive IPC with 3 periods of 5-min ischaemia followed by 5-min reperfusion (IPC3) preserved the vasodilation produced by 5-HT in both diabetic and non-diabetic hearts. IPC3 increased the recovery of  $dP/dt_{\text{max}}$  and  $dP/dt_{\text{min}}$  during the 30-min ischaemic period and during reperfusion in all hearts. In contrast, IPC1 had no effect on myocardial recovery in either groups. Adenosine pre-treatment started 30 min before ischaemia mimicked IPC3, preserving the vasodilation to 5-HT and improving myocardium recovery in both groups. When adenosine was started 15 min before ischaemia, vasodilation to 5-HT was preserved in non-diabetic hearts only. **Conclusions :** These results suggest that IPC affords protection of endothelial function in resistance coronary arteries of diabetic hearts. To achieve this protection, a more extensive IPC is needed, which may be related to a longer exposure to adenosine.

### 3.2 INTRODUCTION

Single or repetitive short periods of ischaemia followed by intermittent reperfusion, render the heart more resistant to a subsequent longer ischaemic period. This phenomenon, called ischaemic preconditioning (IPC), limits infarct size (90;127;321), reduces the risk of ischaemia-reperfusion arrhythmias (128-130), improves recovery of ventricular function (131;132), reduces catabolites accumulation, and slows ischaemic metabolism (127). This cardioprotective effect has been observed in different species, including rats (222;317), rabbits (94), dogs (90), pigs (316), and humans (96).

Some studies have demonstrated that ischaemia-reperfusion attenuated endothelial function in large coronary vessels (55;56) and in coronary microvessels (57). Some groups have demonstrated that the beneficial effect of IPC is not limited to the cardiomyocytes, but can be observed in endothelial cells in various experimental models including dog resistance coronary arteries *in vivo* (57), and coronary arteries of the rat *in vitro* (145;334). Adenosine has often been reported to be a mediator of the protection afforded by IPC (165;324). For example, we have recently demonstrated that blockade of adenosine-receptors with 8-phenyltheophylline can prevent the protection of the endothelial function afforded by IPC in the non-diabetic rat coronary bed (334).

An early study reported that IPC can reduce infarct size in a non-insulin-dependent diabetic rat model *in vivo* (152). On the other hand, IPC failed to reduce the incidence of ventricular arrhythmias and to improve cardiac function in diabetic rat hearts (307;308). However, to the best of our knowledge, little is known about the effect of IPC on endothelial function in diabetic hearts, and whether exogenous adenosine perfusion can mimic the effects of IPC in this pathological model. Since diabetes has been associated with endothelial (309;310) and myocardial dysfunction (311;312), as well as an altered sensitivity to ischaemic injury (313;314), these unanswered questions are highly relevant.

Therefore, the first aim of the present study was to evaluate whether IPC affords protection against ischaemic injury to the endothelium of coronary vessels and to contractile function in isolated diabetic rat hearts. The second aim was to verify whether exogenous adenosine perfusion can mimic the beneficial effects of IPC against ischaemic injury in these hearts.

### 3.3 METHODS

#### *Preparation of hearts*

The investigation was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats weighing 200-225g were rendered diabetic or treated as vehicle control by injection into the tail vein of streptozotocin ( $55\text{mg kg}^{-1}$ ) or vehicle (0.1N citrate buffer, pH 4.5), respectively, under light anaesthesia (methoxyflurane). Animals were allowed free access to food and water at all times. After two months, diabetic rats and age-matched controls were narcotised with  $\text{CO}_2$  until a complete loss of consciousness and promptly decapitated. The thorax was rapidly opened and the heart excised and immersed in ice-cold heparinised buffer ( $10\text{ IU ml}^{-1}$ ). It was immediately mounted on the experimental setup and perfused within 1 min after decapitation at constant flow by means of a digital roller pump. A 20-ml compliance chamber along the perfusion line ensured a continuous flow. The flow rate was adjusted during the stabilisation period to obtain a coronary perfusion pressure of approximately 75 mmHg and was held constant, with the exception of the ischaemic periods during which flow was either stopped (zero-flow ischaemia) or reduced to  $1\text{ ml min}^{-1}$  (low-flow ischaemia). A second adjustment of the flow rate was made at the end of the long reperfusion period, before the perfusion of U-46619, to correct any deviation of the coronary perfusion pressure from 75 mmHg, and was held constant thereafter. Flow rate was measured during all the experiment with an in-line ultrasonic flow probe and meter (Transonic Systems

Inc., model T106). Perfusion pressure was monitored to calculate coronary resistance. The normal perfusion solution consisted of a modified Krebs-Henseleit buffer containing (in mM): NaCl 118, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 24, D-glucose 5, pyruvate 2. The perfusate was gassed with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4) and kept at a constant temperature of 37<sup>o</sup> C. All drugs were administered through a Y connector in the aortic cannula with syringe pumps (Harvard Apparatus, model 11) at one hundredth of the coronary flow rate. Adequate mixing of the drugs was ensured by the turbulent flow created in the reverse drop shaped aortic cannula. All concentrations mentioned in the text and figures refer to the final concentration after mixing. Coronary perfusion pressure was measured with a pressure transducer connected to a side arm of the aortic perfusion cannula. Isovolumetric left ventricular pressure and its first derivative (dP/dt) was measured by a fluid filled latex balloon inserted into the left ventricle and connected to a second pressure transducer. The volume of the balloon was adjusted to obtain a diastolic pressure between 5 and 10 mmHg. Heart rate was derived from the left ventricular pressure trace by a tachograph. Data were recorded on a polygraph system (Grass Model 79 polygraph). Body weight and blood glucose levels (One Touch II glucometer, Lifescan) were measured at the time of decapitation.

#### *Experimental protocols*

The animals were randomised into twelve groups (fig 1). The hearts in all groups were subjected to a 20-min stabilisation period. Ischaemic groups were subjected to a 15-min sham period, followed by 30 min of partial ischaemia (flow rate 1 ml min<sup>-1</sup>) prior to a 20-min reperfusion period. In the preconditioned groups (IPC), the hearts were exposed to 5 min global ischaemia (zero flow) plus 10 min of reperfusion (IPC1) or 5 min global ischaemia plus 5 min of reperfusion repeated three times (IPC3) before the 30-min ischaemia and 20-min reperfusion periods. The sham groups were not exposed to ischaemia-reperfusion at all, but to a time-matched normal perfusion. After these periods, coronary arteries were

precontracted with 0.1 $\mu$ M U-46619 administered throughout the end of the experiment. Fifteen min after the beginning of U-46619 infusion, the endothelial function was evaluated with the vasodilation produced by 10 $\mu$ M serotonin (5-HT), whereas coronary smooth muscle function was evaluated using 3 $\mu$ M sodium nitroprusside (SNP). These infusions were maintained for 10 min, which was long enough to reach a steady state. A washout period of 10 min was allowed between each infusion. Vasodilation was quantified by computing percent changes in coronary resistance (coronary perfusion pressure divided by coronary flow), measured immediately before each drug infusion, and after a new steady state. The concentrations of 5-HT and SNP were determined in preliminary dose-response experiments to produce near-maximal vasodilation.

In additional experimental series, the effect of an adenosine perfusion was compared with that of IPC. In these groups, hearts were treated with either 3 $\mu$ M adenosine or vehicle starting after either a 20-min or a 35-min stabilisation period, in order to expose the hearts to either 30 or 15 min adenosine perfusion before ischaemia. The adenosine perfusion lasted throughout the ischaemic period.

#### *Statistical analysis*

Values represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by a two way analysis of variance with Scheffe post-hoc test. In the presence of an interaction between the different groups, one way analysis of variance were used for each group. A commercially available software (Systat for Windows, version 6.1) was used. Only probability values (p) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

#### *Drugs*

All drugs were obtained from Sigma (St-Louis, MA). A 28.5 mM stock solution of U-46619 (9,11-dideoxy-11,9-epoxymethano-prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> ) was dissolved

in 100% ethanol and diluted with 0.9% NaCl solution to obtain the desired final concentration. Ethanol at the concentration obtained in the final dilution (0.003%), had no effect on any of the hemodynamic variables studied and on the dilator responses to 5-HT and SNP. All the other drugs were dissolved in Krebs-Henseleit buffer.

### 3.4 RESULTS

A total of 42 non-diabetic rats and 43 diabetic rats have been used in the present study. Body weight of rats treated with streptozotocin or vehicle two months after injection was  $365.3 \pm 10.1$  and  $558.9 \pm 13.7$  g, respectively,  $p < 0.05$ . Blood glucose level of these animals was  $21.4 \pm 0.47$  and  $4.5 \pm 0.12$  mmol L<sup>-1</sup> respectively,  $p < 0.05$ .

#### *IPC GROUPS*

##### *Vascular function*

Coronary resistance of non-diabetic hearts measured just before 0.1 μM U-46619 perfusion (n=30) was  $5.92 \pm 0.29$  mmHg min ml<sup>-1</sup>, for a coronary flow rate of  $6.72 \pm 0.22$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $1.90 \pm 0.05$  g). In diabetic hearts (n=29), coronary resistance measured before 0.1 μM U-46619 perfusion was  $4.99 \pm 0.32$  mmHg min ml<sup>-1</sup>, for a coronary flow rate of  $7.38 \pm 0.36$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $2.04 \pm 0.06$ g). Infusion of U-46619 (0.1 μM, n=59) induced a significant ( $p < 0.05$ ) vasoconstriction in all groups of hearts (sham, Ischaemia, IPC1, and IPC3, Table 1). Vasodilation produced by 10 μM 5-HT in sham hearts from diabetic rats ( $-25.2 \pm 4.8$  %) was comparable to that of age-matched control rats ( $-25.2 \pm 3.3$  %). Thirty min of partial ischaemia significantly diminished the 5-HT-induced vasodilation by more than half in hearts from non-diabetic and diabetic rats (fig 2). One period of IPC in non-diabetic hearts prevented the deleterious effect of ischaemia on endothelium-dependent vasodilation: the



vasodilation produced by 5-HT in preconditioned hearts was comparable to that observed in hearts not exposed to ischaemia (fig 2). In diabetic hearts, one period of IPC was insufficient to preserve the endothelial function. However, three periods of IPC prevented the deleterious effect of ischaemia on endothelium-dependent vasodilation in diabetic as well as in non-diabetic hearts (fig 2). Endothelium-independent vasodilation to 3 $\mu$ M SNP was not affected by ischaemia and was found to be comparable in the four groups of hearts (sham, ischaemia, IPC1, and IPC3) from diabetic and non-diabetic rats (fig 2).

### *Myocardial function*

The inotropic and lusitropic characteristics of diabetic hearts were comparable to that of non-diabetic hearts:  $dP/dt_{max}$  values measured before the 30-min partial ischaemia were  $2405 \pm 161$  and  $2307 \pm 117$  mmHg  $s^{-1}$ , and the  $dP/dt_{min}$  values  $1695 \pm 94$  and  $1702 \pm 101$  mmHg  $s^{-1}$ , for diabetic hearts and age-matched controls, respectively. Partial ischaemia was accompanied by a severe reduction in  $dP/dt_{max}$  (fig 3) in both diabetic and non-diabetic hearts. IPC3 improved  $dP/dt_{max}$  (fig 3) recovery during ischaemia, particularly during the last 20 min of ischaemia. Reperfusion after partial ischaemia was accompanied by a complete recovery of  $dP/dt_{max}$  after 20 min in non-diabetic hearts, whereas diabetic hearts recovered to 80 % of the pre-ischaemic level. IPC3 improved the post-ischaemic recovery of  $dP/dt_{max}$  (fig 3) in diabetic and control rats. In all hearts studied, IPC1 was insufficient to improve ischaemic and post-ischaemic recovery of  $dP/dt_{max}$  (fig 3). The effect of ischaemia and reperfusion, with or without preconditioning, on  $dP/dt_{min}$  in both diabetic and non-diabetic hearts was superimposed with that on  $dP/dt_{max}$  (data not shown).

## ADENOSINE GROUPS

### *Vascular function*

Adenosine perfusion (3 $\mu$ M) was accompanied by a significant decrease in coronary resistance when measured just before the 30-min ischaemic period (-30.5  $\pm$  2.5 % in non-diabetic hearts (n=12) and -28.1  $\pm$  3.2 % in diabetic hearts,  $p < 0.05$ , n=14). The perfusion rate in non-diabetic hearts was 6.2  $\pm$  0.3 ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of 2.31  $\pm$  0.09 g). In diabetic hearts, the perfusion rate was 7.29  $\pm$  0.39 ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of 2.14  $\pm$  0.09 g). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M, n=26) induced a significant ( $p < 0.05$ ) vasoconstriction in all adenosine-treated hearts (Table 1). Treatment with adenosine, starting either 15 min (n=6) or 30 min (n=8) before ischaemia, preserved the vasodilation produced by 10 $\mu$ M 5-HT in non-diabetic hearts (fig 4). In contrast, only the 30-min pre-treatment with adenosine (n=7) preserved the vasodilation produced by 10 $\mu$ M 5-HT in diabetic hearts (fig 4). Vasodilation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in all adenosine-treated hearts (fig 4).

### *Myocardial function*

The dP/dt<sub>max</sub> values measured before the 30-min partial ischaemia were 2257  $\pm$  104 and 2000  $\pm$  64 mmHg s<sup>-1</sup>, and the dP/dt<sub>min</sub> values 1574  $\pm$  83 and 1392  $\pm$  60 mmHg s<sup>-1</sup>, for diabetic hearts and age-matched controls, respectively. In the control hearts, pre-treatment with adenosine, either 15 or 30-min before ischaemia, had no effect on ischaemic or post-ischaemic recovery of dP/dt<sub>max</sub> (fig 5). In diabetic hearts, the 60-min pre-treatment with adenosine improved dP/dt<sub>max</sub> recovery during ischaemia, the 45-min pre-treatment having no effect. In contrast, both 45-min and 60-min pre-treatment improved post-ischaemic recovery of dP/dt<sub>max</sub> (fig 5) upon reperfusion in diabetic rats. The effect of ischaemia and reperfusion, with or without adenosine pre-treatment, on dP/dt<sub>min</sub> in

both diabetic and non-diabetic hearts was superimposed with that on  $dP/dt_{\max}$  (data not shown).

### 3.5 DISCUSSION

In the present study, we have evaluated whether IPC can exert a protective effect on myocardial function, and prevent endothelial cell dysfunction induced by ischaemia-reperfusion injury in the coronary circulation of diabetic and non-diabetic rats. The effect of exogenous adenosine perfusion was also evaluated. The major findings of this study are 1) that IPC with a single short period of ischaemia prevents endothelial dysfunction produced by ischaemia-reperfusion in non-diabetic hearts, whereas three periods are necessary in diabetic hearts, 2) IPC with 3 periods of ischaemia can improve the recovery of myocardial function after ischaemia in both groups, 3) adenosine perfusion starting 15 min before ischaemia can mimic the beneficial effect of IPC on endothelial function in non-diabetic coronary arteries, whereas a longer adenosine perfusion (30 min) is obligatory for endothelial protection in diabetic hearts. Finally, the longer adenosine perfusion can also improve the recovery of contractile function after ischaemia in diabetic hearts.

The buffer-perfused, flow-controlled isolated heart was selected for the present study. This model allowed highly reproducible ischaemia and controlled reperfusion, without any damage to the vessels by clamping or ligature procedures. However, oxygen transport by a buffer solution is less than that of blood, and a higher flow rate must be used to obtain a perfusion pressure within the physiological range. Since ischaemia-reperfusion can alter the coronary dilatory reserve (Bouchard and Lamontagne, unpublished observation), precontraction of coronary arteries with U-46619 allowed a more reliable assessment of endothelium-dependent and independent responses. Finally, all groups were time-matched to minimize the effect of time on our preparations.

*Effect of preconditioning on endothelial dysfunction*

In the present study, the vasodilation to 5-HT was used as an index of endothelial function. 5-HT has been shown to be an endothelium-dependent vasodilator in several isolated vessel preparations (318) as well as in isolated rat hearts (319). In isolated hearts, the coronary vasodilation to 5-HT is blocked after treatment with NO-synthase inhibitors (319). Thus, the vasodilatory response to 5-HT is indicative of the ability of endothelial cells to generate and release NO. The coronary vasodilation to 5-HT was not altered in diabetic rats. This is in contrast with several studies reporting impairment of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic animals, including rabbits and rats (335;336). However, other reports have shown no change in endothelium-dependent relaxation in diabetic animals (337;338). This controversy may be explained by several variables like the animal species, the vascular bed studied, or the duration and severity of the pathology.

Our data show that endothelium-dependent vasodilation of coronary arteries to 5-HT is drastically decreased after ischaemia-reperfusion injury. However the same vessels retained the ability to dilate to SNP, an endothelium-independent vasodilator. This indicates that, under the present conditions, ischaemia-reperfusion altered selectively the functionality of the endothelium without affecting that of smooth muscle cells. IPC1 in non-diabetic hearts only, and IPC3 in all hearts, prevented the reduction in the vasodilation to 5-HT, suggesting that IPC can protect endothelial function in coronary arteries against the deleterious effect of ischaemia-reperfusion. A similar protective effect of IPC on endothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation was observed in epicardial coronary arteries of normal dogs (57), and in left coronary arteries *in vitro* isolated from non-diabetic rats (145). In contrast, in an anaesthetized open-chest canine model, IPC could not prevent the reduction in both endothelium-dependent and independent dilator responses observed after one hour coronary occlusion and 4 hours of reperfusion (320). However, it is currently unclear

whether this discrepancy is species-related or due to a different severity of the ischaemic insult.

#### *Effect of preconditioning on myocardial recovery*

In our study,  $dP/dt_{\max}$  and  $dP/dt_{\min}$ , which represent the capacity of the ventricle to contract during systole and its ability to relax during diastole, were used to evaluate the contractile function of the hearts. The results of the present study as well as others (130;131) showed that IPC enhances functional recovery in isolated non-diabetic rat hearts. However, some reported no protective effect of IPC against myocardial dysfunction in isolated rat hearts (339). Interestingly, recent studies have shown that aging hearts (154;155) as well as hearts from hypercholesterolaemic (340) and diabetic animals (307;308) do not benefit from IPC. In the present study however, an improved post-ischaemic ventricular recovery with IPC was observed in the diabetic rat model.

#### *Protective effect of exogenous adenosine*

Adenosine has often been reported to be the endogenous mediator of the protection afforded by IPC (165;324). We have recently reported that the adenosine-receptor antagonist, 8-phenyltheophylline, prevents the protective effect of IPC on the endothelial function in the isolated rat heart (334). Therefore, we tested whether a reduced sensitivity to the cardioprotective effect of adenosine in diabetic hearts could explain the more extensive IPC required in these hearts. Two pre-treatment regimens with exogenous adenosine were compared: adenosine perfusion started either 15 min before ischaemia, being temporally equivalent to IPC1 with 5 min ischaemia and 10 min reperfusion, or 30 min before ischaemia, corresponding to IPC3 with 3 cycles of 5-min ischaemia and 5-min reperfusion. In accordance, a longer pre-treatment with adenosine was required in diabetic hearts (60 vs 45 min) in order to prevent the ischaemia-induced reduction in the vasodilation to 5-HT. This difference is probably

underestimated since we have recently observed that, in non-diabetic hearts, a 5-min treatment with 3  $\mu$ M adenosine performed 10 min before ischaemia is sufficient to preserve the vasodilation to 5-HT ( $-28 \pm 1$  % vs  $-25 \pm 4$  % for ischaemic and sham hearts, respectively,  $n=4$  per group). Thus, these data suggest that exogenous adenosine can mimic the protective effect of IPC on the endothelial function. In addition, the longer exposure to adenosine needed in diabetic hearts in order to observe a protective effect may explain the more extensive IPC required.

In contrast to the endothelial function, both the 45-min and 60-min adenosine pre-treatments were effective in improving the post-ischaemic recovery of  $dP/dt_{max}$  and  $dP/dt_{min}$  in diabetic hearts. However, adenosine could not significantly improve functional recovery in non-diabetic hearts. This is probably due to the fact that non-diabetic hearts recovered completely within the 20-min reperfusion, whereas functional recovery of diabetic hearts was blunted compared with control hearts. Therefore, the beneficial effect of adenosine will be more important in hearts with depressed ventricular function.

The mechanisms by which adenosine can exert a cardioprotective effect are numerous. Adenosine, released from ischaemic tissues and acting on  $A_1$  receptors, can activate  $K_{ATP}$  channels via a G protein (297) and produce effects similar to those described for  $K_{ATP}$  channels. In the myocardium, activation of  $K_{ATP}$  channels possibly inhibits ischaemic depolarisation, which could reduce  $Ca^{2+}$  entry via voltage-gated channels, resulting in a reduction in intracellular  $Ca^{2+}$  levels and decreased myocardial contractility (323). Furthermore, recent studies have shown the presence of  $K_{ATP}$  channels in mitochondrial membranes. The role of these channels remains unknown, but it may maintain membrane polarity or even control mitochondrial  $Ca^{2+}$  concentration (323). This control of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration via  $K_{ATP}$  channel activation can prevent mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload, a key player in myocardial ischaemic damage. Some evidences indicate that activation of  $K_{ATP}$  channels during ischaemia can also preserve the

myocardial energy status (325;326). Activation of PKC seems to be another major event in the cardioprotective effect of IPC in the rat heart (260;271). Partial inhibition of PKC can provide additional protection, whereas complete inhibition blocks the protective effect of IPC (341). Interestingly, adenosine and PKC can act in synergism to activate  $K_{ATP}$  channels in rabbit ventricular myocytes (302). Liu et al. (165) have reported that adenosine acting through  $A_3$  receptors can be a mediator of the ischaemic preconditioning. The physiological role of  $A_3$  receptors is still poorly characterised, but they have recently been implicated as activators of mast cells (331). According to this hypothesis, mast cells would release mediators (histamine, leukotrienes, free radicals, thromboxanes, cytokines) during the preconditioning period (transient ischaemia) or during exogenous adenosine perfusion, producing little or no damage to myocytes, being washed away rapidly. During the subsequent prolonged ischaemic insult, depleted mast cells could no longer release these deleterious mediators, resulting in a reduced myocardial or vascular damage (332). It remains to be established whether these mechanisms can also explain the protective effect of IPC or exogenous adenosine perfusion on endothelial and myocardial functions.

There is a strong controversy whether the diabetic heart is more (313) or less (314) sensitive to ischaemic injury. In the present study, no marker of ischaemic injury such as CK release was measured. Therefore, the severity of the ischaemic injury in diabetic and normal hearts cannot be compared. However, post-ischaemic ventricular recovery was blunted in diabetic hearts. On the other hand, diabetic hearts needed more IPC periods and longer adenosine perfusion, compared with non-diabetic hearts, to achieve the same level of protection to the endothelial function. Although the exact mechanism of this difference remains unknown, several hypotheses can be suggested. First, the signalling pathways activated by endogenous or exogenous adenosine may be affected in diabetic coronary vessels. Since PKC and  $K_{ATP}$  channels are involved in the cardioprotective effect of IPC and adenosine, it is possible that an alteration of

these mechanisms could explain the reduced sensitivity to the cardioprotective effect of IPC and adenosine observed in diabetic hearts. On the one hand, an attenuated PKC is unlikely, since many studies have reported an increased PKC activity along with higher diacylglycerol levels in vascular tissues of diabetic animals (342;343). Furthermore, dose-response curves to the PKC activator, phorbol 12-myristate 13-acetate, performed in diabetic hearts were found to be comparable with that of age-matched controls (Bouchard and Lamontagne, unpublished observation). On the other hand, reduced vascular responses to  $K_{ATP}$  channel activators in diabetes mellitus have been reported (344;345). We have also observed a reduced coronary dilation with lemakalim in diabetic hearts (Bouchard and Lamontagne, unpublished observation). However, we cannot rule out that IPC in diabetic hearts involves activation of other pathways than those described for non-diabetic hearts.

These findings may have clinical implications. For example, during angioplasty or transplantation procedures, diabetic patients may need more ischaemic periods or a longer adenosine perfusion in order to achieve the same level of cardioprotection. However, it is certainly premature to extrapolate these findings to human beings and further experiments will be necessary.

In conclusion, these data suggest that ischaemic preconditioning or exogenous adenosine perfusion can afford protection to myocardial and endothelial function against subsequent ischaemic injury in diabetic hearts. However, to achieve the same degree of endothelial protection, preconditioning must be more extensive and adenosine perfusion period be longer in diabetic hearts, compared with non-diabetic hearts.



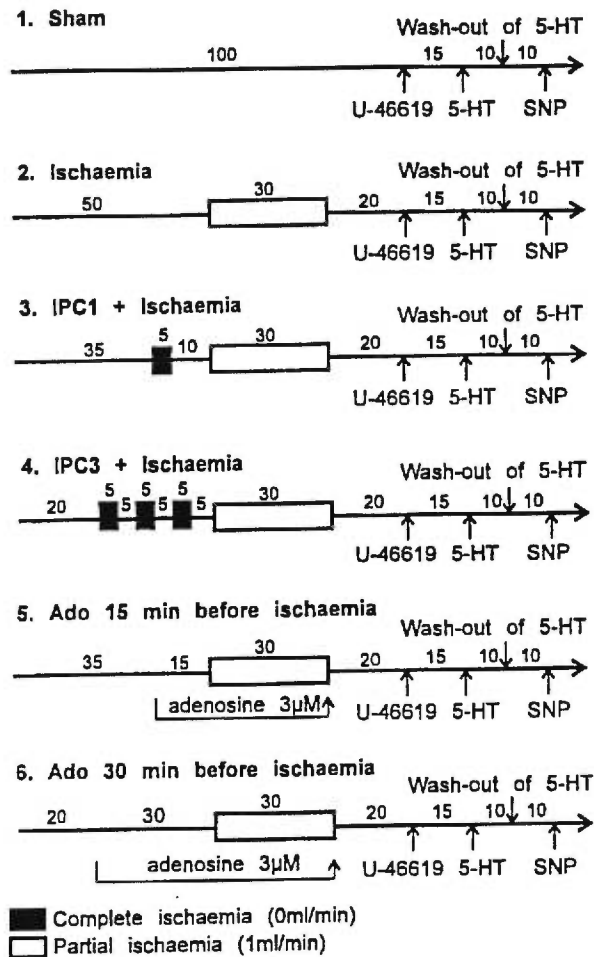
**Tableau III.I**Effect of 0.1  $\mu$ M U-46619 infusion on coronary resistance (mmHg min ml<sup>-1</sup>)

	n	Before U-46619	After U-46619
IPC groups			
<i>Non-diabetics</i>			
Sham	8	5.87 $\pm$ 0.35	10.10 $\pm$ 0.82 *
Ischaemia	8	5.96 $\pm$ 0.82	11.53 $\pm$ 0.75 *
IPC1	8	5.94 $\pm$ 0.31	11.53 $\pm$ 0.75 *
IPC3	6	5.25 $\pm$ 0.47	9.50 $\pm$ 0.89 *
<i>Diabetics</i>			
Sham	8	5.35 $\pm$ 0.54	9.34 $\pm$ 1.05 *
Ischaemia	8	5.46 $\pm$ 0.88	10.05 $\pm$ 1.25 *
IPC1	6	5.13 $\pm$ 0.36	8.73 $\pm$ 0.83 *
IPC3	7	3.93 $\pm$ 0.43	7.29 $\pm$ 0.65 *
Adenosine groups			
<i>Non-diabetics</i>			
45-min perfusion	8	5.08 $\pm$ 0.40	8.95 $\pm$ 0.56 *
60-min perfusion	4	5.84 $\pm$ 0.89	9.72 $\pm$ 1.43 *
<i>Diabetics</i>			
45-min perfusion	7	4.51 $\pm$ 0.35	8.63 $\pm$ 0.62 *
60-min perfusion	7	4.78 $\pm$ 0.61	7.56 $\pm$ 0.66*

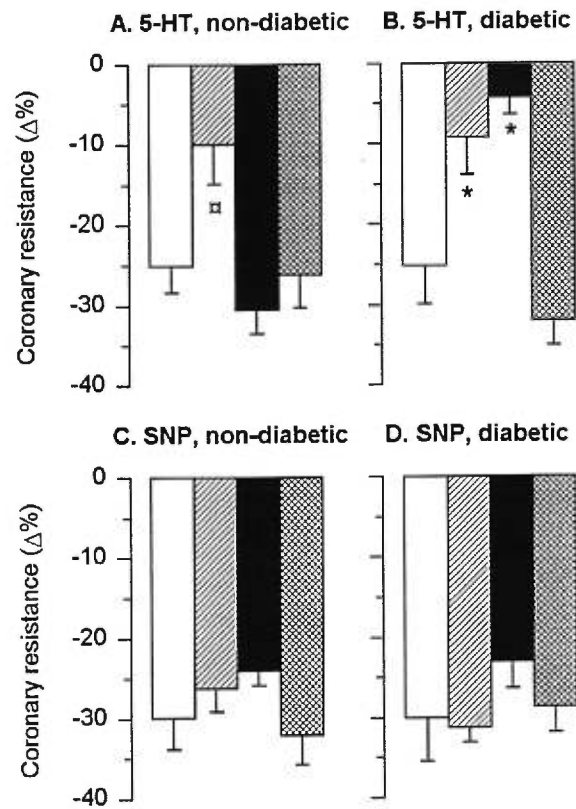
Coronary resistance was calculated as perfusion pressure(mmHg)/perfusion flow (ml min<sup>-1</sup>)

Values are means  $\pm$  SEM

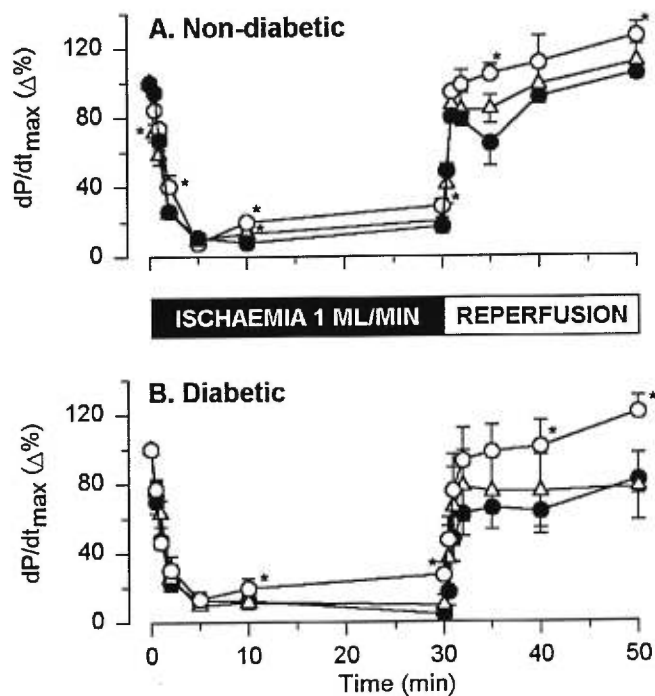
\* p < 0.05 compared with the corresponding "before U-46619" value



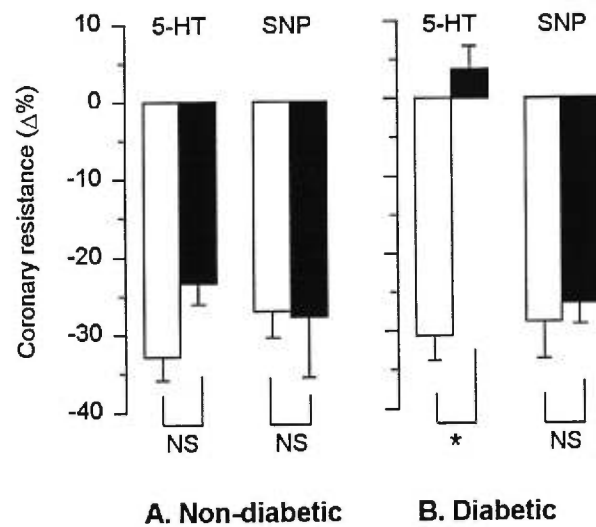
**Figure 3.1:** Diagrams showing the different experimental protocols. Each experiment started with a 20-min stabilisation period. Hearts in the ischaemia protocol (no. 2) underwent 30 min of low-flow ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) ischaemia and 20 min of reperfusion, after an additional 30-min stabilisation period. Hearts in the IPC1 + ischaemia protocol (no. 3) were submitted to a preconditioning 5 min zero-flow ischaemia and 10 min reperfusion, before the 30-min low-flow ischaemia. Hearts in the IPC3 + ischaemia protocol (no. 4) were submitted to 3 cycles of 5 min zero-flow ischaemia followed by 5 min reperfusion, before the 30-min low-flow ischaemia. In the experiments in which adenosine (Ado) perfusion replaced IPC, infusion with  $3 \mu\text{M}$  adenosine started either 15 min (no. 5) or 30 min (no. 6) before the 30-min low-flow ischaemia and 20 min of reperfusion. Adenosine perfusion lasted throughout the ischaemic period. Hearts in the sham protocol (no. 1) were used as time-matched controls. For all protocols, endothelial and smooth muscle function was evaluated after the 20-min reperfusion period. Coronary arteries were precontracted by a continuous infusion of  $0.1 \mu\text{M}$  U-46619. After 15 min, infusion of 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ ) was started for 10 min. A wash-out period of 10 min was allowed between 5-HT and SNP ( $3 \mu\text{M}$ , 10 min) infusions. The numbers above the bars represent the time in min.



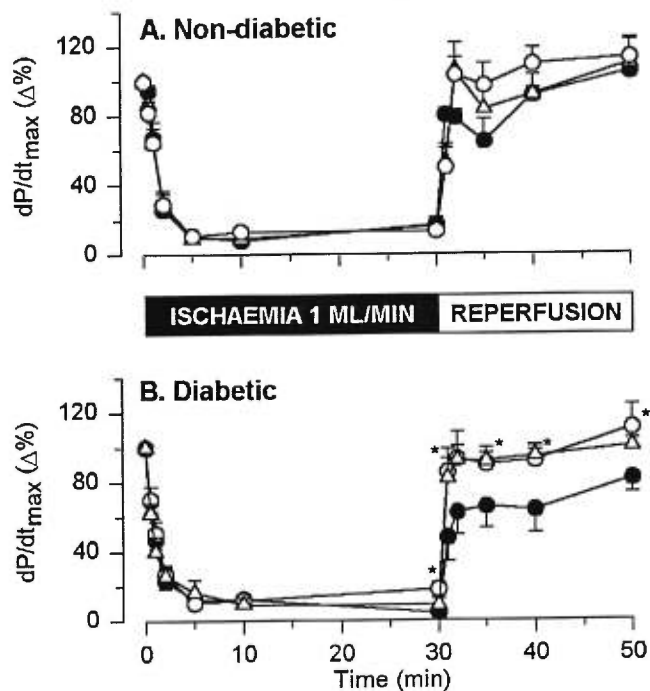
**Figure 3.2:** Change in coronary resistance induced by 10 $\mu$ M serotonin (5-HT, panels A and B) and 3 $\mu$ M sodium nitroprusside (SNP, panels C and D) in non-diabetic hearts (panels A and C) and in diabetic hearts (panels B and D). Open, hatched, closed, and crosshatched columns represent sham, ischaemic, IPC1 and IPC3 protocols, with 8, 8, 8, and 6 non-diabetic, and 8, 8, 6, and 7 diabetic hearts, respectively. □  $p < 0.05$ , compared with sham, IPC1, and IPC3. \*  $p < 0.05$ , compared with sham and IPC3.



**Figure 3.3** Change in  $dP/dt_{\max}$  ( $\Delta\%$ ) observed during 30 min partial ischaemia ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) and 20 min reperfusion in non-diabetic (top panel) and in diabetic hearts (bottom panel). Closed circles, open circles, and open triangles represent ischaemic, IPC3, and IPC1 protocols, with 8, 8, and 6 non-diabetic, and 8, 6, and 7 diabetic hearts, respectively.  $*p < 0.05$  compared with ischaemic hearts.



**Figure 3.4:** Change in coronary resistance (%) induced by 10 $\mu$ M serotonin (5-HT) and 3 $\mu$ M sodium nitroprusside (SNP) in non-diabetic (left panel) and in diabetic hearts (right panel). Open and closed columns represent 60-min and 45-min adenosine (3 $\mu$ M) pre-treatment with 4 and 8 non-diabetic, and 7 diabetic hearts in each pre-treatment, respectively. \* $p$ <0.05. NS= non-significant.



**Figure 3.5:** Change in  $dP/dt_{max}$  ( $\Delta\%$ ) observed during 30 min partial ischaemia ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) and 20 min reperfusion in non-diabetic (top panel) and in diabetic hearts (bottom panel). Closed circles, open circles, and open triangles represent ischaemic, 60-min, and 45-min adenosine pre-treatment protocols for 8, 4, and 8 non-diabetic, and 8, 7, and 7 diabetic hearts, respectively. \* $p < 0.05$  compared with ischaemic hearts.

CHAPITRE QUATRE : ROLE OF KININS IN THE ENDOTHELIAL PROTECTIVE EFFECT OF  
ISCHAEMIC PRECONDITIONING.

#### 4.1 ABSTRACT

1. The aim of this study was to assess whether the protective effect of ischaemic preconditioning on endothelial function in coronary arteries of the rat involves kinins.
2. Isolated rat hearts were exposed to a 30-min low-flow ischaemia (flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>) followed by 20-min reperfusion, after which coronaries were precontracted with 0.1µM U-46619, and the response to the endothelium-dependent vasodilator, serotonin (5-HT, 10µM), compared to that of the endothelium-independent vasodilator, sodium nitroprusside (SNP, 3µM).
3. In untreated hearts, ischaemia-reperfusion diminished selectively 5-HT-induced vasodilatation, compared with time-matched sham hearts. The vasodilatation to SNP was unaffected after ischaemia-reperfusion. Preconditioning (5 min of zero-flow ischaemia followed by 10 min reperfusion) in untreated hearts preserved the vasodilatation produced by 5-HT.
4. Blockade of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors with either 3nM [Lys<sup>0</sup>, Leu<sup>8</sup>, des-Arg<sup>9</sup>]-bradykinin (LLDBK) or 10nM Hoe 140 (icatibant) respectively (started 15 min before ischaemic preconditioning or a corresponding sham period and stopped just before the 20-min reperfusion period) had no effect on the vasodilatation produced by both 5-HT and SNP in sham hearts. Pretreatment with Hoe 140 did not block the protective effect of ischaemic preconditioning on the 5-HT vasodilatation. In contrast, LLDBK halved the protective effect of ischaemic preconditioning on endothelium-dependent vasodilatation.
5. Perfusion with either bradykinin or des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (1nM) 30 min before and lasting throughout the ischaemia protected the endothelium.
6. In conclusion, ischaemic preconditioning affords protection to the endothelial function in resistance coronary arteries of the rat partially by activation of B<sub>1</sub>

receptors. Although exogenous BK perfusion can protect the endothelium, B<sub>2</sub> receptors do not play an important role in this protection in the isolated rat heart.

## 4.2 INTRODUCTION

Ischaemic preconditioning induced by single or repetitive short periods of ischaemia followed by intermittent reperfusion, render the heart more resistant to a subsequent longer ischaemic period. This phenomenon limits infarct size (90;94), reduces the risk of ischaemia-reperfusion arrhythmias (128;130), improves recovery of ventricular function (94), reduces catabolite accumulation, and slows ischaemic metabolism (127;133). This cardioprotective effect has been observed in different species, including rats (222;317), rabbits (94), dogs (90), pigs (346), and humans (96).

Some studies have demonstrated that ischaemia-reperfusion attenuated endothelial function in large coronary vessels (55;56) and in coronary microvessels (57). In addition, it has been shown that the beneficial effect of ischaemic preconditioning is not limited to the cardiomyocytes, but can be observed in endothelial cells in various experimental models including dog resistance coronary arteries *in vivo* (57), and coronary circulation of the rat *in vitro* (145;334). Adenosine (165;324;334), ATP sensitive potassium channels (K<sub>ATP</sub> channels) (322;323;334), and protein kinase C activation (260) have been implicated in the mechanisms of the protection afforded by ischaemic preconditioning.

The contribution of kinins in the protection afforded by ischaemic preconditioning has been studied in isolated rat heart as well as in dogs and rabbits *in vivo*. These studies revealed that B<sub>2</sub>-receptor activation is involved in the reduction in both ischaemia and reperfusion-induced arrhythmias (206) and infarct size (169;207), and improvement of post-ischaemic ventricular recovery by ischaemic



preconditioning (208). Numerous studies have demonstrated that exogenous bradykinin perfusion is protective against ischaemia-reperfusion induced ventricular fibrillation (209;315). In addition, it has been reported that exogenous perfusion of bradykinin (BK) and des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (DBK) decreased reperfusion-induced noradrenaline outflow and arrhythmias via B<sub>1</sub>-receptors (210).

However, little is known about the role played by endogenous kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. Therefore, the first aim of the present study was to evaluate whether ischaemic preconditioning affords protection against the ischaemic insult to the endothelium of coronary vessels in isolated rat hearts via the kinin pathway. The second aim was to verify whether exogenous kinin perfusion could mimic the beneficial effects of ischaemic preconditioning against ischaemic insult in these hearts.

### 4.3 METHODS

#### *Preparation of hearts*

The investigation was performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (300-350 g) were narcotized with CO<sub>2</sub> until a complete loss of consciousness and rapidly decapitated. Hearts were rapidly excised and immersed in ice-cold heparinised buffer (10 IU ml<sup>-1</sup>). They were immediately mounted on the Langendorff setup and perfused at constant flow by means of a digital roller pump. A 20-ml compliance chamber along the perfusion line ensured a continuous flow. The flow rate was adjusted during the stabilization period to obtain a coronary perfusion pressure of approximately 75 mmHg and was held constant, with the exception of the ischaemic periods during which flow was either stopped (zero-flow ischaemia) or reduced to 1 ml min<sup>-1</sup> (low-flow ischaemia). A second adjustment of the flow rate was made at the end of the long reperfusion period,

before the perfusion of U-46619, to correct any deviation of the coronary perfusion pressure from 75 mmHg, and was held constant thereafter. Flow rate was measured during the whole experiment with an in-line ultrasonic flow probe and meter (Transonic Systems Inc., model T106). Perfusion pressure was monitored to calculate coronary resistance. The normal perfusion solution consisted of a modified Krebs-Henseleit buffer containing (in mM): NaCl 118, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 24, D-glucose 5, pyruvate 2. The perfusate was gassed with 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4) and kept at a constant temperature of 37 °C. All drugs were administered through a Y connector in the aortic cannula with syringe pumps (Harvard Apparatus, model 11) at one hundredth of the coronary flow rate. Adequate mixing of the drugs was ensured by the turbulent flow created in the reverse drop shaped aortic cannula. All concentrations mentioned in the text and figures refer to the final concentration after mixing. Coronary perfusion pressure was measured with a pressure transducer connected to a side arm of the aortic perfusion cannula. Isovolumetric left ventricular pressure and its first derivative (dP/dt) was measured by a fluid filled latex balloon inserted into the left ventricle and connected to a second pressure transducer. The volume of the balloon was adjusted to obtain a diastolic pressure between 5 and 10 mmHg. Heart rate was derived from the left ventricular pressure trace by a tachograph. Data were recorded on a polygraph system (Grass Model 79 polygraph).

#### *Experimental protocols*

The animals were randomized into fifteen groups (Figure 1). The hearts in all groups were subjected to a 20-min stabilization period. Drugs or vehicle infusion was then started, followed by an additional 15-min perfusion period. The ischaemic groups were subjected to a 15-min sham period, followed by 30 min of partial ischaemia (flow rate 1 ml min<sup>-1</sup>) prior to a 20-min reperfusion period. In the preconditioned groups, the hearts were exposed to 5 min global ischaemia (zero-flow) plus 10 min of reperfusion before the 30-min ischaemia and 20-min

reperfusion periods. The sham groups were not exposed to ischaemia-reperfusion, but to a time-matched normal perfusion. After these periods, coronary arteries were precontracted with 0.1 $\mu$ M U-46619 administered throughout the end of the experiment. 15 min after the beginning of U-46619 infusion, the endothelial function was evaluated by the vasodilatation produced by 10 $\mu$ M serotonin (5-HT), whereas coronary smooth muscle function was evaluated with 3 $\mu$ M sodium nitroprusside (SNP). These infusions were maintained for 10 min, which was long enough to reach a steady state. A washout period of 10 min was allowed between each infusion. Vasodilatation was evaluated by computing percent changes in coronary resistance (coronary perfusion pressure divided by coronary flow), measured immediately before each drug infusion, and after a new steady state. The concentrations of 5-HT and SNP were determined in preliminary dose-response experiments to produce near-maximal vasodilatation.

Sham, ischaemic, and ischaemic preconditioning hearts were treated with either 10nM Hoe 140 (icatibant, a selective B<sub>2</sub> receptor antagonist), 3nM [Lys<sup>0</sup>, Leu<sup>8</sup>, des-Arg<sup>9</sup>]-bradykinin (LLDBK, a selective B<sub>1</sub> receptor antagonist), or vehicles starting after the 20-min stabilization period, and lasting throughout the 30-min partial ischaemic period. Drug infusion was stopped upon reperfusion.

In additional experimental series, the effect of an exogenous kinin perfusion was compared with that of ischaemic preconditioning. In these groups, hearts were treated with either 1nM BK, 1nM DBK or vehicle starting after the 20-min stabilization period, in order to expose the hearts to 30 min kinin perfusion before ischaemia. The kinin perfusion lasted throughout the 30-min ischaemic period, and was stopped upon reperfusion.

### *Statistical analysis*

Values represent the mean  $\pm$  s.e.mean. Statistical significance of differences between means was evaluated by a two way analysis of variance followed by a

Scheffé post-hoc test. In the presence of an interaction between the different groups, one way analysis of variance were used for each group. A commercially available software (Systat for Windows version 6.1) was used. Only probability values (P) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

### *Drugs*

Hoe 140 was kindly provided by Hoechst-Marion-Roussel (Frankfurt, Germany). LLDBK was a generous gift from Dr A. Adam. All other drugs were obtained from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ont, Canada). Stock solutions of Hoe 140 (0.1 mM), LLDBK (1 mM), BK (0.9 mM), and DBK (1.12 mM) were prepared in Krebs-Henseleit buffer, and further diluted in the same buffer. U-46619 (9,11-dideoxy-11,9-epoxymethano-prostaglandin F<sub>2</sub>, 28.5 mM) was dissolved in 100% ethanol and diluted in Krebs-Henseleit buffer to obtain the desired final concentration. Ethanol (0.003%) at the concentration obtained in the final dilution had no effect on any of the haemodynamic variables studied and on the dilator responses to 5-HT and SNP. All the other drugs were dissolved in Krebs-Henseleit buffer.

## **4.4 RESULTS**

### *Ischaemic preconditioning groups*

#### *VASCULAR FUNCTION*

##### *Untreated groups*

Coronary resistance measured just before 0.1 μM U-46619 perfusion (n=24) was  $5.92 \pm 0.29$  mmHg min ml<sup>-1</sup>, for a coronary flow rate of  $6.72 \pm 0.22$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $1.90 \pm 0.05$  g). Infusion of U-46619 (0.1 μM, n=24) induced a significant (P<0.05) vasoconstriction in all groups of hearts (sham,

ischaemia, and ischaemic preconditioning, Table 1). Perfusion of 10 $\mu$ M 5-HT produced a diminution in coronary resistance of  $-25.2 \pm 4.8\%$ . 30 min of partial ischaemia significantly diminished the 5-HT-induced vasodilatation by more than half (Figure 2a). One period of ischaemic preconditioning prevented the deleterious effect of ischaemia on endothelium-dependent vasodilatation: the vasodilatation produced by 5-HT in preconditioned hearts was comparable to that observed in hearts not subjected to ischaemia (Figure 2a). Endothelium-independent vasodilatation to 3 $\mu$ M SNP was not affected by ischaemia and was found to be comparable in the three groups (sham, ischaemia, and ischaemic preconditioning, Figure 2b).

#### *Hoe 140-treated groups*

Blockade of kinin B<sub>2</sub> receptors with Hoe 140 (10nM) was accompanied by a small but non-significant increase in coronary resistance when measured just before 0.1 $\mu$ M U-46619 perfusion (Hoe 140-treated vs untreated hearts,  $P > 0.05$ , Table 1). The perfusion rate was  $5.57 \pm 0.32 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (mean heart weight of  $2.18 \pm 0.06 \text{ g}$ ). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M,  $n=27$ ) induced a significant ( $P < 0.05$ ) vasoconstriction in all Hoe 140-treated groups (Table 1). Vasodilatation produced by 10 $\mu$ M 5-HT ( $-20.3 \pm 4.2\%$  in sham hearts,  $n=7$ ) was almost totally abolished in the ischaemic group (Figure 2c). Ischaemic preconditioning in Hoe 140-treated hearts was still able to prevent completely the deleterious effect of ischaemia on 5-HT-induced vasodilatation (Figure 2c). Vasodilatation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in the three Hoe 140-treated groups (sham, ischaemic, and ischaemic preconditioning, Figure 2d).

#### *LLDBK-treated groups*

Blockade of kinin B<sub>1</sub> receptors with LLDBK produced no significant increase in coronary resistance when measured just before 0.1 $\mu$ M U-46619 perfusion (LLDBK-treated vs untreated hearts,  $P > 0.05$ , Table 1). The perfusion rate was

$5.75 \pm 0.31 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (mean heart weight of  $2.16 \pm 0.08 \text{ g}$ ). Infusion of U-46619 ( $0.1 \mu\text{M}$ ,  $n=17$ ) induced a significant ( $P<0.05$ ) vasoconstriction in all three groups (Table 1). Vasodilatation produced by  $10 \mu\text{M}$  5-HT ( $-35.7 \pm 4.5\%$  in sham hearts,  $n=5$ ) was practically abolished in the ischaemic group (Figure 2e). Ischaemic preconditioning in LLDBK-treated hearts was unable to prevent the deleterious effect of ischaemia on 5-HT-induced vasodilatation (Figure 2e). Vasodilatation to  $3 \mu\text{M}$  SNP was comparable in the three LLDBK-treated groups (sham, ischaemic, and ischaemic preconditioning, Figure 2f).

### *MYOCARDIAL FUNCTION*

The inotropic and lusitropic characteristics of Hoe 140 and LLDBK-pretreated hearts were comparable to those of untreated hearts:  $dP/dt_{\text{max}}$  values measured before the 30-min low-flow ischaemia were  $1980 \pm 449$  ( $n=16$ ),  $1453 \pm 45$  ( $n=20$ ) and  $1532 \pm 104 \text{ mmHg s}^{-1}$  ( $n=12$ ), and the  $dP/dt_{\text{min}}$  values  $934 \pm 120$  ( $n=16$ ),  $966 \pm 42$  ( $n=20$ ) and  $1041 \pm 65 \text{ mmHg s}^{-1}$  ( $n=12$ ), for untreated, Hoe 140 and LLDBK pretreated hearts, respectively. Low-flow ischaemia was accompanied by a severe reduction in  $dP/dt_{\text{max}}$  (Figure 3) and in  $dP/dt_{\text{min}}$  (Figure 4) in all groups. Ischaemic preconditioning improved  $dP/dt_{\text{max}}$  and  $dP/dt_{\text{min}}$  recovery during ischaemia, particularly during the last 20 min of ischaemia, in LLDBK pretreated (Figures 3 & 4) and Hoe 140 pretreated (Figures 3 & 4), but not in untreated hearts. Ischaemic preconditioning improved the post-ischaemic recovery of  $dP/dt_{\text{max}}$  (Figure 3) and  $dP/dt_{\text{min}}$  (Figure 4) in LLDBK pretreated (Figures 3 & 4) and Hoe 140 pretreated (Figures 3 & 4), but not in untreated hearts (Figures 3 & 4).

*Exogenous kinins groups**VASCULAR FUNCTION**BK-treated groups*

Perfusion with BK (1nM) produced no significant effect in coronary resistance when measured just before the 30-min ischaemic period ( $0.7 \pm 2.7\%$  variation of coronary resistance, n=12). The perfusion rate in BK-treated hearts was  $6.11 \pm 0.32 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (mean heart weight of  $2.14 \pm 0.14 \text{ g}$ ). Infusion of U-46619 ( $0.1\mu\text{M}$ , n=12) induced a significant ( $P<0.05$ ) vasoconstriction in all BK-treated hearts (Table 1). 30 min of low-flow ischaemia significantly diminished the 5-HT-induced vasodilatation by more than half in untreated hearts (Figure 5a). Treatment with BK, starting 30 min before ischaemia, preserved the vasodilatation produced by  $10\mu\text{M}$  5-HT in ischaemic hearts (Figure 5a). Vasodilatation to  $3\mu\text{M}$  SNP was comparable in all BK-treated hearts (Figure 5b).

*DBK-treated groups*

DBK perfusion (1nM) produced no significant effect on coronary resistance when measured just before the 30-min ischaemic period ( $3.5\pm 3.0\%$  variation of coronary resistance, n=12). The perfusion rate in DBK-treated hearts was  $6.41 \pm 0.54 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (mean heart weight of  $2.14 \pm 0.13 \text{ g}$ ). Infusion of U-46619 ( $0.1\mu\text{M}$ , n=12) induced a significant ( $P<0.05$ ) vasoconstriction in all DBK-treated hearts (Table 1). 30 min of low-flow ischaemia halved the 5-HT-induced vasodilatation in untreated hearts (Figure 5c). Treatment with DBK, starting 30 min before ischaemia, preserved the vasodilatation produced by  $10\mu\text{M}$  5-HT in ischaemic hearts (Figure 5c). Vasodilatation to  $3\mu\text{M}$  SNP was comparable in all DBK-treated hearts (Figure 5d)

## *MYOCARDIAL FUNCTION*

The  $dP/dt_{\max}$  values measured before the 30-min low-flow ischaemia were  $1483 \pm 71$  and  $1600 \pm 63$  mmHg  $s^{-1}$ , and the  $dP/dt_{\min}$  values  $942 \pm 88$  and  $1180 \pm 116$  mmHg  $s^{-1}$ , for BK 1nM and DBK 1nM pretreated hearts, respectively. In both groups, pretreatment with exogenous kinins, either DBK or BK 30-min before ischaemia, had no effect on ischaemic or post-ischaemic recovery of  $dP/dt_{\max}$  and  $dP/dt_{\min}$  (data not shown).

## **4.5 DISCUSSION**

In the present study, the contribution of kinins in the protective effect of ischaemic preconditioning on myocardial and endothelial functions of the rat heart was assessed. The major findings are 1) that ischaemic preconditioning with a single short period of ischaemia prevents endothelial dysfunction produced by ischaemia-reperfusion in rat hearts via activation of  $B_1$  receptors, but not  $B_2$  receptors, and 2) both DBK and BK perfusions starting 30 min before ischaemia can mimic the beneficial effect of ischaemic preconditioning on endothelial function in rat coronary arteries.

### *Effect of preconditioning on ischaemic dysfunction*

In the present study, the ischaemic conditions (flow rate and duration) were selected in order to observe a selective endothelial dysfunction. This was confirmed by the fact that the endothelium-dependent and NO-mediated (319) vasodilatation of coronary arteries to 5-HT was drastically decreased after the ischaemia-reperfusion insult, whereas the same vessels retained the ability to dilate to SNP, an endothelium-independent vasodilator. It has been reported earlier (334) that ischaemic preconditioning prevents the reduction in the vasodilatation to 5-HT after ischaemia-reperfusion, suggesting that ischaemic preconditioning can protect endothelial function in coronary arteries. Such a



protection was observed in the present study. A protective effect of ischaemic preconditioning was also observed with canine epicardial coronary arteries (57), and in rat isolated left coronary arteries *in vitro* (145).

The upper and lower limits of the dP/dt signal, dP/dt<sub>max</sub> and dP/dt<sub>min</sub>, which represent the capacity of the ventricle to contract during systole and its ability to relax during diastole, were used to evaluate the contractile function of the hearts. These variables recovered rapidly and completely within the 20-min reperfusion period. Furthermore, ischaemic preconditioning failed to improve post-ischaemic ventricular recovery. The inability of ischaemic preconditioning to improve ventricular recovery is most probably due to the fact that the present ischaemic conditions were too mild to severely depress the contractile function, leaving little room for improvement.

#### *Role of B<sub>2</sub> receptors in ischaemic preconditioning*

BK has often been reported to be an endogenous mediator of the protection afforded by ischaemic preconditioning (347). Some investigators have reported that the B<sub>2</sub> receptor antagonist, Hoe 140, prevents the protective effect of ischaemic preconditioning on ventricular arrhythmias in dogs *in vivo* (206), on infarct size in rabbits *in vivo* (207), and contractile function in isolated rat hearts (208). However, to the best of our knowledge, little is known about the role played by endogenous kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. Therefore, we tested whether B<sub>2</sub> receptor activation was involved in the protection afforded by ischaemic preconditioning to the endothelium. Hoe 140 was selected for its high selectivity for B<sub>2</sub> receptors. Furthermore, the concentration used was above those corresponding to the pA<sub>2</sub> values reported in the literature (348). The protective effect of ischaemic preconditioning on endothelial function was not affected by Hoe 140, as reflected by the comparable endothelium-dependent vasodilatation to 5-HT in both Hoe 140-treated preconditioned and sham groups. Therefore, these data suggest that

B<sub>2</sub> receptor activation is not involved in the protection afforded by ischaemic preconditioning against endothelial dysfunction observed following ischaemia-reperfusion.

In the present experimental conditions, Hoe 140 pretreatment seems to improve myocardial recovery in the preconditioned group, but this may rather be due to a slightly depressed myocardial recovery observed in Hoe 140-treated ischaemic group. Thus, these data suggest that B<sub>2</sub> receptor activation may be required for a full post-ischaemic ventricular recovery under the present conditions.

#### *Role of B<sub>1</sub> receptors in ischaemic preconditioning*

Recently, some have reported that the protective effect against ischaemia obtained by either BK or DBK perfusion is mediated via the activation of B<sub>1</sub> receptors (210). However, for the moment, the role played by B<sub>1</sub> receptor activation in the protective action of ischaemic preconditioning remains unknown. Therefore, we tested using a potent and highly selective B<sub>1</sub> receptor antagonist (349) whether the activation of B<sub>1</sub> receptors is involved in ischaemic preconditioning. In the LLDBK-treated preconditioned group, the vasodilatation to 5-HT was halved whereas the vasodilatation to SNP was not significantly different from that observed in the sham group. These data suggest that an endogenously produced B<sub>1</sub>-receptor agonist plays a role in the endothelial protection afforded by ischaemic preconditioning.

In the present experimental conditions, myocardial recovery was improved in the LLDBK-treated preconditioned group, compared with the LLDBK-treated ischaemic group. Once again, this phenomenon is probably due to the depressed myocardial recovery observed in the LLDBK-treated ischaemic group, and suggests that B<sub>1</sub> receptor activation may also be needed for rapid post-ischaemic ventricular recovery.

*Protective effect of exogenous kinins*

To confirm the contribution of kinins in the endothelial protection afforded by ischaemic preconditioning, the effect of exogenous perfusion with low concentration of kinins on the endothelial function following ischaemia-reperfusion was studied. Two kinins were compared: BK and DBK, both perfused 30 min before ischaemia. Both kinins prevented the ischaemia-induced reduction in the vasodilatation to 5-HT. Thus, these data suggest that both BK and DBK can mimic the protective effect of ischaemic preconditioning on the endothelial function.

In contrast to the endothelial function, neither BK nor DBK were able to improve ischaemic and post-ischaemic recovery of  $dP/dt_{\max}$  and  $dP/dt_{\min}$ . As discussed earlier, this is probably due to the fact that a 30-min  $1 \text{ ml min}^{-1}$  ischaemia, although sufficient to alter the endothelial function, is not severe enough to impair ventricular recovery.

The mechanisms by which kinins could exert a protective effect are numerous (347). Bradykinin, released from ischaemic tissues can act directly on  $B_2$  receptors or can be metabolized into DBK and act on  $B_1$  receptors (350). We have recently observed that the protective effect of BK on the endothelial function in the isolated rat heart can be blocked by LLDBK (unpublished observation), suggesting that  $B_1$  receptors might be implicated in the protective effect of BK.  $B_1$  receptors can be expressed during the ischaemia as suggested by some groups who reported an induction of  $B_1$  receptors in pathological conditions such as anoxia (351). Activation of  $B_2$  and possibly  $B_1$  receptors could stimulate the endothelial production of NO and prostacyclin both of which have been linked to  $K_{\text{ATP}}$  channel activation (352;353). It has been recently reported that inhibition of  $K_{\text{ATP}}$  channels with glibenclamide reduces the endothelial protection afforded by ischaemic preconditioning (334). The exact mechanisms by which  $K_{\text{ATP}}$  channel

activation protects the endothelium remain unknown, but several hypotheses have been proposed (334).

Alternatively, both B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors activate phospholipase C to release inositol 1,4,5-trisphosphate and 1,2-diacylglycerol. The latter compound in combination with intracellular calcium then causes the translocation and activation of PKC. Activated PKC may phosphorylate secondary effectors, which would be responsible for the protective effects of ischaemic preconditioning (208;271).

It may be argued that the protective effect of BK could be based on an increase in coronary flow, which would increase glucose uptake and washing of deleterious catabolic wastes. However, an increase in coronary flow is certainly not the only contributor of these beneficial effects. Previous studies have shown that BK at low concentration, without any effect on coronary flow, still prevented the deleterious effect of ischaemia-reperfusion (208;354). In addition, our study demonstrated protection to the endothelium without a discernible increase in coronary flow.

In conclusion, these data suggest that ischaemic preconditioning affords protection to the endothelial function against subsequent ischaemic insult in the intact coronary circulation of the rat. The reduced protective effect of ischaemic preconditioning in presence of LLDBK suggests that this protection may be mediated partially by B<sub>1</sub> receptor activation. The lack of inhibitory action of Hoe 140 on ischaemic preconditioning suggests that B<sub>2</sub> receptors do not play a role in the endogenous protection of the endothelial function. Exogenous perfusion of BK or DBK can afford protection to endothelial function against the deleterious effect of ischaemia-reperfusion.

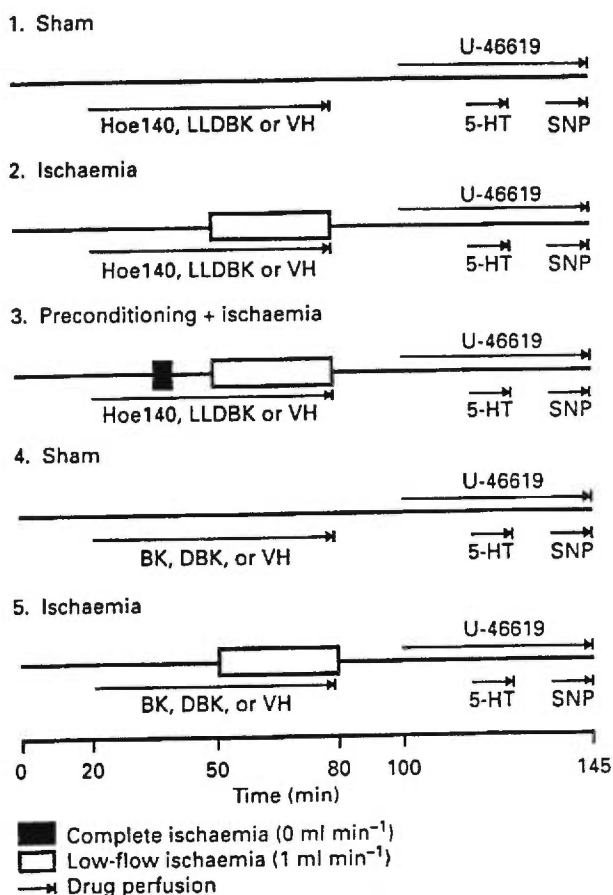
**Tableau IV.I**Effect of 0.1 $\mu$ M U-46619 infusion on coronary resistance (mmHgmin $^{-1}$ )

	n	Before U-46619	After U-46619
<b>Ischaemic preconditioning groups</b>			
<i>Untreated</i>			
Sham	8	5.87 $\pm$ 0.35	10.10 $\pm$ 0.82 *
Ischaemia	8	5.96 $\pm$ 0.82	11.53 $\pm$ 0.75 *
Preconditioning	8	5.94 $\pm$ 0.31	11.53 $\pm$ 0.75 *
<i>Hoe 140</i>			
Sham	7	7.58 $\pm$ 0.60	13.15 $\pm$ 0.87 *
Ischaemia	7	8.21 $\pm$ 1.22	12.28 $\pm$ 0.60 *
Preconditioning	13	6.16 $\pm$ 0.31	10.63 $\pm$ 1.37 *
<i>LLDBK</i>			
Sham	5	6.71 $\pm$ 0.61	11.33 $\pm$ 0.68 *
Ischaemia	6	4.64 $\pm$ 0.58	9.06 $\pm$ 1.43 *
Preconditioning	6	7.18 $\pm$ 0.55	12.05 $\pm$ 0.62 *
<b>Exogenous kinin groups</b>			
<i>Bradykinin</i>			
Sham	7	7.53 $\pm$ 0.74	11.90 $\pm$ 0.72 *
Ischaemia	5	5.52 $\pm$ 0.20	10.00 $\pm$ 0.61 *
Ischaemia without BK	8	5.94 $\pm$ 0.31	11.53 $\pm$ 0.75 *
<i>Des-Arg<sup>9</sup>, Bradykinin</i>			
Sham	6	6.02 $\pm$ 0.60	10.51 $\pm$ 0.72 *
Ischaemia	6	5.45 $\pm$ 0.55	10.41 $\pm$ 1.27 *
Ischaemia without DBK	8	5.94 $\pm$ 0.31	11.53 $\pm$ 0.75 *

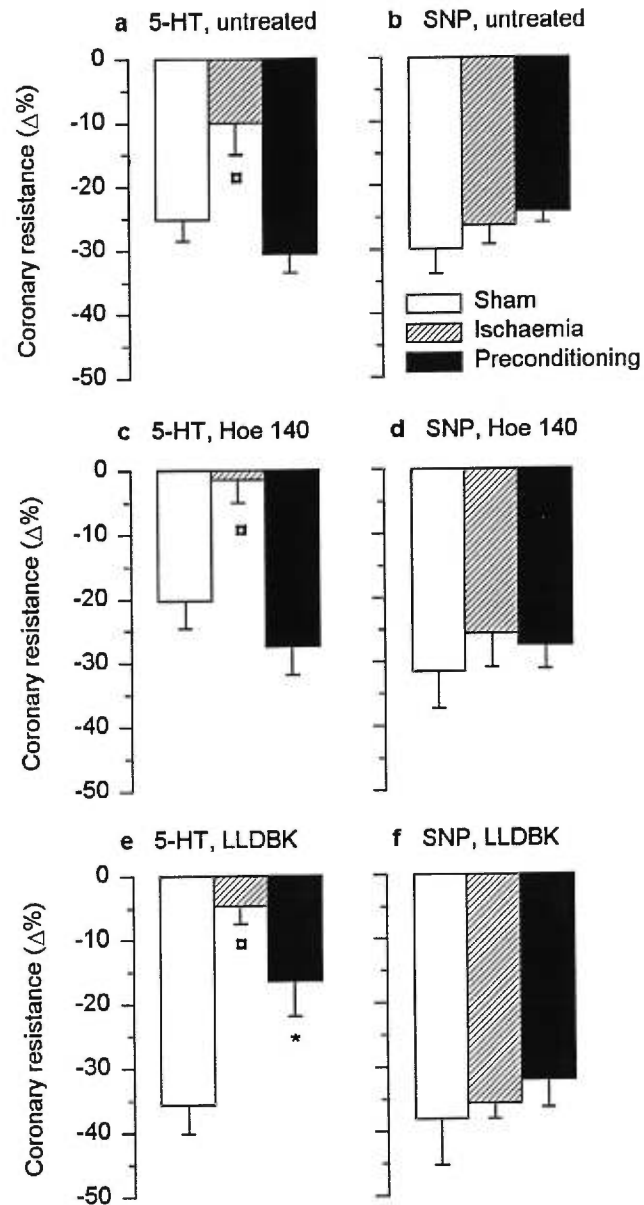
Coronary resistance was calculated as perfusion pressure (mmHg) divided by perfusion flow (ml min $^{-1}$ )

Values are means  $\pm$  SEM

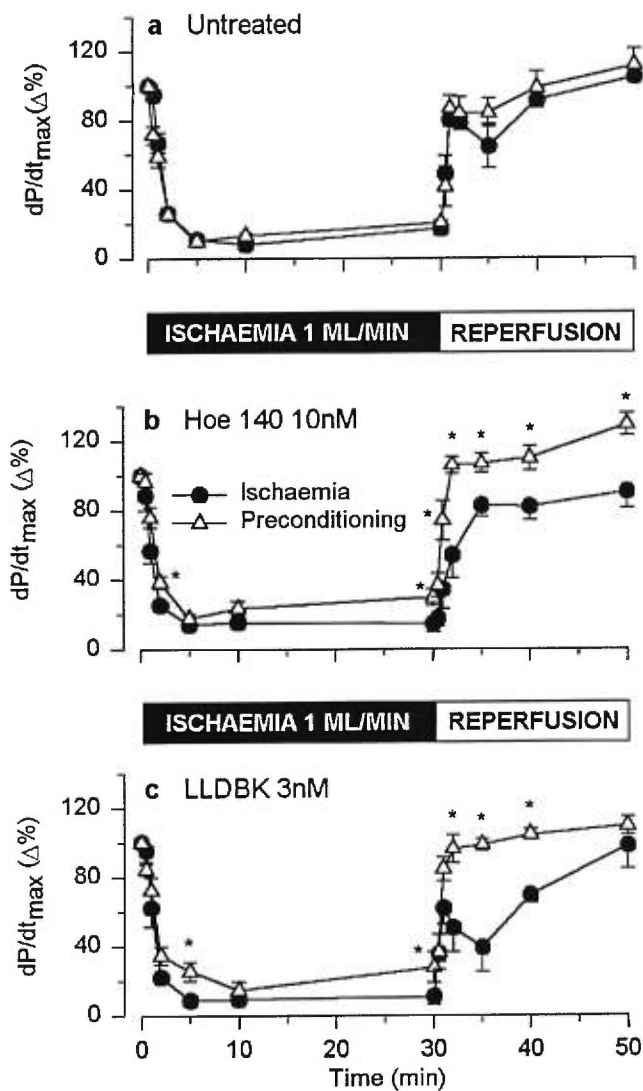
\* P < 0.05 compared with the corresponding "before U-46619" value



**Figure 4.1:** Diagrams showing the different experimental protocols. Each experiment started with a 20-min stabilization period. Hearts in the ischaemia protocol (no. 2 & 5) underwent 30 min of low-flow ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) ischaemia and 20 min of reperfusion, after an additional 30-min stabilization period. Hearts in the ischaemic preconditioning + ischaemia protocol (no. 3) were submitted to a preconditioning 5 min zero-flow ischaemia and 10 min reperfusion, before the 30-min low-flow ischaemia. Perfusion of drugs [Hoe 140  $10 \text{ nM}$  (no. 1, 2 & 3),  $[\text{Lys}^0, \text{Leu}^8, \text{des-Arg}^9]$ -bradykinin  $3 \text{ nM}$  (LLDBK, no. 1, 2 & 3), bradykinin  $1 \text{ nM}$  (BK, no. 4 & 5),  $\text{des-Arg}^9$ -bradykinin  $1 \text{ nM}$  (DBK, no. 4 & 5), or their respective vehicles (VH)] was started after the 20-min stabilization period, lasted throughout the 30-min low-flow ischaemia or a corresponding period, and was stopped upon reperfusion. In all protocols, endothelial and smooth muscle function was evaluated after the 20-min reperfusion period. Coronary arteries were precontracted by a continuous infusion of  $0.1 \mu\text{M}$  U-46619. After 15 min, infusion of serotonin (5-HT,  $10 \mu\text{M}$ ) was started for 10 min. A wash-out period of 10 min was allowed between 5-HT and sodium nitroprusside (SNP,  $3 \mu\text{M}$ , 10 min) infusions. The bottom axis represents the time in min.

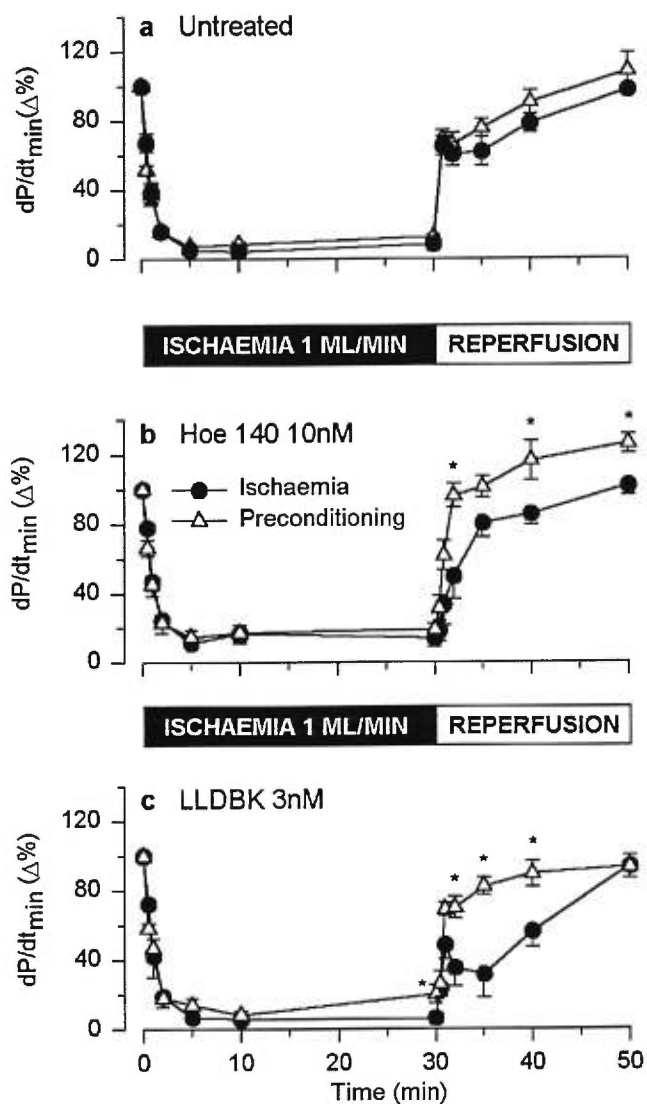


**Figure 4.2:** Change in coronary resistance ( $\Delta\%$ ) induced by  $10\mu\text{M}$  serotonin (5-HT, panels a, c, and e) and  $3\mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP, panels b, d, and f) in control hearts (panels a and b), in Hoe 140 pretreated hearts (panels c and d), and in  $[\text{Lys}^0, \text{Leu}^8, \text{des-Arg}^9]$ -bradykinin (LLDBK) pretreated hearts (panels e and f). Number of sham, ischaemic, and ischaemic preconditioning hearts were 8, 8, and 8 for untreated; 7, 7, and 13 for Hoe 140; and 5, 6, and 6 for LLDBK pretreated hearts, respectively.  $\square$   $P < 0.05$ , compared with sham and ischaemic preconditioning. \* $P < 0.05$ , compared with sham.

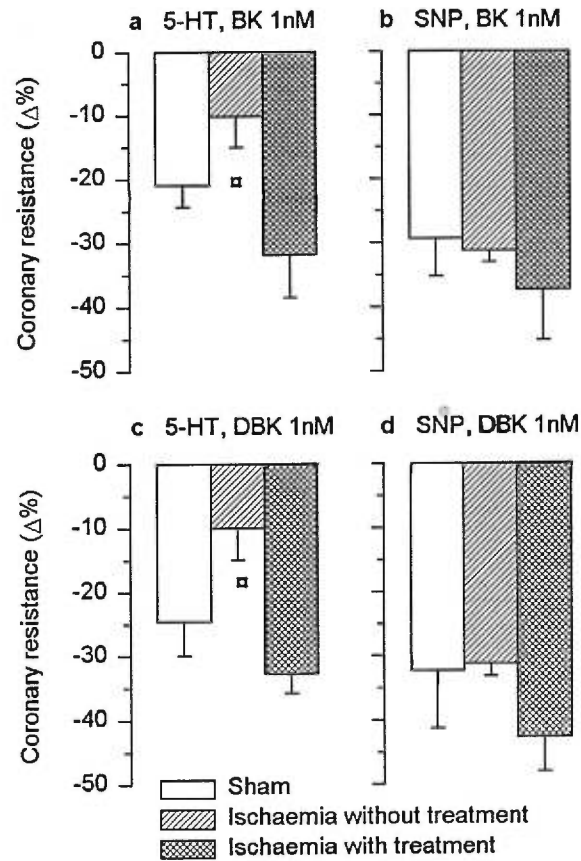


**Figure 4.3:** Change in  $dP/dt_{max}$  ( $\Delta\%$ ) observed during 30 min low-flow ischaemia (1 ml min<sup>-1</sup>) and 20 min reperfusion in untreated (panel a), Hoe 140 (panel b) and in [Lys<sup>0</sup>,Leu<sup>8</sup>,des-Arg<sup>9</sup>]-bradykinin (LLDBK) pretreated hearts (panel c). Number of ischaemic and ischaemic preconditioning hearts were 8 and 8 for untreated; 7 and 13 for Hoe 140; and 6 and 6 for LLDBK pretreated hearts, respectively. \* $P < 0.05$  compared with ischaemic hearts.





**Figure 4.4:** Change in  $dP/dt_{min}$  ( $\Delta\%$ ) observed during 30 min low-flow ischaemia ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) and 20 min reperfusion in untreated (panel a), Hoe 140 (panel b) and in  $[\text{Lys}^0, \text{Leu}^8, \text{des-Arg}^9]$ -bradykinin (LLDBK) pretreated hearts (panel c). Number of ischaemic and ischaemic preconditioning hearts were 8 and 8 for untreated; 7 and 13 for Hoe 140; and 6 and 6 for LLDBK pretreated hearts, respectively. \* $P < 0.05$  compared with ischaemic hearts.



**Figure 4.5:** Change in coronary resistance ( $\Delta\%$ ) induced by  $10\mu\text{M}$  serotonin (5-HT, panels a and c) and  $3\mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP, panels b and d) in bradykinin (BK) pretreated hearts (panels a and b), and in des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (DBK) pretreated hearts (panels c and d). Number of sham, ischaemia without treatment, and ischaemia with treatment hearts were 7, 8, and 5 for BK; and 6, 8, and 6 for DBK pretreated hearts, respectively.  $\square$   $P < 0.05$ , compared with sham and ischaemia with treatment.

CHAPITRE CINQ : PARTICIPATION OF PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> IN THE ENDOTHELIAL  
PROTECTIVE EFFECT OF ISCHAEMIC PRECONDITIONING IN ISOLATED RAT  
HEART.

### 5.1 ABSTRACT

**Objective:** Assess whether the protective effect of ischaemic preconditioning (IPC) on endothelial function in coronary arteries of the rat involves prostaglandins. **Methods:** Isolated rat hearts perfused under constant flow conditions were exposed to 30 min of partial ischaemia (flow rate 1 ml/min) followed by 20 min of reperfusion, after which coronaries were precontracted with U-46619 0.1 $\mu$ M, and the coronary response to the endothelium-dependent vasodilator, serotonin (5-HT, 10 $\mu$ M), was compared to that of the endothelium-independent vasodilator, sodium nitroprusside (SNP, 3 $\mu$ M). Prostaglandin production was blocked with a perfusion of indomethacin 10 $\mu$ M started 15 min before IPC or a corresponding sham period and stopped just before the 20-min reperfusion period. **Results:** In untreated hearts, ischaemia diminished selectively 5-HT-induced vasodilatation, compared to sham hearts. The vasodilatation by SNP was unaffected after ischaemia and reperfusion. IPC (5 min of zero-flow ischaemia followed by 10 min reperfusion before the 30-min partial ischaemia) preserved the vasodilatation produced by 5-HT. Enzymeimmunoassays showed an increased production of PGE<sub>2</sub> in the IPC group. Treatment of hearts with indomethacin blocked the protective effect of IPC on the vasodilatation produced by 5-HT and decreased the production of PGE<sub>2</sub>. A 5-min perfusion with 3nM PGE<sub>2</sub> started 15 min before the partial ischaemia, protected the endothelium. This was blocked by 1 $\mu$ M chelerythrine, but not by 0.3 $\mu$ M glibenclamide. **Conclusions:** These results suggest that IPC affords protection to endothelial function in coronary arteries of the rat partially via the release of PGE<sub>2</sub>. In our experimental condition, protective effect of PGE<sub>2</sub> is mediated by PKC.

## 5.2 INTRODUCTION

Single or repetitive short periods of ischaemia followed by intermittent reperfusion, render the heart more resistant to a subsequent longer ischaemic period. This phenomenon described for the first time by Murry et al (90) limits infarct size (90;94), reduces the risk of ischaemia-reperfusion arrhythmias (128;130), improves recovery of ventricular function (94), reduces catabolite accumulation, and slows ischaemic metabolism (127;133). This cardioprotective effect called ischaemic preconditioning (IPC) has been observed in different species, including rats (222;317), rabbits (94), dogs (90), pigs (346), and humans (96).

Some studies have demonstrated that ischaemia-reperfusion attenuated endothelial function in large coronary vessels (55;56) and in coronary microvessels (57). In addition, it has been shown that the beneficial effect of IPC is not limited to the cardiomyocytes, but can be observed in endothelial cells in various experimental models including dog resistance coronary arteries *in vivo* (57), and coronary circulation of the rat *in vitro* (145;334). Adenosine (165;324;334), ATP sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$  channels) (322;323;334), and protein kinase C (PKC) activation (260;271) have all been implicated as mechanisms of the protection afforded by IPC.

On the other hand, ischaemia and hypoxia are known to be potent stimuli of prostaglandin release into the coronary circulation (215-219). Furthermore, a number of reports have suggested that cyclooxygenase (COX) products may be involved in the protective effects of myocardial preconditioning. With respect to COX-derived metabolites, Vegh et al. (220) reported that the antiarrhythmic effect of IPC in the canine heart was abolished by the COX inhibitor, meclofenamate, although the effects of this drug on either infarct size or ventricular haemodynamics were not determined. Another group reported that aspirin abolished the effect of IPC against reperfusion tachyarrhythmias in isolated Langendorff perfused rat hearts (221). In contrast, some groups failed to observe any effect of aspirin in the

rat heart subjected to coronary artery occlusion followed by reperfusion, either in terms of infarct size (355) or the incidence of arrhythmias (223;355).

In addition, some studies have demonstrated that exogenous prostaglandin perfusion preserves myocardial metabolism (224) and decreases infarct size (225). Moreover, defibrotide, an agent capable of increasing prostacyclin production by endothelial cells significantly protected rat heart, kidney and liver from ischaemia and postischaemic reperfusion injuries (226). But, on the other hand, experimental studies with exogenous prostaglandins have produced conflicting results with respect to their influence on ischaemia-reperfusion induced ventricular fibrillation (227-229).

However, for the moment, little is known about the role played by endogenous prostaglandins in the endothelial protective effect of IPC. Therefore, the first aim of the present study was to evaluate whether IPC affords protection against ischaemic injury to the endothelium of coronary vessels in isolated rat hearts via the prostaglandin pathway. The second aim was to verify whether exogenous prostaglandin perfusion could mimic the beneficial effects of IPC against ischaemic injury in these hearts.

### 5.3 METHODS

#### *Preparation of hearts*

The investigation was performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (300-350 g) were narcotised with CO<sub>2</sub> until a complete loss of consciousness and rapidly decapitated. Hearts were rapidly excised and immersed in ice-cold heparinised Krebs-Henseleit buffer (10 IU ml<sup>-1</sup>). They were immediately mounted on the experimental Langendorff setup and perfused at constant flow by means of a digital roller pump. A 20-ml compliance chamber along the perfusion line ensured a continuous flow.

The flow rate was adjusted during the stabilisation period to obtain a coronary perfusion pressure of approximately 75 mmHg and was held constant, with the exception of the ischaemic periods during which flow was either stopped (zero-flow ischaemia) or reduced to  $1 \text{ ml min}^{-1}$  (low-flow ischaemia). A second adjustment of the flow rate was made at the end of the long reperfusion period, before the perfusion of U-46619, to correct any deviation of the coronary perfusion pressure from 75 mmHg, and was held constant thereafter. Flow rate was measured during all the experiments with an in-line ultrasonic flow probe and meter (Transonic Systems Inc., model T106). Perfusion pressure was monitored to calculate coronary resistance. The normal perfusion solution consisted of a modified Krebs-Henseleit buffer containing (in mM): NaCl 118, KCl 4,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1,  $\text{NaHCO}_3$  24, D-glucose 5, pyruvate 2. The perfusate was gassed with 95%  $\text{O}_2$ - 5%  $\text{CO}_2$  (pH 7.4) and kept at a constant temperature of  $37^\circ\text{C}$ . All drugs were administered through a Y connector in the aortic cannula with syringe pumps (Harvard Apparatus, model 11) at one hundredth of the coronary flow rate. Adequate mixing of the drugs was ensured by the turbulent flow created in the reverse drop shaped aortic cannula. All concentrations mentioned in the text and figures refer to the final concentration after mixing. Coronary perfusion pressure was measured with a pressure transducer connected to a side arm of the aortic perfusion cannula. Isovolumetric left ventricular pressure and its first derivative ( $dP/dt$ ) were measured by a fluid filled latex balloon inserted into the left ventricle and connected to a second pressure transducer. The volume of the balloon was adjusted to obtain a diastolic pressure between 5 and 10 mmHg. The typical systolic pressure values measured with this setup were around 80-85 mmHg. Heart rate was derived from the left ventricular pressure trace by a tachograph. Data were recorded on a polygraph system (Grass Model 79 polygraph).

## *Experimental protocols*

### *Ischaemic preconditioning protocol*

The animals were assigned to one of three different experimental protocols (fig 1, protocols 1-3). The hearts in all groups were subjected to a 20-min stabilisation period. Drugs or vehicle infusion was then started, followed by an additional 15-min perfusion period. The ischaemic groups (protocol 2, fig 1) were subjected to a 15-min sham period, followed by 30 min of partial ischaemia (flow rate 1 ml/min) prior to a 20-min reperfusion period. In the preconditioned groups (protocol 3, fig 1), the hearts were exposed to 5 min global ischaemia (zero flow) plus 10 min of reperfusion before the 30-min ischaemia and 20-min reperfusion periods. The sham groups (protocol 1, fig 1) were not exposed to ischaemia-reperfusion, but to a time-matched normal perfusion. After these periods, coronary arteries were precontracted with 0.1  $\mu$ M U-46619, an agonist of thromboxane A<sub>2</sub> receptors (356), administered throughout the end of the experiment. 15 min after the beginning of U-46619 infusion, the endothelial function was evaluated by the vasodilatation produced by 10  $\mu$ M serotonin (5-HT), whereas coronary smooth muscle function was evaluated with 3  $\mu$ M sodium nitroprusside (SNP). These infusions were maintained for 10 min, which was long enough to reach a steady state. A washout period of 10 min was allowed between each infusion. Vasodilatation was evaluated by computing percent changes in coronary resistance (coronary perfusion pressure divided by coronary flow), measured immediately before each drug infusion, and after a new steady state. The concentrations of 5-HT and SNP were determined in preliminary dose-response experiments to produce near-maximal vasodilatation.

Sham, ischaemic, and ischaemic preconditioning hearts were treated with either 10  $\mu$ M indomethacin, 0.3  $\mu$ M glibenclamide, 1  $\mu$ M chelerythrine or their respective vehicles starting after the 20-min stabilisation period, and lasting throughout the 30-min partial ischaemic period (protocols 1-3, fig 1). Drug infusion was stopped upon reperfusion.

*Exogenous PGE<sub>2</sub> experimental protocol*

In additional experimental series, an exogenous prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) perfusion was performed instead of ischaemic preconditioning. The animals were assigned to one of two different experimental protocols (protocols 4 and 5, fig 1). The hearts in all groups were subjected to a 20-min stabilisation period. Drugs or vehicle infusion was then started, followed by an additional 15-min perfusion period. The ischaemic groups (protocol 5, fig 1) were subjected to 30 min of partial ischaemia (flow rate 1 ml/min) prior to a 20-min reperfusion period. In these groups, hearts were pretreated with either 0.3µM glibenclamide, 1µM chelerythrine or vehicles starting after the 20-min stabilisation period, in order to expose the hearts to 15 min antagonist perfusion before the exposure to PGE<sub>2</sub>. The antagonist perfusion lasted throughout the 30-min low-flow ischaemic period, and was stopped upon reperfusion. PGE<sub>2</sub> was perfused for 5 min, fifteen minutes before the 30 min low-flow ischaemia. The sham groups (protocol 4, fig 1) were not exposed to ischaemia-reperfusion, but to a time-matched normal perfusion. After these periods, coronary arteries were precontracted with 0.1µM U-46619 administered throughout the end of the experiment. 15 min after the beginning of U-46619 infusion, the endothelial function was evaluated by the vasodilatation produced by 10µM serotonin (5-HT), whereas coronary smooth muscle function was evaluated with 3µM sodium nitroprusside (SNP).

*6-Keto PGF<sub>1α</sub> and PGE<sub>2</sub> determination in coronary effluent*

Coronary effluent samples were collected five times for each protocol (after the 20-min stabilisation period, just before zero-flow ischaemic period, 5 min after (upon reperfusion), 29 min after the beginning of the low-flow ischaemic period, and 30 seconds after the beginning of reperfusion (fig 1). Samples for measurement of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) release were kept at room temperature for 15 min to ensure a complete hydrolysis of PGI<sub>2</sub> into its stable metabolite, 6-Keto PGF<sub>1α</sub>. All the samples were then stored at -20°C until analysis. The concentration of 6-Keto PGF<sub>1α</sub> and PGE<sub>2</sub> in coronary effluent samples were



evaluated by enzymeimmunoassays (EIA) (Biotrak, Amersham, Life Science, Buckinghamshire, England).

### *Statistical analysis*

Values represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by a two way analysis of variance with Scheffe post-hoc test. In the presence of an interaction between the different groups, one way analysis of variance were used for each group. A commercially available software (Systat for Windows version 6.1) was used. Only probability values (p) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

### *Drugs*

Drugs were obtained from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ont, Canada). Indomethacin (1mM) was prepared in 600 $\mu$ l 100 % dimethylsulphoxide (DMSO) and 30 ml of Krebs-Heinseleit buffer. Chelerythrine (5mM) was dissolved in bidistilled water. A stock solution of glibenclamide (10mM) was prepared in 100% DMSO. Stock solution of PGE<sub>2</sub> (2.84mM) was prepared in 100% ethanol. All these stock solutions were diluted in Krebs-Henseleit buffer to obtain the desired final concentrations. U-46619 (9,11-dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethano-prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> , 28.5 mM) was dissolved in 100% ethanol and diluted in Krebs-Henseleit buffer to obtain the desired final concentration. Ethanol (0.003%) and DMSO (0.02%), at the concentration obtained in the final dilution, had no effect on any of the haemodynamic variables studied and on the dilator responses to 5-HT and SNP. All the other drugs were dissolved directly in Krebs-Henseleit buffer.

## 5.4 RESULTS

### *Ischaemic preconditioning groups*

#### *VASCULAR FUNCTION*

##### *Untreated groups*

Coronary resistance measured just before 0.1  $\mu$ M U-46619 perfusion (n=25) was  $5.94 \pm 0.29$  mmHg min ml<sup>-1</sup>, for a coronary flow rate of  $6.70 \pm 0.20$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $1.90 \pm 0.05$  g). Infusion of U-46619 (0.1  $\mu$ M, n=25) induced a significant (p<0.05) vasoconstriction in all groups of hearts (sham, ischaemia, and IPC). Perfusion of 10  $\mu$ M 5-HT produced a decrease in coronary resistance of  $-25.2 \pm 3.3\%$  in sham heart (n=8). 30 min of low-flow ischaemia (n=8) significantly diminished the 5-HT-induced vasodilatation by more than half (fig 2A). One period of IPC (n=9) prevented the deleterious effect of ischaemia on endothelium-dependent vasodilatation: the vasodilatation produced by 5-HT in preconditioned hearts was comparable to that observed in hearts not subjected to ischaemia (fig 2A). Endothelium-independent vasodilatation to 3  $\mu$ M SNP was not affected by ischaemia and was found to be comparable in the three groups of hearts (sham, ischaemia, and IPC, fig 2B).

##### *Indomethacin-treated groups*

Inhibition of COX-1 with indomethacin (10  $\mu$ M) produced no significant change in coronary resistance when measured just before 0.1  $\mu$ M U-46619 perfusion ( $6.50 \pm 0.50$ , n=19 vs  $5.94 \pm 0.29$  mmHg min ml<sup>-1</sup>, n=25 in untreated hearts, p>0.05). The perfusion rate was  $5.53 \pm 0.30$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $2.23 \pm 0.07$  g). Infusion of U-46619 (0.1  $\mu$ M, n=19) induced a significant (p<0.05) vasoconstriction in all indomethacin-treated groups (coronary resistance

of  $10.27 \pm 0.67$  mmHg min ml<sup>-1</sup>,  $10.75 \pm 0.85$  mmHg min ml<sup>-1</sup>, and  $10.87 \pm 1.38$  mmHg min ml<sup>-1</sup> in sham (n=7), ischaemic (n=8), and IPC (n=4) group respectively). Vasodilatation produced by 10 μM 5-HT ( $-33.7 \pm 2.7\%$  in sham hearts, n=7) was almost totally abolished in the ischaemic group (n=8) (fig 2C). IPC in indomethacin-treated hearts (n=4) was unable to prevent the deleterious effect of ischaemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 2C). Vasodilatation to 3μM SNP was comparable in the three indomethacin-treated groups (sham, ischaemic, and IPC, fig 2D).

#### *Glibenclamide-treated groups*

Blockade of K<sub>ATP</sub> channels with glibenclamide (0.3μM) (n=24) was accompanied by a significant increase in coronary resistance when measured just before 0.1μM U-46619 perfusion (glibenclamide-treated ( $8.89 \pm 0.49$  mmHg min ml<sup>-1</sup>) vs untreated hearts ( $5.94 \pm 0.29$  mmHg min ml<sup>-1</sup>,  $p < 0.05$ )). The perfusion rate was  $5.30 \pm 0.13$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $1.94 \pm 0.04$  g). Infusion of U-46619 (0.1μM, n=24) induced a significant ( $p < 0.05$ ) vasoconstriction in glibenclamide-treated group ( $13.62 \pm 0.75$  mmHg min ml<sup>-1</sup>). Vasodilatation produced by 10 μM 5-HT ( $-15.6 \pm 1.6\%$  in sham hearts, n=8) was totally abolished in the ischaemic group (fig 3A). IPC in glibenclamide-treated hearts failed to prevent the deleterious effect of ischaemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 3A). Vasodilatation to 3μM SNP was comparable in the three glibenclamide-treated groups (sham, ischaemic, and IPC, fig 3B).

#### *Chelerythrine-treated groups*

Inhibition of protein kinase C with chelerythrine (1μM) produced no significant change in coronary resistance when measured just before 0.1μM U-46619 perfusion (chelerythrine-treated ( $6.87 \pm 1.48$  mmHg min ml<sup>-1</sup>) vs untreated hearts ( $5.94 \pm 0.29$  mmHg min ml<sup>-1</sup>),  $p > 0.05$ ). The perfusion rate was  $5.36 \pm 0.24$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $2.25 \pm 0.06$  g). Infusion of U-46619 (0.1μM, n=20) induced a

significant ( $p < 0.05$ ) increase of the coronary resistance ( $12.45 \pm 0.45$  mmHg min ml<sup>-1</sup>). Vasodilatation produced by  $10\mu\text{M}$  5-HT ( $-23.8 \pm 3.2\%$  in sham hearts,  $n=7$ ) was practically abolished in the ischaemic group (fig 3C). IPC in chelerythrine-treated hearts was unable to prevent the deleterious effect of ischaemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 3C). Vasodilatation to  $3\mu\text{M}$  SNP was comparable in the three chelerythrine-treated groups (sham ( $n=7$ ), ischaemic ( $n=7$ ), and IPC ( $n=6$ ), fig 3D).

### *MYOCARDIAL FUNCTION*

The inotropic characteristics of indomethacin, glibenclamide, and chelerythrine-pretreated hearts were comparable to those of untreated hearts:  $dP/dt_{\text{max}}$  values measured before the 30-min low-flow ischaemia were  $1980 \pm 449$  ( $n=25$ ),  $1613 \pm 106$  ( $n=19$ ),  $1775 \pm 119$  ( $n=24$ ), and  $1639 \pm 137$  mmHg s<sup>-1</sup> ( $n=20$ ) for untreated, indomethacin, glibenclamide, and chelerythrine-pretreated hearts, respectively. Low-flow ischaemia was accompanied by a severe reduction in  $dP/dt_{\text{max}}$  in all groups, which was followed by a complete recovery within 20 min of reperfusion (data not shown). Left ventricular systolic pressure followed the same pattern as  $dP/dt_{\text{max}}$ , with a severe reduction during ischaemia and a complete recovery upon reperfusion, whereas diastolic pressure was not significantly affected (data not shown). All parameters of myocardial function (systolic and diastolic pressure,  $dP/dt_{\text{max}}$ , and  $dP/dt_{\text{min}}$ ) at the end of the reperfusion period were comparable in all groups studied.

### *PROSTAGLANDIN MEASUREMENTS IN CORONARY EFFLUENT*

#### *6-Keto PGF<sub>1α</sub>*

Before indomethacin treatment (T20), 6-Keto PGF<sub>1α</sub> measured in the coronary effluent was  $664 \pm 56$  pM,  $n=16$  (fig.4). Treatment with indomethacin produced a significant decrease in 6-Keto PGF<sub>1α</sub> levels just before the 5min zero-flow ischaemic period (T35) and after this period (T40) ( $P < 0.05$ ). At the end of the low-flow ischaemia (T79), levels of 6-Keto PGF<sub>1α</sub> were significantly increased in

the ischaemic untreated group (n=3) and in the IPC untreated group (n=4) vs the sham untreated group (n=3) ( $P<0.05$ ). This increase in 6-Keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$  levels was significantly blocked by indomethacin (n=6) at time T79 and T80.5 ( $P<0.05$ ).

### *PGE<sub>2</sub>*

Before indomethacin treatment (T20),  $\text{PGE}_2$  in the coronary effluent amounted to  $380 \pm 31$  pM, n=21 (fig.5). Treatment with indomethacin produced a significant decrease in  $\text{PGE}_2$  levels just before the 5min zero-flow ischaemic period (T35) and after this period (T40) ( $P<0.05$ ). At T40, IPC produced a significant increase in  $\text{PGE}_2$  levels (n=4). At the end of the low-flow ischaemia (T79), levels of  $\text{PGE}_2$  were significantly increased in the ischaemic untreated group (n=3) and in the IPC untreated group (n=4) vs the sham untreated group (n=3) ( $P<0.05$ ). At T79, the increase in IPC group (n=4) was significantly higher from that of the ischaemic group (n=3) ( $P<0.05$ ). These increases in  $\text{PGE}_2$  levels were significantly blocked by indomethacin (n=6) at time T79 and T80.5 ( $P<0.05$ ).

### *Exogenous prostaglandin groups*

#### *VASCULAR FUNCTION*

Perfusion with 3nM  $\text{PGE}_2$  produced a slight but significant decrease in coronary resistance when measured five min after the beginning of its perfusion ( $7.9 \pm 4.8\%$  decrease of coronary resistance, n=12). Coronary resistance measured just before 0.1 $\mu\text{M}$  U-46619 perfusion (n=12) was  $6.83 \pm 0.67$  mmHg min ml<sup>-1</sup> and the perfusion rate in  $\text{PGE}_2$ -treated hearts was  $4.86 \pm 0.19$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $2.12 \pm 0.06$  g). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu\text{M}$ , n=12) induced a significant ( $p<0.05$ ) vasoconstriction in  $\text{PGE}_2$ -treated hearts ( $14.07 \pm 0.59$  mmHg min ml<sup>-1</sup>). 30 min of low-flow ischaemia significantly diminished the 5-HT-induced vasodilatation by more than half in untreated hearts (fig 2A). Treatment with  $\text{PGE}_2$ , starting 15 min before ischaemia and lasting only 5 min, preserved the vasodilatation produced by

10 $\mu$ M 5-HT in ischaemic hearts (fig 6A). Vasodilatation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in all PGE<sub>2</sub>-treated hearts (fig 6B). Treatment with 5 min PGE<sub>2</sub> perfusion in glibenclamide-pretreated hearts prevented the deleterious effect of ischaemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 6C). In contrast, treatment with PGE<sub>2</sub> in chelerythrine-pretreated hearts was unable to prevent the deleterious effect of ischaemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 6E). Vasodilatation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in all groups, regardless of the treatment (fig 6 B,D,F)

### *MYOCARDIAL FUNCTION*

In all groups, pretreatment with exogenous PGE<sub>2</sub> perfusion for 5min, 30-min before low-flow ischaemia, had no effect on ischaemic or post-ischaemic recovery of dP/dt<sub>max</sub>.

## **5.5 DISCUSSION**

In the present study, we have assessed the contribution of prostaglandins in the protective effect of IPC on endothelial function in the rat isolated heart. The major findings are 1) that IPC with a single short period of ischaemia prevents endothelial dysfunction produced by ischaemia-reperfusion in rat hearts partially via the release of PGE<sub>2</sub>, 2) this protection can be blocked by a pretreatment with indomethacin, and 3) 5-min PGE<sub>2</sub> perfusion starting 15 min before ischaemia mimics the beneficial effect of IPC on endothelial function in rat coronary arteries.

The rat isolated heart has, like any experimental model, its advantages and limitations. The hearts were not perfused during the few seconds it took to mount them on the perfusion setup. This could theoretically produced an IPC *per se*. However, the absence of perfusion during the preparation was not severe enough to protect the endothelial function under the present experimental conditions. In addition, the isolated hearts were not perfused with blood, but with an oxygenated buffer. Although this can limit the comparison of our results to the one obtained *in*

*vivo*, this model provides a valuable tool to study the local protective mechanisms without any interference with blood-borne elements.

#### *Effect of ischaemic preconditioning on ischaemic dysfunction*

In the present study, the ischaemic conditions (flow rate and duration) were selected in order to observe a selective endothelial dysfunction. This was confirmed by the fact that the endothelium-dependent and NO-mediated (319) vasodilatation of coronary arteries to 5-HT was drastically decreased after ischaemia-reperfusion insult, whereas the same vessels retained the ability to dilate to SNP, an endothelium-independent vasodilator. We have reported earlier (334) that IPC could prevent the reduction in the vasodilatation to 5-HT after ischaemia-reperfusion, suggesting that ischaemic preconditioning could protect endothelial function in coronary arteries. Such a protection was observed in the present study. A protective effect of IPC was also observed with canine epicardial coronary arteries (57), and in rat isolated left coronary arteries *in vitro* (145).

#### *Role of prostaglandins in ischaemic preconditioning*

Prostaglandins have been reported to be endogenous mediators of the protection afforded by IPC (220;221). Some investigators have reported that a COX inhibitor, meclofenamate, prevented the protective effect of IPC on arrhythmias in dogs *in vivo* (220). Another group demonstrated that aspirin could abolish the antiarrhythmic effect of IPC against reperfusion tachyarrhythmias in isolated rat hearts (221). However, to the best of our knowledge, little is known about the role played by endogenous prostaglandins in the endothelial protective effect of IPC. Therefore, we tested, using indomethacin, whether prostaglandins were involved in the protection afforded by IPC to the endothelium. In the indomethacin-treated and preconditioned group, the vasodilatation to 5-HT was almost totally abolished whereas the vasodilatation to SNP was not significantly different from that observed

in the sham group. These data suggest that endogenously produced cyclooxygenase metabolites play a role in the endothelial protection afforded by IPC.

In the untreated group, low-flow ischaemia was accompanied by an important increase in 6-Keto PGF<sub>1α</sub> and PGE<sub>2</sub> levels measured in the coronary effluent. However, only PGE<sub>2</sub> levels increased during IPC and its accumulation at the end of the low-flow ischaemia in the preconditioned group was significantly higher than that observed in the non-preconditioned ischaemic group. Pretreatment with indomethacin 15 min before and during ischaemia, blocked these increases in prostaglandin levels and abolished the protective effect of IPC. Therefore, these data suggest that increased PGE<sub>2</sub> concentration during IPC and low-flow ischaemia is one of the mechanisms involved in the endothelial protection induced by IPC. This however contrasts with the finding of Arad *et al.* (221) who reported that IPC was associated with an increased release of prostacyclin prior to reperfusion in the isolated hearts. The reason for this discrepancy remains unclear.

A few years ago, we reported that PGE<sub>2</sub> could activate ATP-sensitive potassium (K<sub>ATP</sub>) channels (353). In the myocardium, activation of K<sub>ATP</sub> channels has been linked to cardioprotection, possibly through a reduction in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels (323), prevention of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload or preservation of the myocardial energy status (325;326). In endothelial cells, activation of K<sub>ATP</sub> channels produces hyperpolarisation, which increases the electrochemical gradient for Ca<sup>2+</sup> entry (327;328), resulting in an enhanced nitric oxide release(329).

PGE<sub>2</sub> can also act on EP<sub>2</sub> receptors, stimulating the production of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inducing vasodilatation (357). Alternatively, EP<sub>1</sub> receptors activate phospholipase C to release inositol 1,4,5-trisphosphate and 1,2-diacylglycerol (357). The latter compound in combination with intracellular calcium then causes the translocation and activation of protein kinase C (PKC) (358). Activated PKC may phosphorylate secondary effectors, which would be responsible for the protective effects of PGE<sub>2</sub>. PKC activation have been



implicated in the mechanisms of the protection afforded to the myocardium by IPC (260;271).

Therefore, we tested, using glibenclamide, a  $K_{ATP}$  channels blocker, and chelerythrine, a PKC inhibitor, whether these were involved in the protection afforded by IPC, as well as exogenous  $PGE_2$ , to the endothelium under our experimental conditions.

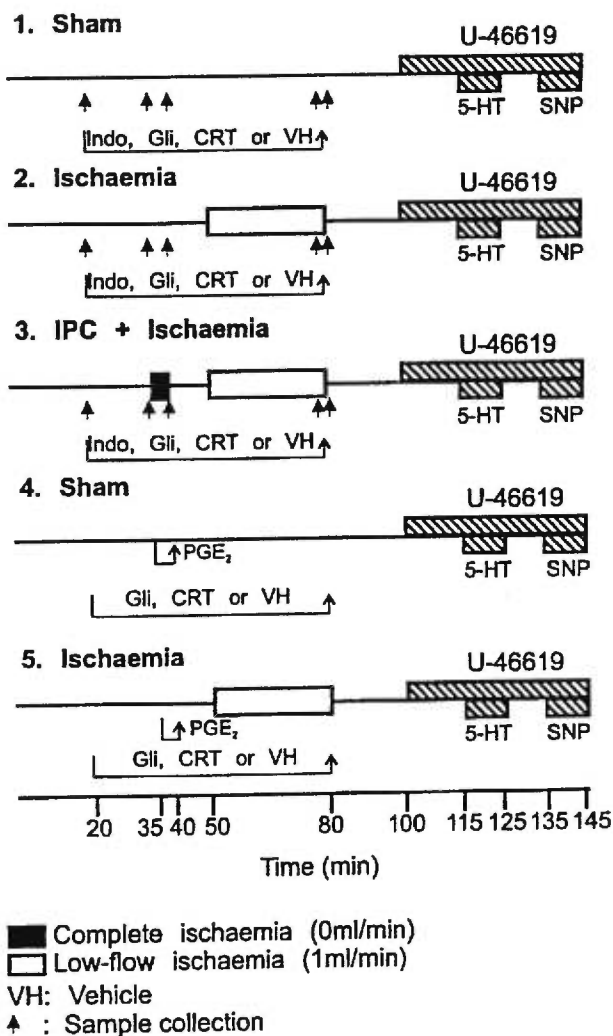
In the glibenclamide-treated groups, the protective effect of IPC on endothelial function was diminished by more than half, as reflected by the reduction of endothelium-dependent vasodilatation to 5-HT in the preconditioned group, compared to the glibenclamide-treated sham group. Likewise, in the chelerythrine-treated groups, the protective effect of IPC on endothelial function was halved, as reflected by the reduction of endothelium-dependent vasodilatation to 5-HT in the preconditioning group, compared to the chelerythrine-treated sham group. The vasodilatation to SNP was not affected by these treatments. These data suggest that both  $K_{ATP}$  channels and PKC activation are involved in the protection afforded by IPC against endothelial dysfunction observed with ischaemia-reperfusion. Interestingly, ischaemia appeared to be more deleterious for the endothelium in the presence of glibenclamide and, to a lesser extent, chelerythrine. This suggests that  $K_{ATP}$  channels and PKC play a protective role even in the absence of IPC, the latter having an enhancing effect on these protective mechanisms.

#### *Protective effect of exogenous $PGE_2$*

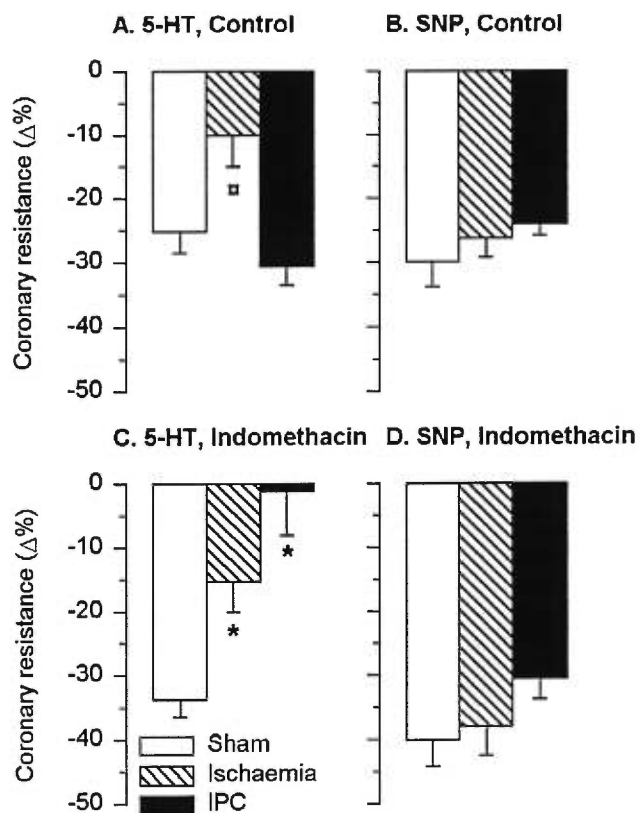
To confirm the contribution of  $PGE_2$  in the endothelial protection afforded by IPC, the effect of exogenous perfusion with a low concentration of  $PGE_2$  on the endothelial function following ischaemia-reperfusion was studied.  $PGE_2$  perfused for 5 min, 15 min before ischaemia prevented the ischaemia-induced reduction in the vasodilatation to 5-HT. Pretreatment with chelerythrine, but not with glibenclamide,

perfused 15 min before and during low-flow ischaemia, abolished the protective effect of PGE<sub>2</sub> on 5-HT vasodilatation. Thus, these data suggest that PGE<sub>2</sub> can mimic the protective effect of IPC on the endothelial function via the activation of PKC. Under our experimental conditions, K<sub>ATP</sub> channels seem not to be implicated in this protection. This implies that other mechanisms or autacoids, like adenosine, are responsible for K<sub>ATP</sub> channel activation by IPC.

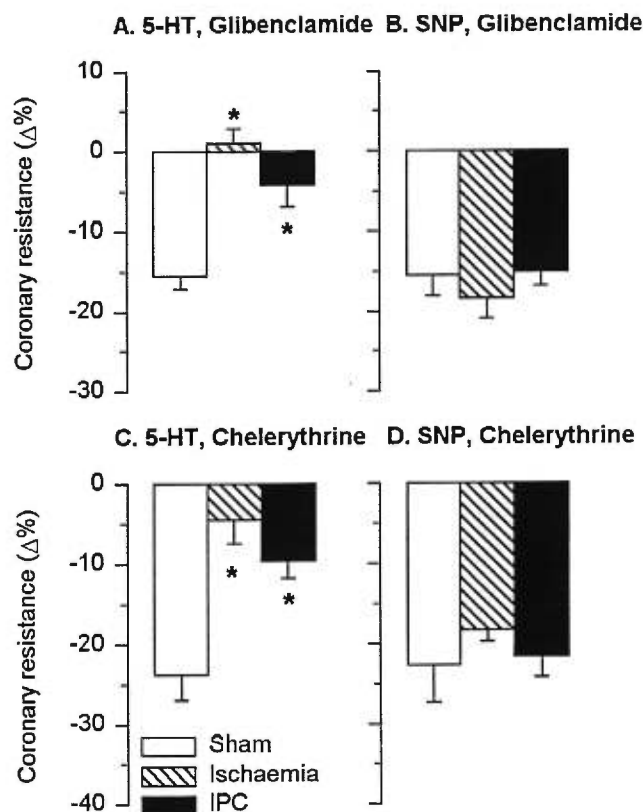
In conclusion, these data suggest that IPC affords protection to the endothelial function against subsequent ischaemic injury in the intact coronary circulation of the rat. The reduced protective effect of IPC in presence of indomethacin and the increase of PGE<sub>2</sub> levels during IPC suggest that this protection may be mediated partially via the production of PGE<sub>2</sub>. Exogenous perfusion of PGE<sub>2</sub> can afford protection to the endothelial function against the deleterious effect of ischaemia-reperfusion via an activation of protein kinase C.



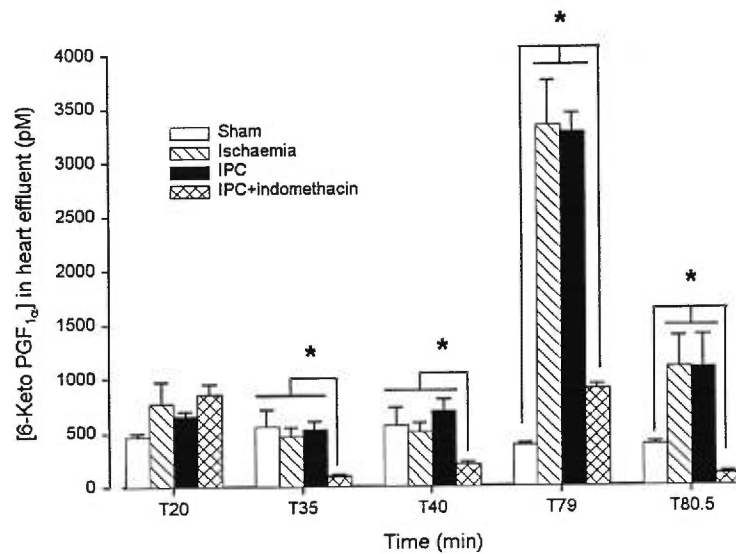
**Figure 5.1:** Diagrams showing the different experimental protocols. Each experiment started with a 20-min stabilisation period. Hearts in the ischaemia protocol (no. 2 & 5) underwent 30 min of low-flow ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) ischaemia and 20 min of reperfusion, after an additional 30-min stabilisation period. Hearts in the ischaemic preconditioning + ischaemia protocol (no. 3) were submitted to a preconditioning 5 min zero-flow ischaemia and 10 min reperfusion, before the 30-min low-flow ischaemia. Perfusion of drugs (indomethacin  $10 \mu\text{M}$  (no.1,2 & 3), glibenclamide  $0.3 \mu\text{M}$  (no.1-5), chelerythrine  $1 \mu\text{M}$  (no.1-5) or their respective vehicles (all protocols)) was started after the 20-min stabilisation period, lasted throughout the 30-min low-flow ischaemia or a corresponding period, and was stopped upon reperfusion. 5 min perfusion of prostaglandin  $\text{E}_2$   $3 \text{ nM}$  (no.4 & 5) was started 15 min before the 30-min low-flow ischaemia or a corresponding period. For all protocols, endothelial and smooth muscle function was evaluated after the 20-min reperfusion period. Coronary arteries were precontracted by a continuous infusion of  $0.1 \mu\text{M}$  U-46619. After 15 min, infusion of 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ ) was started for 10 min. A wash-out period of 10 min was allowed between 5-HT and SNP ( $3 \mu\text{M}$ , 10 min) infusions. The abscissa represents the time in min.



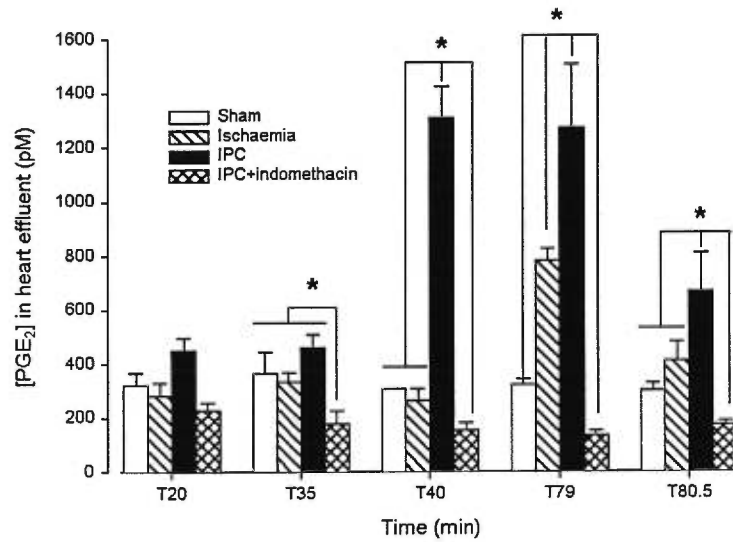
**Figure 5.2:** Change in coronary resistance ( $\Delta\%$ ) induced by 10 $\mu\text{M}$  serotonin (5-HT, panels A and C) and 3 $\mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP, panels B and D) in untreated hearts (panels A and B), and in 10 $\mu\text{M}$  indomethacin pretreated hearts (panels C and D). Open, hatched, and closed columns represent sham, ischaemic, and ischaemic preconditioning protocols, with 8, 8, and 9 untreated and 7, 8, and 4 indomethacin pretreated hearts, respectively.  $\square$   $p < 0.05$ , compared with sham and ischaemic preconditioning. \* $p < 0.05$ , compared with sham (one way ANOVA with Scheffe post-hoc test).



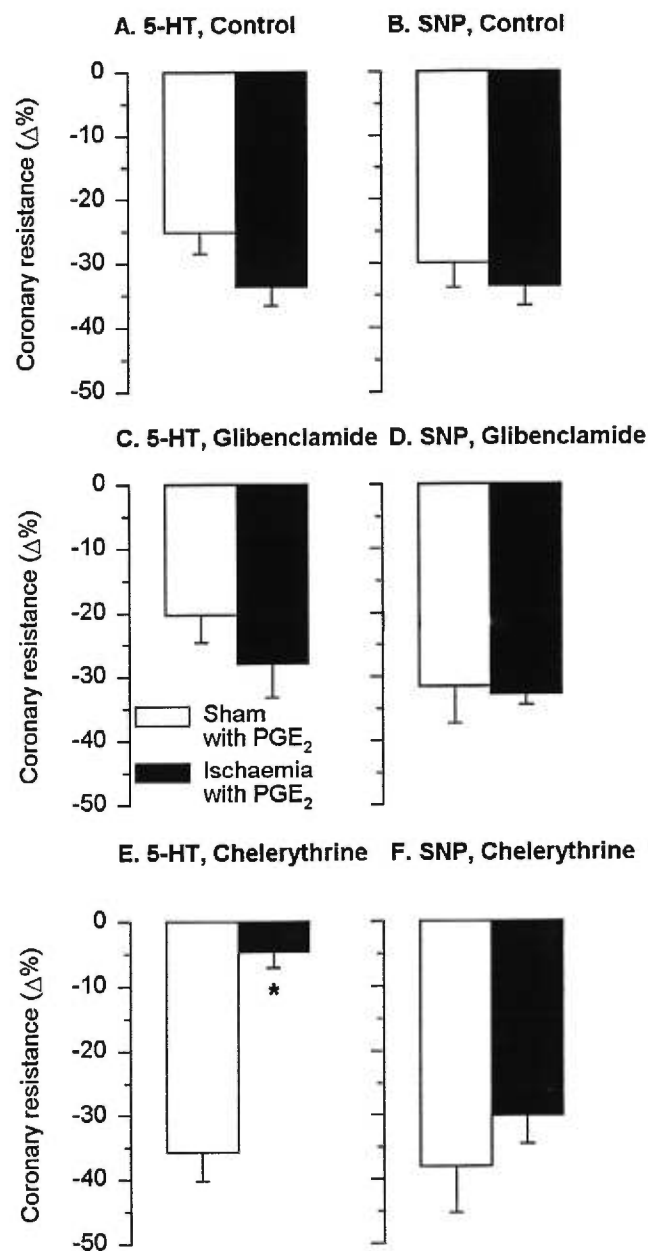
**Figure 5.3:** Change in coronary resistance ( $\Delta\%$ ) induced by  $10\mu\text{M}$  serotonin (5-HT, panels A and C) and  $3\mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP, B and D) in  $0.3\mu\text{M}$  glibenclamide pretreated hearts (A and B), and in  $1\mu\text{M}$  chelerythrine pretreated hearts (panels C and D). Open, hatched, and closed columns represent sham, ischaemia, and ischaemic preconditioning protocols, with 8, 8, and 8 glibenclamide, and 7, 7, and 6 chelerythrine pretreated hearts, respectively. \*  $p < 0.05$ , compared with sham. (one way ANOVA with Scheffe post-hoc test).



**Figure 5.4:** Coronary effluent concentration of 6-Keto PGF<sub>1α</sub> (pM) after stabilisation period (T20), at the beginning of the 5-min zero-flow ischaemia (T35), 10 min before low-flow ischaemia (T40), at the end of the low-flow ischaemia (T79) and 30 sec after the beginning of reperfusion (T80.5). \*p<0.05 compared with the indicated group(s) two way ANOVA with Scheffe post-hoc test.



**Figure 5.5:** Coronary effluent concentration of PGE<sub>2</sub> (pM) after stabilisation period (T20), at the beginning of the 5-min zero-flow ischaemia (T35), 10 min before low-flow ischaemia (T40), at the end of the low-flow ischaemia (T79) and 30 sec after the beginning of reperfusion (T80.5). \*p<0.05 compared with the indicated group(s) (two way ANOVA with Scheffe post-hoc test).



**Figure 5.6:** Change in coronary resistance ( $\Delta\%$ ) induced by  $10\mu\text{M}$  serotonin (5-HT, panels A, C, and E) and  $3\mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP, panels B, D, and F) in untreated hearts (panels A and B), in glibenclamide pretreated hearts (panels C and D), and in chelerythrine pretreated hearts (panels E and F). Open and closed columns represent sham with  $3\text{nM}$   $PGE_2$  and ischaemia with  $PGE_2$  protocols, with 6 and 6 untreated, 8 and 8 glibenclamide, and 8 and 8 chelerythrine pretreated hearts, respectively. \* $p < 0.05$ , compared with sham (two way ANOVA).



CHAPITRE SIX: ISCHEMIC PRECONDITIONING IN ISOLATED RAT HEART IS MEDIATED  
BY ENDOGENOUS CANNABINOIDS.

### 6.1 ABSTRACT

*Background:* Our laboratory has previously shown that endogenously produced mediators such as adenosine, des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin, and prostaglandin E<sub>2</sub> are involved in the protective effect of ischemic preconditioning (IPC) on the coronary endothelial function. The purpose of the present study was to assess whether the protective effect of IPC on endothelial function in coronary arteries of the rat also involves endogenously produced cannabinoids. *Methods and results:* Isolated rat hearts were exposed to a 30-min low flow ischemia followed by 20-min reperfusion, after which the response to the endothelium-dependent vasodilator, serotonin (5-HT), was compared with that of the endothelium-independent vasodilator, sodium nitroprusside (SNP). In untreated hearts, ischemia-reperfusion diminished selectively 5-HT-induced vasodilatation, compared with time-matched sham hearts, the vasodilatation to SNP being unaffected. IPC in untreated hearts preserved the vasodilatation produced by 5-HT. Blockade of CB<sub>1</sub> or CB<sub>2</sub> receptors with either (AM 630 or SR141716A) or SR144528 abolished the protective effect of IPC on the 5-HT vasodilatation. Gas-chromatography/mass-spectrometry measurements indicate the presence of palmitoylethanolamide in coronary effluent. Perfusion with either palmitoylethanolamide (PEA) or 2-arachidonylglycerol, but not anandamide, 15 min before and lasting throughout the ischemia protected the endothelium. This protection was blocked by SR144528 in both cases, whereas SR141716A only blocked the effect of PEA. *Conclusions:* Ischemic preconditioning affords protection to the endothelial function in resistance coronary arteries of the rat partially by activation of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. Exogenous cannabinoid perfusion protected the endothelium via CB<sub>1</sub> and/or CB<sub>2</sub> receptors.

## 6.2 INTRODUCTION

In recent years a great deal of interest has focused on the phenomenon of ischemic preconditioning and the mechanisms by which its potent cardioprotective effect occurs. This phenomenon described for the first time by Murry et al (90) limits infarct size (90;94), reduces the risk of ischemia-reperfusion arrhythmias (128;130), improves recovery of ventricular function (94), reduces catabolite accumulation, and slows ischemic metabolism (127;133).

In addition, it has been shown that the beneficial effect of IPC is not limited to the cardiomyocytes, but can be observed in endothelial cells in various experimental models including dog resistance coronary arteries *in vivo* (57), and coronary circulation of the rat *in vitro* (145;334). Adenosine (165;324;334), des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (359), prostaglandin E<sub>2</sub>, opioids (175), ATP-sensitive potassium channels (K<sub>ATP</sub> channels) (322;323;334), and protein kinase C (PKC) activation (260;271) have all been implicated as mechanisms of the protection afforded by IPC.

Delta<sup>9</sup>-Tetrahydrocannabinol, the psychoactive marijuana-derived cannabinoid, binds to CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors (230). The existence of these receptors implies the presence of endogenous ligands. Arachidonyléthanolamide (AEA) (231), palmitoylethanolamide (PEA) (232), and *sn*-2 arachidonylglycerol (2-AG) (233;234) are naturally-occurring constituents of the membrane of several organs that act as CB<sub>1</sub> and/or CB<sub>2</sub> agonists and exhibit pharmacological activity comparable to cannabinoids. Cannabinoids have also been shown to suppress the immune system (232;235) and may act as antioxidant agents (236). Furthermore, these compounds may have some cardiovascular properties(237;238) and the *m*ARN coding for their specific receptors has been detected in heart (239). All these properties made cannabinoids good candidates for cardioprotection.

However, for the moment, little is known about the role played by endogenous cannabinoids in the endothelial protective effect of IPC. Therefore, the first aim of

the present study was to evaluate whether IPC affords protection against ischemic injury to the endothelium of coronary vessels in isolated rat hearts via cannabinoid receptor activation. The second aim was to verify whether exogenous cannabinoid perfusion could mimic the beneficial effects of IPC against ischemic injury in these hearts.

### 6.3 METHODS

#### *Preparation of hearts*

The investigation was performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care. The detail methodology has been described earlier (334), male Sprague-Dawley rats (300-350 g) were narcotised with CO<sub>2</sub> until a complete loss of consciousness and rapidly decapitated. Hearts were rapidly excised and perfused at constant flow by means of a digital roller pump. A 20-ml compliance chamber along the perfusion line ensured a continuous flow (Langendorff perfusion). The flow rate was adjusted during the stabilisation period to obtain a coronary perfusion pressure of approximately 75 mmHg and was held constant, with the exception of the ischemic periods during which flow was either stopped (zero-flow ischemia) or reduced to 1 ml min<sup>-1</sup> (low-flow ischemia). A second adjustment of the flow rate was made at the end of the long reperfusion period, before the perfusion of U-46619, to correct any deviation of the coronary perfusion pressure from 75 mmHg, and was held constant thereafter. Perfusion pressure and flow rate were monitored to calculate coronary resistance. The perfusion solution (a modified Krebs-Henseleit buffer) contained (in mM): NaCl 118, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 24, D-glucose 5, pyruvate 2, gassed with 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4), 37 °C. All drugs were administered through a Y connector in the aortic cannula with syringe pumps.

## *Experimental protocols*

### *Ischemic preconditioning protocol*

The animals were assigned to one of three different experimental protocols (fig 1). The hearts in all groups were subjected to a 20-min stabilisation period. Drugs or vehicle infusion was then started, followed by an additional 15-min perfusion period. The ischemic groups (protocol 2, fig 1) were subjected to a 15-min sham period, followed by 30 min of partial ischemia (flow rate 1 ml/min) prior to a 20-min reperfusion period. In the preconditioned groups (protocol 3, fig 1), the hearts were exposed to 5 min global ischemia (zero flow) plus 10 min of reperfusion before the 30-min ischemia and 20-min reperfusion periods. The sham groups (protocol 1, fig 1) were not exposed to ischemia-reperfusion, but to a time-matched normal perfusion. After these periods, coronary arteries were precontracted with 0.1 $\mu$ M U-46619 administered throughout the end of the experiment. 15 min after the beginning of U-46619 infusion, the endothelial function was evaluated by the vasodilatation produced by 10 $\mu$ M serotonin (5-HT), whereas coronary smooth muscle function was evaluated with 3 $\mu$ M sodium nitroprusside (SNP). These infusions were maintained for 10 min, which was long enough to reach a steady state. A washout period of 10 min was allowed between each infusion. Vasodilatation was evaluated by computing percent changes in coronary resistance (coronary perfusion pressure divided by coronary flow), measured immediately before each drug infusion, and after a new steady state. The concentrations of 5-HT and SNP were determined in preliminary dose-response experiments to produce near-maximal vasodilatation.

Sham, ischemic, and ischemic preconditioning hearts were treated with either 1 $\mu$ M SR141716A, 3 $\mu$ M AM630, 1 $\mu$ M SR144528 or their respective vehicles starting after the 20-min stabilisation period, and lasting throughout the 30-min partial ischemic period (protocols 1-3, fig 1). Drug infusion was stopped upon reperfusion.

### *Cannabinoid perfusion protocol*

In additional experimental series, the effect of perfusions of exogenous 300nM 2-AG, 300nM PEA, 100nM-1 $\mu$ M AEA, or their respective vehicle were compared with that of ischemic preconditioning. The animals were assigned to one of two different experimental protocols (protocols 4 and 5, fig 1). The hearts in all groups were subjected to a 20-min stabilisation period. Drugs or vehicle infusion was then started, followed by an additional 15-min perfusion period. The ischemic groups (protocol 5, fig 1) were subjected to a 30 min of partial ischemia (flow rate 1 ml/min) prior to a 20-min reperfusion period. In these groups, hearts were pretreated with either 1 $\mu$ M SR141716A, 1 $\mu$ M SR144528 or vehicles starting after the 20-min stabilisation period, in order to expose the hearts to the antagonist 15 min before the exogenous cannabinoid. The antagonist perfusion lasted throughout the 30-min low-flow ischemic period, and was stopped upon reperfusion. Cannabinoids were perfused for 45 min, fifteen min before the 30 min low-flow ischemia. The sham groups (protocol 4, fig 1) were not exposed to ischemia-reperfusion, but to a time-matched normal perfusion. Endothelial and smooth muscle functions were evaluated as described above.

### *Cannabinoid determination in coronary effluent*

Coronary effluent samples (60 ml or 30 ml during 30 min low-flow ischemia) were collected four times for each protocol (after the 20-min stabilisation period, just before ischemic period, during all the ischemic period, and 30 seconds after the beginning of reperfusion). After extraction with anhydrous ethanol through a C-18 Sep-Pak light column, samples were dried using a Speed-Vac. All the samples were then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. GC/MS of the butyldimethylsilyl instead of the trimethylsilyl derivatives of anandamide, 2-AG and PEA were carried out as described(360;361).

### *Statistical analysis*

Values represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by a two way analysis of variance with Scheffé post-hoc test. In the presence of an interaction between the different groups, one way analyses of variance were used for each group. A commercially available software (Systat for Windows version 6.1) was used. Only probability values (p) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

### *Drugs*

SR144528 and SR141716A were a kind gift from Sanofi Recherche (Montpellier, France); PEA and AM630 were provided by Tocris Cookson (Ballwin, MO, USA). All other drugs were obtained from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ont, Canada). AM630 (9.9mM), was prepared in 1ml 100 % dimethylsulphoxide (DMSO) and 1 ml propylene glycol. SR144528 and SR141716A (10mM) were prepared in 1ml 100 % DMSO. All these stock solutions were diluted in bidistilled water to obtain the desired final concentrations. Anandamide (1mM) was diluted in 1ml propylene glycol and 9 ml of Krebs-Henseleit buffer. 2-AG (13.2 mM) and PEA (16.7mM) were dissolved in anhydrous ethanol and diluted in Krebs-Henseleit buffer to obtain the desired final concentration. All these stock solutions were diluted in Krebs-Henseleit buffer to obtain the desired final concentrations. U-46619 (9,11-dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethano-prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> , 28.5 mM) was dissolved in 100% ethanol and diluted in Krebs-Henseleit buffer to obtain the desired final concentration. Ethanol (0.003%) and DMSO (0.02%), at the concentration obtained in the final dilution, had no effect on any of the hemodynamic variables studied and on the dilator responses to 5-HT and SNP. All the other drugs were dissolved directly in Krebs-Henseleit buffer.

## 6.4 RESULTS

### *Ischemic preconditioning groups*

Coronary resistance measured just before 0.1 $\mu$ M U-46619 perfusion (n=25) was  $5.94 \pm 0.29$  mmHg min ml<sup>-1</sup>, for a coronary flow rate of  $6.70 \pm 0.20$  ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (mean heart weight of  $1.90 \pm 0.05$  g). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M, n=25) induced a significant (p<0.05) vasoconstriction in all groups of hearts (sham, ischemia, and IPC). Perfusion of 10 $\mu$ M 5-HT produced a decrease in coronary resistance of  $-25.2 \pm 3.3\%$  in sham hearts (n=8). 30 min of low-flow ischemia (n=8) significantly diminished the 5-HT-induced vasodilatation by more than half (fig 2A). One period of IPC (n=9) prevented the deleterious effect of ischemia on endothelium-dependent vasodilatation: the vasodilatation produced by 5-HT in preconditioned hearts was comparable to that observed in hearts not subjected to ischemia (fig 2A). Endothelium-independent vasodilatation to 3 $\mu$ M SNP was not affected by ischemia and was found to be comparable in the three groups of hearts (sham, ischemia, and IPC, fig 2B).

SR141716A (1 $\mu$ M), a selective antagonist of CB<sub>1</sub> receptors produced no significant change in coronary resistance (data not shown). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M, n=24) induced a significant (p<0.05) vasoconstriction ( $11.73 \pm 0.51$  mmHg min ml<sup>-1</sup>). Vasodilatation produced by 10  $\mu$ M 5-HT ( $-24.7 \pm 2.6\%$  in sham hearts, n=10) was markedly reduced in the ischemic group (n=8) (fig 2C). IPC in SR141716A-treated hearts (n=6) was unable to prevent the deleterious effect of ischemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 2C). Vasodilatation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in the three SR141716A-treated groups (sham, ischemic, and IPC, fig 2D).

AM630 (3 $\mu$ M), another selective antagonist of CB<sub>1</sub> receptors produced no significant change in coronary resistance (data not shown). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M, n=22) induced a significant (p<0.05) vasoconstriction ( $11.57 \pm 0.52$

mmHg min ml<sup>-1</sup>). Vasodilatation produced by 10 μM 5-HT (-25.2± 3.3% in sham hearts, n=8) was severely reduced in the ischemic group (n=8) (fig 2E). IPC in AM630-treated hearts (n=6) was unable to prevent the deleterious effect of ischemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 2E). Vasodilatation to 3μM SNP was comparable in the three AM630-treated groups (sham, ischemic, and IPC, fig 2F).

SR144528 (1μM), a selective antagonist of CB<sub>2</sub> receptors produced no significant change in coronary resistance (data not shown). Infusion of U-46619 (0.1μM, n=24) induced a significant (p<0.05) vasoconstriction (12.09± 0.63 mmHg min ml<sup>-1</sup>). Vasodilatation produced by 10 μM 5-HT (-25.0± 2.9% in sham hearts, n=9) was markedly depressed in the ischemic group (n=8) (fig 3C). IPC in SR144528-treated hearts (n=6) was unable to prevent the deleterious effect of ischemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 3C). Vasodilatation to 3μM SNP was comparable in the three SR144528-treated groups (sham, ischemic, and IPC, fig 3D).

#### *Cannabinoid measurements in coronary effluent*

After the 20-min stabilisation period, we observed in the coronary effluent the presence of AEA and PEA but not 2-AG, n=6/group (data not shown). During IPC period we still detected the presence of AEA and PEA but not 2-AG in the collected coronary effluent just after the 5min zero-flow ischemic period and after this period. During low-flow ischemia, presence of AEA and PEA was still detected.

#### *Exogenous cannabinoid groups*

Perfusion with AEA (100nM-1μM) produced no significant effect in coronary resistance when measured five min after the beginning of its perfusion (data not shown). Infusion of U-46619 (0.1μM, n=18) induced a significant (p<0.05)



vasoconstriction in AEA-treated hearts ( $13.37 \pm 1.14$  mmHg min ml<sup>-1</sup>). 30 min of low-flow ischemia significantly diminished the 5-HT-induced vasodilatation by more than half in untreated hearts (fig 4A). Treatment with AEA (100nM-1 $\mu$ M), starting 15 min before ischemia and lasting 45 min, was unable to preserve the vasodilatation produced by 10 $\mu$ M 5-HT in ischemic hearts (fig 4A). Vasodilatation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in all AEA-treated hearts (fig 4B).

Perfusion with PEA (300nM) produced no significant effect in coronary resistance when measured five min after the beginning of its perfusion (data not shown). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M, n=17) induced a significant ( $p < 0.05$ ) vasoconstriction in PEA-treated hearts ( $12.70 \pm 1.27$  mmHg min ml<sup>-1</sup>). Thirty min of low-flow ischemia significantly diminished the 5-HT-induced vasodilatation by more than half in untreated hearts (fig 4C). Treatment with PEA (300nM), starting 15 min before ischemia and lasting 45 min, preserved the vasodilatation produced by 10 $\mu$ M 5-HT in ischemic hearts (fig 4C). Vasodilatation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in all PEA-treated hearts (fig 4D). Treatment with PEA in SR141716A or in SR144528-pretreated hearts was unable to prevent the deleterious effect of ischemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 4C).

Perfusion with 2-AG (300nM) produced no significant effect in coronary resistance when measured five min after the beginning of its perfusion (data not shown). Infusion of U-46619 (0.1 $\mu$ M, n=18) induced a significant ( $p < 0.05$ ) vasoconstriction in 2-AG-treated hearts ( $13.65 \pm 1.47$  mmHg min ml<sup>-1</sup>). Thirty min of low-flow ischemia significantly halved the 5-HT-induced vasodilatation by more than half in untreated hearts (fig 4E). Treatment with 2-AG (300nM), starting 15 min before ischemia and lasting 45 min, preserved the vasodilatation produced by 10 $\mu$ M 5-HT in ischemic hearts (fig 4E). Vasodilatation to 3 $\mu$ M SNP was comparable in all 2-AG-treated hearts (fig 4F). Treatment with 2-AG perfusion in SR141716A-pretreated hearts still prevented the deleterious effect of ischemia on 5-HT-induced vasodilatation (fig 4E). In contrast, treatment with 2-AG in SR144528-

pretreated hearts was unable to prevent the deleterious effect of ischemia and reperfusion on 5-HT vasodilatation (fig 4E).

## 6.5 DISCUSSION

In the present study, we have assessed the contribution of cannabinoids in the protective effect of IPC on endothelial function in the rat heart. The major findings are 1) that IPC with a single short period of ischemia prevents endothelial dysfunction produced by ischemia-reperfusion in rat hearts partially via the release of cannabinoids, 2) this protection can be blocked by a pre-treatment with SR141716A, AM630 or SR144528, and 3) 45-min perfusion with 2-AG, PEA, but not AEA, starting 15 min before ischemia mimic the beneficial effect of IPC on endothelial function in rat coronary arteries. This protective effect was blocked by SR144528 and SR141716A in the case of PEA, and by SR144528 only with 2-AG perfusion

### *Effect of ischemic preconditioning on endothelial dysfunction*

In the present study, the ischemic conditions (flow rate and duration) were selected in order to observe a selective endothelial dysfunction. This was confirmed by the fact that the endothelium-dependent and NO-mediated (319) vasodilatation of coronary arteries to 5-HT was drastically decreased after ischemia-reperfusion insult, whereas the same vessels retained the ability to dilate to SNP, an endothelium-independent vasodilator. We have reported earlier (334) that IPC could prevent the reduction in the vasodilatation to 5-HT after ischemia-reperfusion, suggesting that ischemic preconditioning could protect endothelial function in coronary arteries. Such a protection was observed in the present study.

### *Role of cannabinoids in ischemic preconditioning*

Cannabinoids exert several physiological and pharmacological actions, including suppression of the immune system (232;235), antioxydative effects (236), and cardiovascular actions (237;238). However, to the best of our knowledge, nothing is known about the role played by endogenous cannabinoids in the protective effect of IPC. Therefore, we tested, using SR141716A and AM630 (selective CB<sub>1</sub> receptor antagonists), and SR144528 (selective CB<sub>2</sub> receptor antagonist), whether endogenous cannabinoids were involved in the protection afforded by IPC to the endothelium. In SR141716A, AM630, and SR144528-treated and preconditioned groups, the vasodilatation to 5-HT was almost totally abolished whereas the vasodilatation to SNP was not significantly different from that observed in the sham groups. These data suggest that endogenously produced cannabinoids play a role in the endothelial protection afforded by IPC by acting on CB<sub>1</sub> or CB<sub>2</sub> receptors.

In the untreated group, zero-flow and low-flow ischemia the presence of AEA and PEA but not 2-AG was detected in the coronary effluent. Therefore, these data suggest that the presence of endogenous cannabinoids during IPC and low-flow ischemia is one of the mechanisms involved in the endothelial protection induced by IPC. This is the first time that endogenous cannabinoids have been reported to be mediators of IPC.

### *Protective effect of exogenous cannabinoids*

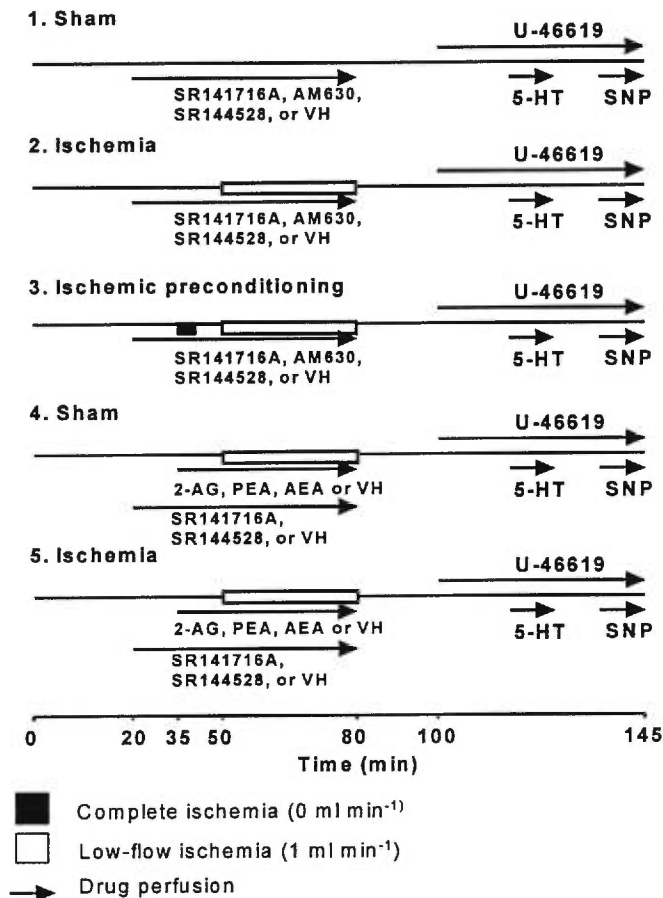
To confirm the contribution of cannabinoids in the endothelial protection afforded by IPC, the effect of exogenous perfusion with a low concentration of 2-AG, PEA, and AEA, on the endothelial function following ischemia-reperfusion was studied. 2-AG and PEA, but not AEA, perfused, 15 min before and throughout ischemia prevented the ischemia-induced reduction in the vasodilatation to 5-HT. Only the CB<sub>2</sub> receptor antagonist abolished the protective effect of 2-AG, whereas both the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor antagonists abolished that of PEA. Thus, taken together these

data suggest that 2-AG and PEA, can mimic the protective effect of IPC on the endothelial function via the activation of CB<sub>2</sub> receptors for 2-AG and PEA, and via CB<sub>1</sub> receptors for PEA. The lack of effect of AEA may be explained by the short lifespan of this compound, which undergoes rapid inactivation in tissues (362;363).

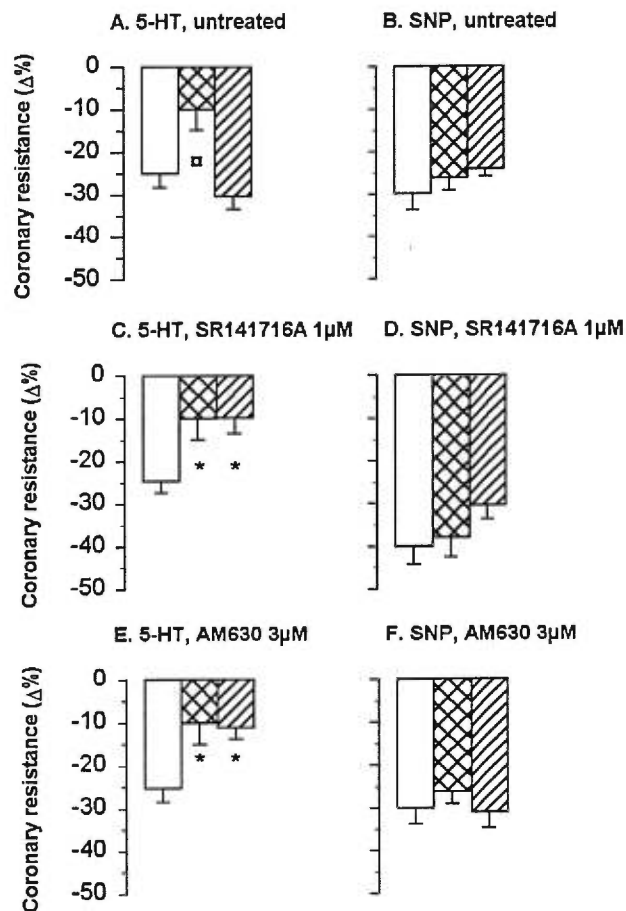
In the brain, delta 9-tetrahydrocannabinol, cannabinol, cannabidiol, and AEA increased the activity of protein kinase C (PKC) (364;365). Randall et al reported that AEA produced vasorelaxation in isolated rat hearts by an hyperpolarisation which could be blocked by non-selective potassium channel blockers (38). Also, some groups demonstrated that endogenous cannabinoids produced a concentration-related increase in the activity of the mitogen-activated protein (MAP) kinases (366;367). PKC (260;271), ATP sensitive potassium (K<sub>ATP</sub>) channels (334), MAP kinases (276) activation have been implicated in the mechanisms of the protection afforded to the myocardium by IPC. Activated PKC and MAP kinases may phosphorylate secondary effectors, which would be responsible for the protective effects of cannabinoids. In the myocardium, activation of K<sub>ATP</sub> channels has been linked to cardioprotection, possibly through a reduction in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels (323), prevention of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload or preservation of the myocardial energy status (325). In endothelial cells, activation of K<sub>ATP</sub> channels produces hyperpolarisation, which increases the electrochemical gradient for Ca<sup>2+</sup> entry (327), resulting in a enhanced nitric oxide release (329). Currently, little is known about the pathways stimulated by the activation of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors in the heart. Thus, for the moment, mechanisms proposed in this paper are only speculative, further experiments are needed to assess the pathways implicated during the activation of cannabinoid receptors.

In conclusion, these data suggest that IPC affords protection to the endothelial function against subsequent ischemic injury in the intact coronary circulation of the rat. The reduced protective effect of IPC in presence of SR141716A, AM630, and SR144528 and the presence of endogenous cannabinoids during IPC suggest,

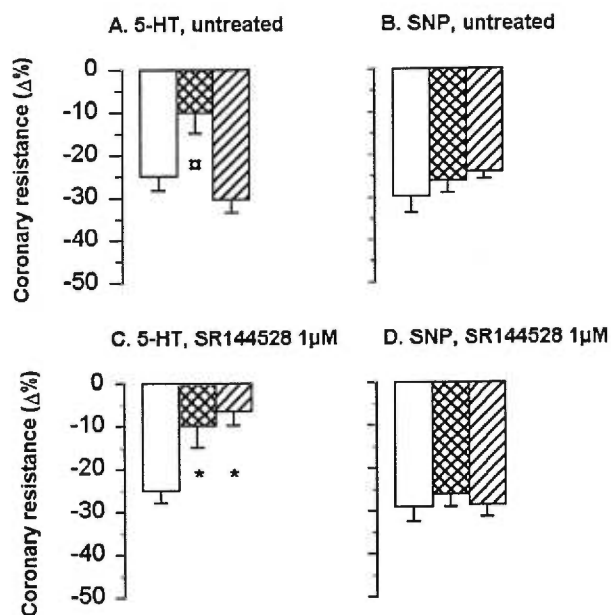
for the first time, that this protection may be mediated partially via the production of endogenous cannabinoids. Exogenous perfusion of 2-AG and PEA can afford protection to the endothelial function against the deleterious effect of ischemia-reperfusion via an activation of their specific receptors.



**Figure 6.1:** Diagrams showing the different experimental protocols. Each experiment started with a 20-min stabilisation period. Hearts in the ischemia protocol (no. 2 & 5) underwent 30 min of low-flow (1 ml min<sup>-1</sup>) ischemia and 20 min of reperfusion, after an additional 30-min stabilisation period. Hearts in the ischemic preconditioning + ischemia protocol (no. 3) were submitted to a preconditioning 5 min zero-flow ischemia and 10 min reperfusion, before the 30-min low-flow ischemia. Perfusion of drugs (SR141716A 1 $\mu$ M (no.1-5), AM630 3 $\mu$ M (no.1-3), SR144528 1 $\mu$ M (no.1-5) or their respective vehicles) was started after the 20-min stabilisation period, lasted throughout the 30-min low-flow ischemia or a corresponding period, and was stopped upon reperfusion. Perfusion of 2-arachidonylglycerol (2-AG,300nM), palmitoylethanolamide (PEA, 300nM), anandamide (AEA, 100nM-1 $\mu$ M) or their respective vehicle (no.4 & 5) was started 15 min before and lasted throughout the 30-min low-flow ischemia or a corresponding period. For all protocols, endothelial and smooth muscle function was evaluated after the 20-min reperfusion period. Coronary arteries were precontracted by a continuous infusion of 0.1 $\mu$ M U-46619. After 15 min, infusion of 5-HT (10 $\mu$ M) was started for 10 min. A wash-out period of 10 min was allowed between 5-HT and SNP (3 $\mu$ M, 10 min) infusions. The bottom axis represents the time in min.

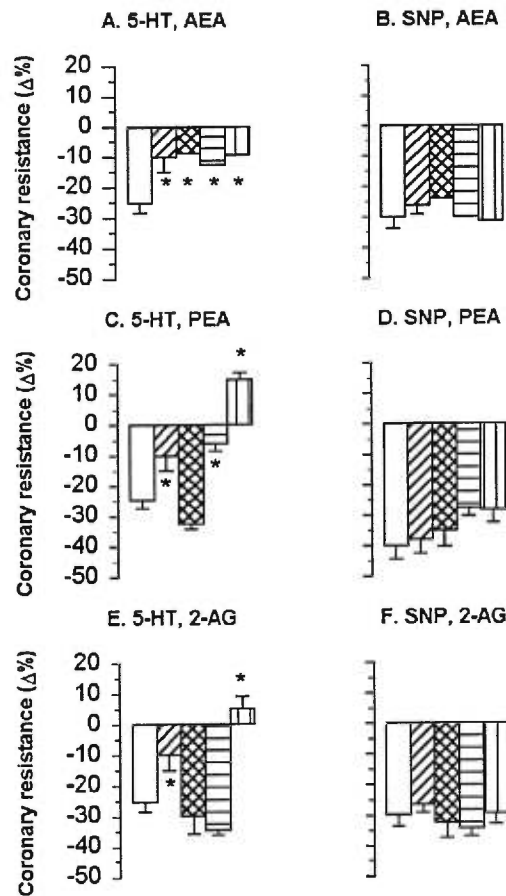


**Figure 6.2:** Change in coronary resistance ( $\Delta\%$ ) induced by  $10\mu\text{M}$  serotonin (5-HT, panels A, C, and E) and  $3\mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP, panels B, D, and F) in untreated hearts (panels A and B), in  $1\mu\text{M}$  SR141716A (panels C and D), and in  $1\mu\text{M}$  AM630 pretreated hearts (panels E and F). Open, cross-hatched, and hatched columns represent sham, ischemic, and ischemic preconditioning protocols, with 8, 8, and 9 untreated, 10, 8, 6 SR141716A and 8, 8, and 6 AM 630 pretreated hearts, respectively. □  $p < 0.05$ , compared with sham and ischemic preconditioning. \* $p < 0.05$ , compared with sham (one way ANOVA with Scheffé post-hoc test).



**Figure 6.3:** Change in coronary resistance ( $\Delta\%$ ) induced by  $10\mu\text{M}$  serotonin (5-HT, panels A and C) and  $3\mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP, panels B and D) in untreated hearts (panels A and B), and in  $1\mu\text{M}$  SR144528 pretreated hearts (panels C and D). Open, cross-hatched, and hatched columns represent sham, ischemia, and ischemic preconditioning protocols, with 8, 8, and 9 untreated, and 9, 8, and 6 SR144528 pretreated hearts, respectively.  $\square$   $p < 0.05$ , compared with sham and ischemic preconditioning. \*  $p < 0.05$ , compared with sham. (one way ANOVA with Scheffé post-hoc test).





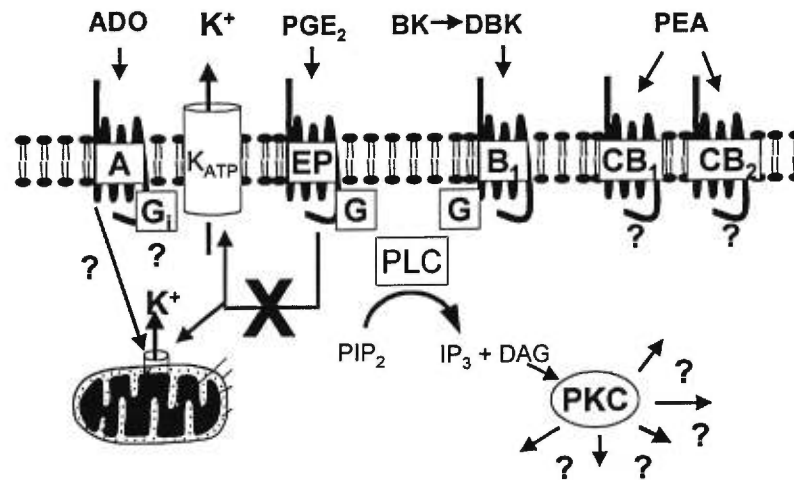
**Figure 6.4:** Change in coronary resistance ( $\Delta\%$ ) induced by  $10\mu\text{M}$  serotonin (5-HT, panels A, C, and E) and  $3\mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP, panels B, D, and F) in anandamide (AEA, panels A and B), in palmitoylethanolamide (PEA, panels C and D), and in 2-arachidonylglycerol (2-AG) pretreated hearts (panels E and F). Open, hatched, cross hatched horizontally hatched, and vertically hatched columns represent respectively in panels A and B sham, ischemia w/o AEA, ischemia with AEA 100nM, ischemia with AEA 300nM, and ischemia with AEA 1μM. In panels C and D, they represent respectively sham, ischemia w/o PEA 300nM, ischemia with PEA 300nM + SR141716A 1μM, and ischemia with PEA 300nM + SR144528. Finally, in panels E and F, they represent sham, ischemia w/o 2-AG 300nM, ischemia with 2-AG 300nM + SR141716A 1μM, and ischemia with 2-AG 300nM + SR144528 respectively. \* $p < 0.05$ , compared with sham (one way ANOVA).

## CHAPITRE SEPT : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Les résultats des travaux présentés dans cette thèse (fig 7.1) suggèrent que l'effet protecteur du PCI est reproductible au niveau de la fonction endothéliale coronaire de rat (334;359). Ces résultats ont pu également être reproduits chez les rats diabétiques mais nécessitèrent une période de PCI plus longue (368). L'activation des récepteurs à l'adénosine semble intervenir dans ce phénomène tant chez l'animal sain (334) que chez l'animal diabétique (368). D'autres médiateurs ont également été identifiés, il s'agit : de la bradykinine et de la des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine qui agissent via le récepteur B<sub>1</sub> (359), de la prostaglandine E<sub>2</sub> qui semble produire son effet via un de ses récepteurs EP et du palmitoyléthanolamide et du 2-arachidonylglycérol qui stimulent autant le récepteur CB<sub>1</sub> que le CB<sub>2</sub>. Ces travaux rapportent d'ailleurs pour la première fois l'implication de la prostaglandine E<sub>2</sub> et des cannabinoïdes endogènes dans le PCI.

Les PKCs activées lors de la stimulation des récepteurs EP aux prostaglandines ou des récepteurs B<sub>1</sub> aux kinines semblent également être impliquées dans cette réponse protectrice. Les cibles exactes phosphorylées par ces enzymes demeurent néanmoins pour l'instant, dans nos conditions expérimentales, encore inconnues (fig 7.1).

Les canaux potassiques dépendants de l'ATP semblent également contribuer au PCI lors de l'activation des récepteurs à l'adénosine (334), mais leur contribution ne semble pas obligatoire. En effet, ceux-ci ne semblent pas agir comme médiateurs de la réponse protectrice induite par l'activation des récepteurs EP aux prostaglandines (369). Pour le moment, la localisation cellulaire (mitochondriale ou membranaire) des canaux activés au cours du PCI reste à être déterminée (fig 7.1)



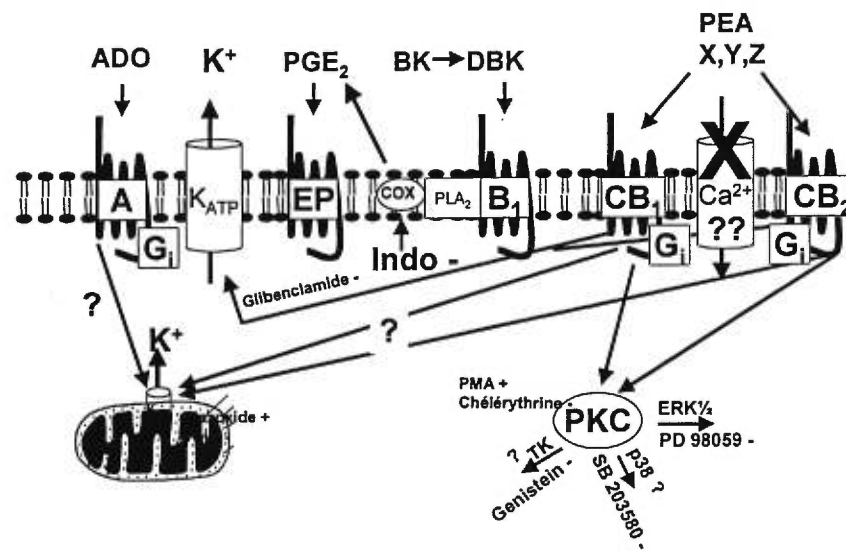
**Figure 7.1:** Mécanismes impliqués dans la protection de l'endothélium coronaire de rat induite par le preconditionnement ischémique. Résumé des travaux présentés dans cette thèse.

Comme l'effet des médiateurs impliqués dans le PCI pris chacun séparément fut discuté précédemment à l'intérieur des articles joints à cette thèse, ces résultats ne seront pas intégrés à la discussion générale par souci d'alléger la présentation. Le lecteur intéressé est donc invité à lire chacune de ces discussions.

Seront traités dans la discussion générale (fig 7.2), les interactions majeures possiblement existantes entre chacun de ces médiateurs et de ces voies de signalisation. Au cours de cette discussion, nous traiterons également de l'implication probable des canaux potassiques dépendants de l'ATP présents au niveau des mitochondries dans la protection endothéliale induite par le PCI. L'existence probable d'une interaction entre la voie des kinines et celle des prostaglandines sera également explorée. Nous aborderons aussi la possibilité de l'implication des MAPKs et des tyrosine kinases dans cette protection. Par la suite, nous tenterons de caractériser la voie des cannabinoïdes endogènes, de ses effecteurs et de ses seconds messagers probables. Seront aussi décrits dans ce chapitre, les limitations et les avantages de notre modèle. Nous terminerons en brossant un tableau des indications cliniques potentielles du PCI et de ses médiateurs.

### **7.1 Implication probable des canaux potassiques dépendants de l'ATP mitochondriaux**

Tel que mentionné au cours de l'introduction générale, il semble que les canaux potassiques dépendants de l'ATP présents sur les mitochondries soient impliqués, du moins au niveau du myocarde, dans la cardioprotection induite par le PCI (302-304). Selon toute vraisemblance, tout porte à croire qu'ils seraient également impliqués dans la préservation de la fonction endothéliale observée dans notre modèle expérimental. Il serait donc intéressant de poursuivre les recherches afin de vérifier si ce type de canal participe à cet effet protecteur dans nos conditions expérimentales. Par exemple, nous pourrions évaluer si l'acide 5-hydroxydécanoïque, un inhibiteur sélectif des canaux potassiques dépendants de



**Figure 7.2:** Interactions majeures probables entre chacun des mécanismes impliqués dans le préconditionnement ischémique au niveau de l'endothélium.

l'ATP présents sur les mitochondries, parvient à bloquer l'effet protecteur du PCI. Si oui, nous pourrions vérifier si le diazoxide, un activateur des canaux potassiques dépendants de l'ATP mitochondriaux, peut mimer l'effet protecteur produit par le PCI (fig 7.2). De cette façon, nous serions en mesure de confirmer ou d'infirmer la participation de ce type de canal à la protection de la fonction endothéliale.

Une autre avenue également intéressante serait de tester si l'effet de substances protectrices causant une hyperpolarisation cellulaire et reconnues comme étant activatrices des canaux potassiques comme : l'adénosine, la prostaglandine E<sub>2</sub> et les cannabinoïdes endogènes empruntent ce type de canaux. Jusqu'à présent, dans nos conditions expérimentales, l'effet protecteur induit par une perfusion exogène d'adénosine (334) et non par la prostaglandines E<sub>2</sub> (résultats sous presse), fut bloqué par le glibenclamide, un agent agissant préférentiellement sur les canaux potassiques dépendants de l'ATP présents à la membrane cellulaire. Cette différence d'effet s'explique peut-être par le fait que les prostaglandines E<sub>2</sub> activent une voie qui agit de façon préférentielle sur les canaux potassiques dépendants de l'ATP présent à la surface des mitochondries. Pour ce qui est de l'adénosine, c'est peut-être le contraire. De toute façon, ces hypothèses devront être vérifiées à l'aide d'antagonistes spécifiques des canaux potassiques dépendants de l'ATP mitochondriaux.

## **7.2 Interaction probable entre les kinines et de les prostaglandines**

Il fut, par le passé, démontré que l'activation du récepteur B<sub>2</sub> et possiblement celle du récepteur B<sub>1</sub> pouvaient stimuler la production de prostaglandines (370-374) et produire une cardioprotection (371;372;374). Ces résultats suggèrent donc qu'une partie de la réponse protectrice observée dans notre modèle lors de l'injection de bradykinine ou de des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine pourrait être expliquée par une augmentation de la production et de la libération des prostaglandines telle la prostaglandine E<sub>2</sub> (fig 7.2).

Cette interaction probable entre le système des kinines et celui des prostaglandines devra être testée à l'aide de notre modèle. Par exemple, nous pourrions mesurer par essais immunoenzymatiques, la concentration coronaire de prostaglandine E<sub>2</sub> suite à l'injection de bradykinine ou de des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine. Également, nous pourrions étudier si la réponse bénéfique sur la fonction endothéliale produite par la perfusion exogène de bradykinine ou de des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine peut être bloquée par un prétraitement à l'aide d'inhibiteur non sélectif des cyclooxygénases, l'indométhacine. Ces expériences nous permettraient de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les kinines peuvent jouer un rôle protecteur.

### **7.3 Participation des *Mitogen Activated Protein Kinases* et des tyrosine kinases**

Comme décrit précédemment dans l'introduction générale, les MAPKs (276;279;281) et les tyrosine kinases (276-278) semblent participer à la cardioprotection induite par le PCI. Pour l'instant, leur implication à la protection de la fonction endothéliale n'a pas encore été démontrée. Il serait intéressant d'étudier ces voies de signalisation dans notre modèle expérimental. Nous pourrions prétraiter nos cœurs à l'aide de PD98059 ou de SB203580, des inhibiteurs respectifs de la ERK1/2 et de la p38, et observer l'effet de ces inhibiteurs sur la protection de la réponse endothéliale induite par le PCI. Ces protocoles expérimentaux nous permettraient d'apprendre quel est le rôle des MAPKs dans ce phénomène protecteur (Fig 7.2)

La contribution des tyrosine kinases à l'effet bénéfique que possède le PCI sur la fonction endothéliale pourrait être évaluée à l'aide d'un inhibiteur des tyrosine kinases, la génistéine. En effet, le prétraitement des cœurs à l'aide de génistéine pourrait nous donner plus d'informations sur l'implication des tyrosine kinases dans le PCI (fig 7.2).

Il fut rapporté dans la littérature qu'il existait une interaction entre les PKCs et la voie MAPK ERK1/2. En effet, il fut démontré que les PKCs pouvaient phosphoryler la kinase raf-1, qui à son tour pouvait activer la voie de la ERK1/2 (276). Cette constatation ouvre toute grande la porte à l'étude de cette interaction dans notre modèle. Dans cette étude, un activateur des PKCs, le PMA serait utilisé afin d'induire une protection de la fonction endothéliale contre les effets délétères de l'ischémie et de la reperfusion. Nous avons, par le passé, observé qu'une telle manœuvre pouvait mimer les effets protecteurs du PCI (données non publiées). Dans un autre groupe expérimental, certains cœurs seraient prétraités à l'aide du PD98059 avant l'injection de PMA afin d'observer si la voie de la ERK1/2 est en aval de la voie de PKCs tel que décrit dans la littérature. Dans la même foulée, nous pourrions vérifier si une telle interaction existe entre les PKCs et les autres voies MAPKs (fig 7.2).

Un autre mystère reste à élucider. Quelles sont les cibles phosphorylées par ces différentes protéine kinases? Quelques chercheurs ont proposé que ces kinases pourraient phosphoryler certaines protéines de canaux ioniques ou d'enzymes. Mais pour le moment, dans notre modèle de protection endothéliale, ceci reste inconnu.

#### **7.4 Mécanismes impliqués lors de l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes**

Compte tenu que nous sommes les tous premiers à démontrer que les cannabinoïdes endogènes participent au PCI, peu des choses sont connues en ce moment et beaucoup reste encore à faire. Comme les mécanismes impliqués dans les réponses cardiovasculaires sont encore inconnus, il faudra pour émettre des hypothèses, partir de ce qui est connu dans d'autres organes. Jusqu'à maintenant, les effets des cannabinoïdes tant endogènes qu'exogènes et les mécanismes par



lesquels ils produisent leurs effets furent surtout étudiés au niveau du système nerveux central.

Dans ce système, les cannabinoïdes produisent leurs effets via une myriade de mécanismes. Parmi ceux-ci, certains, à condition d'être reproductibles au niveau du cœur, pourraient participer à la cardioprotection. Par exemple, il fut rapporté que l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes via une protéine Gi pouvait diminuer l'influx calcique dans le neurone (375;376). Tel que démontré dans l'introduction générale, cette diminution de l'entrée de calcium dans la cellule pourrait protéger la cellule contre une accumulation calcique et de cette façon, accroître ses chances de survie. Mais cette hypothèse reste encore à être démontrée dans notre modèle (fig 7.2).

Par ailleurs, l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes augmente l'efflux de potassium à travers les canaux potassiques dans des neurones transfectés (377;378). L'activation de ces canaux cause une hyperpolarisation de celle-ci, ce qui diminue l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage et conséquemment diminue l'entrée de calcium dans les cellules. Cette autre hypothèse reste également à être confirmée dans notre modèle (fig 7.2).

De même, il fut rapporté que l'anandamide, un cannabinoïde endogène, pouvait entraîner l'activation de la voie des MAPKs dans des cellules pulmonaires (366) et dans des neurones (367;379). Il reste maintenant à vérifier si cette activation des MAPKs est impliquée dans la protection induite par les agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes (fig 7.2).

Pour ce qui est de la voie des PKCs, des résultats partiels semblent indiquer sa participation dans la prévention des effets délétères induits par l'activation du récepteur CB<sub>2</sub>. En fait, l'effet protecteur produit par la perfusion de PEA, un agent reconnu dans notre modèle comme induisant une protection via le récepteur

CB<sub>2</sub>, fut bloqué par un prétraitement à l'aide d'un inhibiteur des PKCs, la chélérythrine (données non publiées).

Également, dans le système nerveux central, l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes semble augmenter la production d'acide arachidonique (380;381). Ces résultats laissent entrevoir une certaine relation entre la voie des cannabinoïdes et celle de l'acide arachidonique et des prostaglandines. Mais ceci reste à confirmer dans notre modèle expérimental.

### **7.5 Limitations du modèle de cœur isolé dans le préconditionnement ischémique**

Les résultats obtenus à l'aide de modèles expérimentaux doivent toujours être interprétés avec précaution et ne doivent être considérés que comme des reflets de la réalité. Au cours de cette thèse, nous avons utilisé un modèle de cœur de rat isolé perfusé à débit constant selon Langendorff afin d'étudier les fonctions contractile et endothéliale en réponse à l'ischémie et à la reperfusion. Dans ce modèle, nous avons effectué une ischémie globale rendant tout le myocarde et le lit coronaire ischémiques, ce qui diffère de la ligature coronaire où l'ischémie se limite à une partie de l'arbre coronaire ressemblant beaucoup plus à une ischémie causée par un thrombus ou par une embolie.

Une autre limitation de notre modèle provient du fait que le cœur est perfusé non pas avec du sang, mais avec un tampon Krebs Henseleit. Bien que ce modèle nous ait permis d'étudier directement l'effet du PCI sur la fonction endothéliale et sur le myocarde, plusieurs aspects de ce modèle ne reflètent pas la situation présente *in vivo*. En fait, comme le cœur est perfusé à l'aide de tampon et non pas avec du sang, l'effet de celui-ci, qu'il soit protecteur (antioxydants, vasodilatateurs, facteurs hyperpolarisants, etc) ou délétère (neutrophiles, vasoconstricteurs, agents pro-aggrégants, etc), ne fut pas évalué. Mais si l'on se fie aux autres paramètres étudiés par le passé, les résultats obtenus à l'aide du

modèle de cœur de rat isolé concordent assez bien avec ceux obtenus *in vivo*. La perte de la pression oncotique constitue une autre limitation entraînée par la perfusion du cœur à l'aide de tampon physiologique. En effet, un cœur installé sur notre modèle se dégrade au fil des heures, développe de l'œdème ce qui limite la durée des protocoles expérimentaux. C'est dans le but de limiter la durée de nos protocoles expérimentaux que nous avons opté pour une seule concentration de sérotonine et de nitroprussiate de sodium.

Une autre limitation importante de notre modèle est que nous avons indirectement évalué la survie des cellules endothéliales. Donc, nous avons été en mesure d'évaluer uniquement leur réponse à un vasodilatateur dépendant de l'endothélium, la sérotonine. D'autres vasodilatateurs dépendants de l'endothélium comme par exemple l'acétylcholine ont été testés au cours d'expériences préliminaires, mais dans nos conditions expérimentales, seule la sérotonine produisit une vasodilatation suffisante pour être utilisée comme index de la fonction endothéliale. Malheureusement, cette méthode ne nous permet pas d'évaluer directement l'intégrité de la fonction endothéliale, elle vérifie uniquement la capacité de l'endothélium à libérer certains facteurs vasodilatateurs tels le NO, certaines prostaglandines et les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium. Et donc le fait de normaliser cette libération n'implique pas que toutes les fonctions endothéliales soient normalisées. Aucune méthode d'observation directe comme par exemple la microscopie électronique ne fut utilisée.

Également, nos observations proviennent grandement de mesures indirectes prises à l'aide d'agonistes et d'antagonistes. Dans cette thèse, nous n'avons pas, par exemple, mesuré directement l'activité électrique des canaux potassiques à l'aide de *patch clamp*. De même, nous n'avons pas évalué directement l'activité et la translocation des PKCs, limitant un peu l'interprétation de nos résultats.

Ce modèle ne possède pas que des limitations, il a également des avantages. Par exemple, il permet de mesurer facilement les substances produites par le cœur simplement en recueillant l'effluent coronaire.

### **7.6 Application clinique du préconditionnement ischémique et de ses mécanismes.**

Comme rapporté au cours de l'introduction, une stratégie de vascularisation précoce demeure le moyen le plus efficace de limiter les dommages associés à l'ischémie cardiaque. L'intervalle de temps compris entre le début des symptômes et la revascularisation devient donc extrêmement crucial et les bénéfices du traitement diminuent plus cet intervalle augmente. Le PCI ou ses différents médiateurs, en retardant le processus de nécrose, prolongent la fenêtre temporelle durant laquelle la revascularisation peut être initiée avec succès.

Une question se pose maintenant à nous, le PCI est-il seulement une curiosité scientifique ou fera-t-il partie intégrante de l'arsenal thérapeutique moderne?

### **7.7 Préconditionnement du cœur humain**

Lorsque l'on pense à l'utilisation du PCI comme agent thérapeutique, deux questions logiques et intimement liées nous viennent à l'esprit. Est-ce que le PCI est reproductible chez l'humain et si oui, peut-il être utilisé à grande échelle comme stratégie thérapeutique dans le traitement aigu et la prévention des maladies ischémiques cardiaques?

#### **7.7.1 Première évidence : l'angioplastie**

Le premier indice qu'une ou plusieurs brèves ischémies pouvaient protéger le cœur contre des dommages ischémiques subséquents provient de l'observation des paramètres électrocardiographiques et métaboliques en réponse à une série de

gonflement de ballonnet lors d'angioplastie coronaire (382-384). Par exemple, en 1990, Deutsch et coll (382) observèrent une réduction dans la production de lactate ainsi qu'une atténuation de la douleur angineuse chez les patients ayant préalablement été exposés à une série de gonflements du ballonnet avant le gonflement final utilisé pour produire l'angioplastie. Ces constatations impliquant une adaptation peuvent être expliquées par une tolérance accrue à l'ischémie. Les études subséquentes démontrèrent que cette adaptation à l'ischémie pouvait être reproduite par la perfusion intracoronaire d'adénosine (195) ou de dipyridamole (385). D'autres chercheurs observèrent que la réponse protectrice pouvait être bloquée soit par l'administration d'antagonistes des récepteurs A<sub>1</sub> à l'adénosine (386;387), soit par la perfusion de bloquants des canaux potassiques dépendants de l'ATP (107).

Il est encourageant de constater que ces résultats *in vivo* chez l'humain concordent bien avec ceux obtenus à l'aide de divers modèles expérimentaux.

### 7.7.2 L'angine , une adaptation « physiologique » à l'ischémie

Si une courte période d'ischémie peut protéger le cœur contre une période d'ischémie subséquente, on peut donc proposer un intéressant paradoxe, celui selon lequel l'angine pourrait être cardioprotective chez des patients souffrant de maladies coronaires. D'ailleurs, un phénomène anecdotique vient soutenir ce concept qui peut paraître à prime abord farfelu. Depuis longtemps, on sait que l'on peut soulager les symptômes douloureux d'une crise d'angine induite par l'exercice par un autre exercice subséquent. Ce phénomène porte le nom de *walk-through* ou de *warm-up angina* (388-390). À cette effet, un groupe rapporta que dans un protocole où l'on étudiait l'effet de deux périodes d'exercice entrecoupées par 15 minutes de repos, la durée de l'exercice fut prolongée et les modifications à l'électrocardiogramme atténuées lors de la seconde période. Ce qui semble démontrer une tolérance à l'ischémie induite par l'exercice (388).

Si l'angine préconditionne le cœur humain, il est permis de penser que l'effet d'une crise d'angine pré-infarctus pourrait être bénéfique chez des patients souffrant d'infarctus du myocarde aigu. En effet, plusieurs études démontrent une corrélation positive entre un état angineux pré-infarctus et la récupération du patient suivant l'infarctus (391-396). Par exemple, Kloner et coll. (391), en analysant de façon rétrospective les données de l'étude *Thrombolysis in Myocardial Infarction* (TIMI) 4, observèrent que les patients avec des antécédents angineux avant leur infarctus du myocarde présentaient une plus faible incidence de mortalité et de complications hospitalières ainsi que d'insuffisance cardiaque congestive. Le degré d'activité de leur créatine kinase était plus faible comparativement aux patients n'ayant jamais souffert d'angine. Chose importante à retenir, la protection conférée par un antécédent angineux n'était pas exclusivement attribuable à la prise de médicaments anti-angineux ou le développement de collatérales. Kloner et son équipe conclurent à partir de résultats fondamentaux que l'angine protège ou préconditionne le cœur. Ainsi, des épisodes angineux survenant peu de temps avant l'infarctus induisent une protection contre l'ischémie (397).

D'autres résultats viennent appuyer ce concept. En effet, une récente analyse prospective temporelle d'environ trois mille patients, la TIMI 9B (395), démontre que l'incidence d'événements cardiaques majeurs (mort, infarctus du myocarde récurrent, insuffisance cardiaque) dans les trente jours suivants l'infarctus est significativement inférieur chez les patients ayant souffert d'angine au cours des derniers vingt-quatre heures précédant l'infarctus. Une crise d'angine au cours des vingt-quatre heures précédant l'infarctus correspond soit au PCI classique ou soit à la seconde fenêtre du PCI, ceci reste encore à être déterminé. Finalement, plusieurs autres paramètres protégés par le PCI dans des modèles expérimentaux ont été observés chez des patients souffrant d'angine pré infarctus : récupération de la contractilité post ischémique (393;394), réduction des arythmies causées par l'ischémie et la reperfusion (391) et thrombolyse coronaire plus efficace (396;398).

## **7.8 Utilisation du préconditionnement ischémique comme traitement des maladies ischémiques cardiaques**

À partir de ces résultats encourageants obtenus à l'aide de modèles expérimentaux, tout porte à croire que le PCI ou certains de ses mécanismes pourront être utilisés éventuellement afin de prévenir ou de traiter les maladies ischémiques cardiaques. Donc, le but ultime de cette recherche est d'intégrer le savoir acquis au fil des années afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour rendre le cœur humain plus résistant à l'ischémie.

### **7.8.1 Utilisation du préconditionnement ischémique dans un contexte chirurgical**

Il serait utopique de croire que le PCI induit par de courtes périodes ischémiques pourrait être utilisé chez tous les patients. D'ailleurs, à ce jour, son utilisation clinique se limite aux procédures chirurgicales. La première évidence clinique provient du groupe de Yellon. En effet, lors de pontages coronaires, ils observèrent qu'après dix minutes d'ischémie causée par la pose d'une clampé aortique, les réserves d'ATP et l'incidence de fibrillations étaient diminuées dans le groupe de patients ayant préalablement été exposés à deux périodes ischémiques de 3 minutes (96). Une autre étude effectuée par ces mêmes chercheurs à l'aide du même modèle démontra une réduction de la libération de troponine T (un index du dommage cellulaire) chez les patients ayant préalablement été preconditionnés (399).

Malgré ces découvertes prometteuses, la précaution demeure de mise car ces résultats sont controversés par une récente étude. En effet, Perrault et coll. observèrent que la libération de créatine kinase tendait à être augmentée chez les dix patients préalablement preconditionnés à l'aide de trois minutes de clampage aortique effectué avant la cardioplégie comparativement aux patients témoins

(400). À la lumière de ces résultats, il faudra être prudent et effectuer d'autres études sur un échantillonnage plus grand de patients avant d'adopter l'utilisation du PCI comme procédure prophylactique pré ischémique.

Le PCI ou un de ses médiateurs pourraient également trouver une application lors de greffes cardiaques, hépatiques, rénales et pulmonaires. Pour l'instant, les résultats obtenus chez les animaux semblent très encourageants, il reste toutefois encore à vérifier si cette pratique est reproductible à grande échelle chez l'homme.

### **7.8.2 Induction pharmacologique du préconditionnement ischémique**

La stimulation pharmacologique des récepteurs et des mécanismes impliqués dans le PCI représente une seconde approche plus appropriée et plus convenable pour induire une cardioprotection. Plusieurs agents utilisés en laboratoire tels : le PMA et les autres activateurs des PKCs, possèdent un potentiel thérapeutique peu prometteur en raison de leur importante toxicité lorsque utilisés *in vivo*. De leur côté, tout porte à croire que les kinines et les prostaglandines étant impliquées dans la transmission de la douleur et dans les processus inflammatoires, pourraient exacerber les symptômes de l'ischémie cardiaque.

Donc, la liste des candidats s'amenuise et se limite pour l'instant à deux catégories d'agents pharmaceutiques : les agonistes des récepteurs à l'adénosine ou des cannabinoïdes (ou les agents modulant leur production et leur dégradation) et les activateurs des canaux potassiques dépendants de l'ATP puisque ces agents sont parmi ceux possédant le meilleur profil d'effets indésirables. D'ailleurs, le nicorandil, un activateur des canaux potassiques dépendants de l'ATP disponible cliniquement en Europe et au Japon, est déjà utilisé dans la prévention et le traitement de l'angine de poitrine (397).



Également, de brèves perfusions intracoronaires d'adénosine ou de dipyridamole administrées chez des patients subissant une angioplastie miment l'effet protecteur d'une série de gonflements de ballonnet (195;385). D'un autre côté, des résultats préliminaires (401;402) indiquent que l'addition d'adénosine à la solution de cardioplégie résulte en une modeste amélioration de la récupération contractile et réduit les besoins en dopamine et en nitroglycérine dans les premières vingt-quatre heures post-opératoires.

L'utilisation thérapeutique des médiateurs du PCI chez les patients à risque de développer un infarctus, par exemple les patients souffrant d'angine instable, représente le domaine le plus vaste et celui impliquant un nombre élevé de patients. À ce jour, dans ce groupe de patients, l'effet du préconditionnement pharmacologique demeure inconnu. Les résultats préliminaires chez les animaux obtenus lors d'études visant à prolonger les effets du PCI furent décevants.

En effet, des études conduites par le groupe de Downey chez le cœur de lapin examinèrent la possibilité d'étendre la durée du PCI classique en utilisant de façon répétée des stimuli de ce dernier (112;403). Ils démontrèrent que des épisodes répétés de PCI ou de hautes doses d'agoniste du récepteur A<sub>1</sub>, résultent en une diminution marquée de la cardioprotection, ce qui suggère une régulation à la baisse des récepteurs impliqués.

De leur côté, Dana et coll. obtinrent des résultats plus encourageants. En effet, ils rapportèrent qu'une perfusion intermittente d'un agoniste sélectif du récepteur A<sub>1</sub> produisait une cardioprotection significative pendant dix jours. De plus, ils n'observèrent aucune régulation à la baisse de ce récepteur lors que cet agent était administré à un intervalle d'une fois à tous les dix jours (404).

Certains résultats produits au cours de cette thèse semblent démontrer que les cannabinoïdes exercent un effet protecteur sur la fonction endothéliale lors de l'ischémie et de la reperfusion chez le rat. Parallèlement, nous avons observé que

les cannabinoïdes produisent une amélioration de la fonction contractile post-ischémie (résultats non publiés). Ces premières observations démontrent, du moins pour l'instant chez le rat, que les cannabinoïdes semblent cardioprotecteurs. D'ici quelques années, ces substances seront peut-être être utilisées en clinique dans le traitement des maladies ischémiques cardiaques. Par exemple, un agoniste sélectif des récepteurs CB<sub>2</sub> agissant uniquement sur l'inflammation et la cardioprotection et dépourvu d'effet dysphorique pourrait être employé dans la prévention des maladies ischémiques cardiaques chez les patients à risque. Un agoniste CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> pourrait, quant à lui, être utilisé dans le traitement de maladies ischémiques aiguës car en plus d'agir sur l'inflammation, il pourrait être pourvu d'un effet analgésique et antiémétique. Ces particularités en feraient un médicament de choix chez des patients souffrant de symptômes d'infarctus du myocarde car en plus d'augmenter l'intervalle disponible pour la reperfusion, il agirait sur les douleurs et les nausées, symptômes fréquemment associés à cette pathologie.

Comme ces récepteurs sont couplés à des protéines G (405), il est possible qu'ils se désensibilisent après une stimulation prolongée à l'aide d'agonistes. Ceci pourrait limiter leur utilisation dans la prévention des maladies ischémiques cardiaques. Pour le moment, rien a été rapporté à ce sujet. Mais si l'hypothèse de la désensibilisation des récepteurs aux cannabinoïdes s'avérait vraie, on pourrait possiblement l'éviter en donnant ces agents une fois à tous les 5 à 10 jours comme pour l'adénosine dans l'étude de Dana et de ses collaborateurs (404). Mais pour l'instant, ce ne sont que des spéculations. Et d'ici ce temps, d'autres expériences sont requises afin d'infirmer ou de confirmer l'effet protecteur des cannabinoïdes.

### **7.9 Utilisation du préconditionnement ou de ses médiateurs dans la prévention de la dysfonction endothéliale chez l'humain**

Comme nous avons expliqué au cours de l'introduction de cette thèse, la fonction endothéliale joue un rôle primordial dans la survie du cœur tout entier. Il est donc

essentiel de tenter de la préserver de tout dommage associé à l'ischémie et à la reperfusion. Actuellement, nous ne sommes encore qu'au début des expériences chez les animaux, nous sommes encore loin de l'utilisation du PCI ou de ses médiateurs dans la prévention de la dysfonction endothéliale chez l'humain produite par l'ischémie et de la reperfusion. Mais jusqu'à présent, les résultats sont encourageants. En effet, ils sont reproductibles chez beaucoup d'espèces animales et les mécanismes impliqués dans ce phénomène semblent ressembler énormément à ceux induisant la cardioprotection. Pour le moment, il serait prématuré d'entamer des expériences visant uniquement à vérifier l'effet qu'a le PCI sur l'endothélium coronaire humain. Toutefois, des évidences indirectes démontrant que la thrombolyse est plus efficace chez les patients souffrant d'angine pré-infarctus (396;398) laissent entrevoir une meilleure fonctionnalité endothéliale chez les patients « préconditionnés ». Cette évidence clinique nous encourage à continuer dans cette voie.

Actuellement, on pourrait tester la fonctionnalité endothéliale en ajoutant ce paramètre à des études chez l'humain vérifiant l'effet du PCI sur les modifications électrocardiographiques, sur la libération de CK, LDH ou troponine T ou sur la fraction d'éjection post-ischémique. Ces études permettraient d'en apprendre davantage sur l'effet exercé par le PCI sur la fonction endothéliale humaine.

## 7.10 CONCLUSIONS

Nos résultats démontrent que le PCI protège la fonction endothéliale coronaire du rat contre les dommages provoqués par l'ischémie et la reperfusion tant chez l'animal sain que l'animal diabétique. À l'intérieur de ces deux modèles, l'adénosine représente un des médiateurs du PCI. Chez l'animal non diabétique, les kinines sont impliquées dans le PCI. Nos travaux démontrent pour la première fois la participation des prostaglandines E<sub>2</sub>, de la des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine et des cannabinoïdes endogènes à cette réponse protectrice. L'effet protecteur du PCI sur la fonction endothéliale est médié par les récepteurs à l'adénosine, les

récepteurs B<sub>1</sub> aux kinines, les récepteurs EP aux prostaglandines ainsi que les récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> aux cannabinoïdes. De plus, les protéine kinases C ainsi que les canaux potassiques dépendants de l'ATP semblent contribuer à cette réponse.

Ces travaux furent financés par l'ACIM-CRM Fondation de la recherche en santé, le Conseil de recherche médicale du Canada, la Fondation des maladies du cœur du Québec, le Fonds de la recherche en santé du Québec, le Groupe de recherche sur le système nerveux autonome, Merck-Frosst Canada et Norvartis Pharma Canada.

## RÉFÉRENCES

- (1) World Health Organisation. The world health report 1998: life in the 21st century, a vision for all. Geneva: 1998.
- (2) Dana A, Sumeray MS, Yellon DM. Ischaemic preconditioning: a clinical perspective. *Hosp Med* 1998; 59(3):216-220.
- (3) Buja LM. Modulation of the myocardial response to ischemia. *Lab Invest* 1998; 78(11):1345-1373.
- (4) Hillis LD, Braunwald E. Myocardial ischemia (second of three parts). *N Engl J Med* 1977; 296(18):1034-1041.
- (5) Carmeliet E. Myocardial ischemia: reversible and irreversible changes. *Circulation* 1984; 70(1):149-151.
- (6) Barry WH, Peeters GA, Rasmussen CAJ, Cunningham MJ. Role of changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in energy deprivation contracture. *Circ Res* 1987; 61(5):726-734.
- (7) Koretsune Y, Marban E. Mechanism of ischemic contracture in ferret hearts: relative roles of  $[Ca^{2+}]_i$  elevation and ATP depletion. *Am J Physiol* 1990; 258(1 Pt 2):H9-16.
- (8) Reimer KA, Ideker RE. Myocardial ischemia and infarction: anatomic and biochemical substrates for ischemic cell death and ventricular arrhythmias. *Hum Pathol* 1987; 18(5):462-475.
- (9) Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117(12):1208-1214.

- (10) Jones RL, Miller JC, Hagler HK, Chien KR, Willerson JT, Buja LM. Association between inhibition of arachidonic acid release and prevention of calcium loading during ATP depletion in cultured rat cardiac myocytes. *Am J Pathol* 1989; 135(3):541-556.
- (11) Simpson PJ, Lucchesi BR. Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1987; 110(1):13-30.
- (12) Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 1989; 80(5):1115-1127.
- (13) Ganote CE, Vander HR. Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study. *Am J Pathol* 1987; 129(2):327-344.
- (14) Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res* 1985; 57(6):864-875.
- (15) Buja LM, Willerson JT. Abnormalities of volume regulation and membrane integrity in myocardial tissue slices after early ischemic injury in the dog: effects of mannitol, polyethylene glycol, and propranolol. *Am J Pathol* 1981; 103(1):79-95.
- (16) Hearse DJ, Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res* 1992; 26(2):101-108.

- (17) Morris AC, Hagler HK, Willerson JT, Buja LM. Relationship between calcium loading and impaired energy metabolism during Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump inhibition and metabolic inhibition in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1989; 83(6):1876-1887.
- (18) Buja LM, Hagler HK, Willerson JT. Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury. *Cell Calcium* 1988; 9(5-6):205-217.
- (19) Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985; 76(5):1713-1719.
- (20) Gunnar RM, Passamani ER, Bourdillon PD, Pitt B, Dixon DW, Rapaport E et al. Guidelines for the early management of patients with acute myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Subcommittee to Develop Guidelines for the Early Management of Patients with Acute Myocardial Infarction). *J Am Coll Cardiol* 1990; 16(2):249-292.
- (21) Ryan TJ, Antman EM, Brooks NH, Califf RM, Hillis LD, Hiratzka LF et al. 1999 update: ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(3):890-911.
- (22) Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92(11):3337-3349.
- (23) Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994; 344(8926):852-854.

- (24) Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333(6174):664-666.
- (25) Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347(6295):768-770.
- (26) Noll G, Lüscher TF. The endothelium in acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 1998; 19 Suppl C:C30-8:C30-C38.
- (27) Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 1983; 221(4607):273-274.
- (28) Lüscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, Von Segesser L et al. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 1988; 319(8):462-467.
- (29) Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1978; 30(3):293-331.
- (30) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987; 92(1):181-187.
- (31) Richard V, Tanner FC, Tschudi M, Lüscher TF. Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries. *Am J Physiol* 1990; 259:H1433-H1439.



- (32) Tschudi M, Richard V, Bühler FR, Lüscher TF. Importance of endothelium-derived nitric oxide in porcine coronary resistance arteries. *Am J Physiol* 1990; 260:H13-H20.
- (33) Vanhoutte PM. Vascular physiology: the end of the quest? *Nature* 1987; 327(6122):459-460.
- (34) Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999; 401(6752):493-497.
- (35) Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; 396(6708):269-272.
- (36) Van de Voorde J, Vanheel B. EDHF-mediated relaxation in rat gastric small arteries: influence of ouabain/Ba<sup>2+</sup> and relation to potassium ions. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000 Apr;35 (4):543 -8 2000; 35(4):543-548.
- (37) Randall MD, McCulloch AI, Kendall DA. Comparative pharmacology of endothelium-derived hyperpolarizing factor and anandamide in rat isolated mesentery. *Eur J Pharmacol* 1997; 333(2-3):191-197.
- (38) Randall MD, Kendall DA. Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasorelaxation. *Eur J Pharmacol* 1997; 335(2-3):205-209.
- (39) Harris D, Kendall DA, Randall MD. Characterization of cannabinoid receptors coupled to vasorelaxation by endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 359(1):48-52.

- (40) Niederhoffer N, Szabo B. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in the EDHF-dependent vasorelaxation in rabbits. *Br J Pharmacol* 1999; 126(6):1383-1386.
- (41) De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res* 1982; 51(4):439-447.
- (42) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332(6163):411-415.
- (43) Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor [see comments]. *Nature* 1990; 348(6303):730-732.
- (44) Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):732-735.
- (45) Ng KK, Vane JR. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* 1967; 216(117):762-766.
- (46) Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation* 1990; 81(5):1586-1593.
- (47) Sellke FW, Quillen JE, Brooks LA, Harrison DG. Endothelial modulation of the coronary vasculature in vessels perfused via mature collaterals. *Circulation* 1990; 81(6):1938-1947.

- (48) Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with impaired coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84:1984-1992.
- (49) Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81(2):491-497.
- (50) Treasure CB, Klein JL, Vita JA, Manoukian SV, Renwick GH, Selwyn AP et al. Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation* 1993; 87:86-93.
- (51) Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai F-X. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: Role of free radicals. *Am J Physiol* 1994; 266:H1153-H1161.
- (52) Nitenberg A, Antony I, Foulst JM. Acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in young, heavy smokers with normal coronary arteriographic findings. *Am J Med* 1993; 95(1):71-77.
- (53) Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW, Selwyn AP. Dilation of normal and constriction of atherosclerotic coronary arteries caused by the cold pressor test. *Circulation* 1988; 77(1):43-52.
- (54) Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92:652-662.

- (55) Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM. Acute impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circ Res* 1990; 67:385-393.
- (56) Van Benthuyzen KM, McMurtry IF, Horwitz LD. 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.
- (57) DeFily DV, Chilian WM. Preconditioning protects coronary arteriolar endothelium from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1993; 265:H700-H706.
- (58) Uren NG, Marraccini P, Gistri R, de Silva R, Camici PG. Altered coronary vasodilator reserve and metabolism in myocardium subtended by normal arteries in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22(3):650-658.
- (59) Uren NG, Crake T, Lefroy DC, de Silva R, Davies GJ, Maseri A. Reduced coronary vasodilator function in infarcted and normal myocardium after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1994; 331(4):222-227.
- (60) Beanlands RS, Muzik O, Melon P, Sutor R, Sawada S, Muller D et al. Noninvasive quantification of regional myocardial flow reserve in patients with coronary atherosclerosis using nitrogen-13 ammonia positron emission tomography. Determination of extent of altered vascular reactivity. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26(6):1465-1475.
- (61) Yang ZH, Stulz P, Von Segesser L, Bauer E, Turina M, Luscher TF. Different interactions of platelets with arterial and venous coronary bypass vessels. *Lancet* 1991; 337(8747):939-943.

- (62) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423):801-809.
- (63) Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83(5):1774-1777.
- (64) Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 1990; 63(3):515-524.
- (65) Castellot JJ, Jr., Beeler DL, Rosenberg RD, Karnovsky MJ. Structural determinants of the capacity of heparin to inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1984; 120(3):315-320.
- (66) Hannan RL, Kourembanas S, Flanders KC, Rogelj SJ, Roberts AB, Faller DV et al. Endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Growth Factors* 1988; 1(1):7-17.
- (67) Yang Z, Arnet U, Bauer E, Von Segesser L, Siebenmann R, Turina M et al. Thrombin-induced endothelium-dependent inhibition and direct activation of platelet-vessel wall interaction. Role of prostacyclin, nitric oxide, and thromboxane A2. *Circulation* 1994; 89(5):2266-2272.
- (68) Britten MB, Zeiher AM, Schachinger V. Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Intern Med* 1999; 245(4):315-327.

- (69) Zeiher AM, Krause T, Schachinger V, Minners J, Moser E. Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels is associated with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation* 1995; 91(9):2345-2352.
- (70) Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Urabe Y, Takeshita A. Evidence of impaired endothelium-dependent coronary vasodilatation in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *N Engl J Med* 1993; 328:1659-1664.
- (71) McFadden EP, Clarke JG, Davies GJ, Kaski JC, Haider AW, Maseri A. Effect of intracoronary serotonin on coronary vessels in patients with stable angina and patients with variant angina. *N Engl J Med* 1991; 324(10):648-654.
- (72) Forrester JS, Litvack F, Grundfest W. Initiating events of acute coronary arterial occlusion. *Annu Rev Med* 1991; 42:35-45:35-45.
- (73) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992; 326(4):242-250.
- (74) Hekman CM, Loskutoff DJ. Fibrinolytic pathways and the endothelium. *Semin Thromb Hemost* 1987; 13(4):514-527.
- (75) Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; 54(6):1496-1508.
- (76) Schofer J, Montz R, Mathey DG. Scintigraphic evidence of the "no reflow" phenomenon in human beings after coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5(3):593-598.

- (77) Jeremy RW, Links JM, Becker LC. Progressive failure of coronary flow during reperfusion of myocardial infarction: documentation of the no reflow phenomenon with positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16(3):695-704.
- (78) Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323(1):27-36.
- (79) Brody JI, Pickering NJ, Capuzzi DM, Fink GB, Can CA, Gomez F. Interleukin-1 alpha as a factor in occlusive vascular disease. *Am J Clin Pathol* 1992; 97(1):8-13.
- (80) Paleolog EM, Delasalle SA, Buurman WA, Feldmann M. Functional activities of receptors for tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. *Blood* 1994; 84(8):2578-2590.
- (81) Bhagat K, Moss R, Collier J, Vallance P. Endothelial "stunning" following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc Res* 1996; 32(5):822-829.
- (82) Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997; 96(9):3042-3047.
- (83) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide - Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
- (84) Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9(13):1319-1330.

- (85) Myers PR, Parker JL, Tanner MA, Adams HR. Effects of cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta on endotoxin-mediated inhibition of endothelium-derived relaxing factor bioactivity and nitric oxide production in vascular endothelium. *Shock* 1994; 1(1):73-78.
- (86) Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994; 266(6 Pt 2):H2535-H2541.
- (87) Siegfried MR, Ma XL, Lefer AM. Splanchnic vascular endothelial dysfunction in rat endotoxemia: role of superoxide radicals. *Eur J Pharmacol* 1992; 212(2-3):171-176.
- (88) Valtonen V, Kuikka A, Syrjanen J. Thrombo-embolic complications in bacteraemic infections. *Eur Heart J* 1993; 14 Suppl K:20-3:20-23.
- (89) Bhagat K. Endothelial function and myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1998; 39(2):312-317.
- (90) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-1136.
- (91) Geft IL, Fishbein MC, Ninomiya K, Hashida J, Chaux E, Yano J et al. Intermittent brief periods of ischemia have a cumulative effect and may cause myocardial necrosis. *Circulation* 1982; 66(6):1150-1153.
- (92) Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986; 251(6 Pt 2):H1306-H1315.



- (93) Li YW, Whittaker P, Kloner RA. The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. *Am Heart J* 1992; 123(2):346-353.
- (94) Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation* 1991; 84:341-349.
- (95) Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 1990; 66:1133-1142.
- (96) Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993; 342:276-277.
- (97) Perez-Pinzon MA, Xu GP, Dietrich WD, Rosenthal M, Sick TJ. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17(2):175-182.
- (98) Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K. Protection of rat hippocampus against ischemic neuronal damage by pretreatment with sublethal ischemia. *Brain Res* 1992; 586(1):121-124.
- (99) Matsuyama K, Chiba Y, Ihaya A, Kimura T, Tanigawa N, Muraoka R. Effect of spinal cord preconditioning on paraplegia during cross-clamping of the thoracic aorta. *Ann Thorac Surg* 1997; 63(5):1315-1320.
- (100) Larsen AK, Osborne NN. Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37(13):2603-2611.

- (101) Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993; 25(6):3303-3304.
- (102) Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(12):1258-1267.
- (103) Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol* 1997; 79(6):842-847.
- (104) Carroll CM, Carroll SM, Overgoor ML, Tobin G, Barker JH. Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100(1):58-65.
- (105) Mounsey RA, Pang CY, Boyd JB, Forrest C. Augmentation of skeletal muscle survival in the latissimus dorsi porcine model using acute ischemic preconditioning. *J Otolaryngol* 1992; 21(5):315-320.
- (106) Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* 1992; 263:H1107-H1112.
- (107) Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, Penta de Peppo A et al. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker. *Circulation* 1994; 90:700-705.
- (108) Tani M, Asakura Y, Hasegawa H, Shinmura K, Ebihara Y, Nakamura Y. Effect of preconditioning on ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum of rat heart. *Am J Physiol* 1996; 271(3 Pt 2):H876-H881.

- (109) Sandhu R, Diaz RJ, Mao GD, Wilson GJ. Ischemic preconditioning: differences in protection and susceptibility to blockade with single-cycle versus multicycle transient ischemia. *Circulation* 1997; 96(3):984-995.
- (110) Li GC, Vasquez BS, Gallagher KP, Lucchesi BR. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation* 1990; 82:609-619.
- (111) Miura T, Goto M, Urabe K, Endoh A, Shimamoto K, Iimura O. Does myocardial stunning contribute to infarct size limitation by ischemic preconditioning? *Circulation* 1991; 84(6):2504-2512.
- (112) Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1994; 74(5):998-1004.
- (113) Iliodromitis EK, Kremastinos DT, Katritsis DG, Papadopoulos CC, Hearse DJ. Multiple cycles of preconditioning cause loss of protection in open-chest rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(3):915-920.
- (114) Yang XM, Arnoult S, Tsuchida A, Cope D, Thornton JD, Daly JF et al. The protection of ischaemic preconditioning can be reinstated in the rabbit heart after the initial protection has waned. *Cardiovasc Res* 1993; 27(4):556-558.
- (115) Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 1991; 260(3 Pt 2):H796-H804.
- (116) Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res* 1993; 27:542-550.

- (117) Shizukuda Y, Mallet RT, Lee SC, Downey HF. Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium. *Cardiovasc Res* 1992; 26(5):534-542.
- (118) Cohen MV, Walsh RS, Goto M, Downey JM. Hypoxia preconditions rabbit myocardium via adenosine and catecholamine release. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(8):1527-1534.
- (119) Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K. Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol* 1994; 266(1 Pt 2):H137-H146.
- (120) Whittaker P, Przyklenk K. Reduction of infarct size in vivo with ischemic preconditioning: mathematical evidence for protection via non-ischemic tissue. *Basic Res Cardiol* 1994; 89(1):6-15.
- (121) Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993; 87(3):893-899.
- (122) Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996; 94(9):2193-2200.
- (123) Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 1997; 96:1641-1646.
- (124) Li Y, Kloner RA. Cardioprotective effects of ischemic preconditioning can be recaptured after they are lost. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23(2):470-474.

- (125) Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88(3):1264-1272.
- (126) Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993; 72(6):1293-1299.
- (127) Reimer KA, Vander Heide RS, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows ischemic metabolism and limits myocardial infarct size. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723:99-115.
- (128) Shiki K, Hearse DJ. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol* 1987; 253:H1470-H1476.
- (129) Piacentini L, Wainwright CL, Parratt JR. The antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning in isolated rat heart involves a pertussis toxin sensitive mechanism. *Cardiovasc Res* 1993; 27:674-680.
- (130) Hagar JM, Hale SL, Kloner RA. Effects of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res* 1991; 68:61-68.
- (131) Lasley RD, Anderson GM, Mentzer RM, Jr. Ischaemic and hypoxic preconditioning enhance postischaemic recovery of function in the rat heart. *Cardiovasc Res* 1993; 27:565-570.
- (132) Cave AC, Hearse DJ. Ischaemic preconditioning and contractile function: studies with normothermic and hypothermic global ischaemia. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24:1113-1123.

- (133) Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 1990; 66:913-931.
- (134) Headrick JP. Ischemic preconditioning: bioenergetic and metabolic changes and the role of endogenous adenosine. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28(6):1227-1240.
- (135) Kolocassides KG, Galinanes M, Hearse DJ. Preconditioning accelerates contracture and ATP depletion in blood-perfused rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 269(4 Pt 2):H1415-H1420.
- (136) Neely JR, Grotyohan LV. Role of glycolytic products in damage to the ischemic myocardium: dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of reperfused ischaemic hearts. *Circ Res* 1984; 55:816-824.
- (137) Asimakis GK, Inners-McBride K, Medellin G, Conti VR. Ischemic preconditioning attenuates acidosis and postischemic dysfunction in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1992; 263(3 Pt 2):H887-H894.
- (138) Asimakis GK, Inners-McBride K, Conti VR. Attenuation of postischaemic dysfunction by ischaemic preconditioning is not mediated by adenosine in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 1993; 27:1522-1530.
- (139) Ovize M, Przyklenk K, Hale SL, Kloner RA. Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. *Circulation* 1992; 85:2247-2254.
- (140) Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Progressive decrease in the ST segment elevation during ischemic preconditioning: is it related to recruitment of collateral vessels? *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28(7):1493-1499.

- (141) Figueras J, Segura R, Bermejo B. Repeated 15-minute coronary occlusions in pigs increase occlusion arrhythmias but decrease reperfusion arrhythmias that are associated with extracellular hypokalemia. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28(6):1589-1597.
- (142) Vegh A, Komoro S, Szekeres L, Parratt JR. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. *Cardiovasc Res* 1992; 26:487-495.
- (143) Przyklenk K, Kloner RA. Preconditioning: a balanced perspective. *Br Heart J* 1995; 74(6):575-577.
- (144) Ovize M, Aupetit JF, Rioufol G, Loufoua J, Andre-Fouet X, Minaire Y et al. Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart. *Am J Physiol* 1995; 269(1 Pt 2):H72-H79.
- (145) Richard V, Kaeffer N, Tron C, Thuillez C. Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994; 89:1254-1261.
- (146) Kaeffer N, Richard V, Francois A, Lallemand F, Henry JP, Thuillez C. Preconditioning prevents chronic reperfusion-induced coronary endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol* 1996; 271:H842-H849.
- (147) Hata K, Whittaker P, Kloner RA, Przyklenk K. Brief antecedent ischemia attenuates platelet-mediated thrombosis in damaged and stenotic canine coronary arteries: role of adenosine. *Circulation* 1998; 97(7):692-702.
- (148) Hata K, Whittaker P, Kloner RA, Przyklenk K. Brief myocardial ischemia attenuates platelet thrombosis in remote, damaged, and stenotic carotid arteries. *Circulation* 1999; 100(8):843-848.

- (149) Speechly-Dick ME, Baxter GF, Yellon DM. Ischaemic preconditioning protects hypertrophied myocardium. *Cardiovasc Res* 1994; 28(7):1025-1029.
- (150) Boutros A, Wang J. Ischemic preconditioning, adenosine and bethanechol protect spontaneously hypertensive isolated rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275(3):1148-1156.
- (151) Randall MD, Gardiner SM, Bennett T. Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the transgenic ((mREN-2) 27) hypertensive rat. *Cardiovasc Res* 1997; 33(2):400-409.
- (152) Liu Y, Thornton JD, Cohen MV, Downey JM, Shaffer JR. Streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetes protects the heart from infarction. *Circulation* 1993; 88:1273-1278.
- (153) Szilvassy Z, Ferdinandy P, Szilvassy J, Nagy I, Karcsu S, Lonovics J et al. The loss of pacing-induced preconditioning in atherosclerotic rabbits: role of hypercholesterolaemia. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(12):2559-2569.
- (154) Tani M, Suganuma Y, Hasegawa H, Shinmura K, Hayashi Y, Guo XD et al. Changes in ischemic tolerance and effects of ischemic preconditioning in middle-aged rat hearts. *Circulation* 1997; 95:2559-2566.
- (155) Abete P, Ferrara N, Cioppa A, Ferrara P, Bianco S, Calabrese C et al. Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:1777-1786.
- (156) Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaesth* 1998; 45(7):670-682.



- (157) Kimura Y, Iyengar J, Subramanian R, Cordis GA, Das DK. Preconditioning of the heart by repeated stunning: attenuation of post-ischemic dysfunction. *Basic Res Cardiol* 1992; 87(2):128-138.
- (158) Matsuda M, Catena TG, Vander Heide RS, Jennings RB, Reimer KA. Cardiac protection by ischaemic preconditioning is not mediated by myocardial stunning. *Cardiovasc Res* 1993; 27(4):585-592.
- (159) Bullough DA, Magill MJ, Firestein GS, Mullane KM. Adenosine activates A2 receptors to inhibit neutrophil adhesion and injury to isolated cardiac myocytes. *J Immunol* 1995; 155(5):2579-2586.
- (160) Parmely MJ, Zhou WW, Edwards CK, III, Borcharding DR, Silverstein R, Morrison DC. Adenosine and a related carbocyclic nucleoside analogue selectively inhibit tumor necrosis factor-alpha production and protect mice against endotoxin challenge. *J Immunol* 1993; 151(1):389-396.
- (161) Shen HM, Sha LX, Kennedy JL, Ou DW. Adrenergic receptors regulate macrophage secretion. *Int J Immunopharmacol* 1994; 16(11):905-910.
- (162) van der PT, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC, Lowry SF. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest* 1996; 97(3):713-719.
- (163) Schoenberg MH, Poch B, Moch D, Marzinzig M, Marzinzig E, Mattfeldt T et al. Effect of adenosine treatment on postischemic damage to small intestine. *Am J Physiol* 1995; 269(5 Pt 2):H1752-H1759.
- (164) Denlinger LC, Fisette PL, Garis KA, Kwon G, Vazquez-Torres A, Simon AD et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J Biol Chem* 1996; 271(1):337-342.

- (165) Liu GS, Richards SC, Olsson RA, Mullane K, Walsh RS, Downey JM. Evidence that the adenosine A<sub>3</sub> receptor may mediate the protection afforded by preconditioning in the isolated rabbit heart. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1057-1061.
- (166) Yao Z, Gross GJ. Role of nitric oxide, muscarinic receptors, and the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in mediating the effects of acetylcholine to mimic preconditioning in dogs. *Circ Res* 1993; 73:1193-1201.
- (167) Yao Z, Gross GJ. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264:H2221-H2225.
- (168) Nakano A, Miura T, Ura N, Suzuki K, Shimamoto K. Role of the angiotensin II type 1 receptor in preconditioning against infarction. *Coron Artery Dis* 1997; 8:343-350.
- (169) Goto M, Liu YG, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995; 77:611-621.
- (170) Miyawaki H, Ashraf M. Ca<sup>2+</sup> as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1997; 80:790-799.
- (171) Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Cairns CB et al. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ Res* 1993; 73(4):656-670.
- (172) Erikson JM, Velasco CE. Endothelin-1 and myocardial preconditioning. *Am Heart J* 1996; 132(1 Pt 1):84-90.

- (173) Miyamae M, Diamond I, Weiner MW, Camacho SA, Figueredo VM. Regular alcohol consumption mimics cardiac preconditioning by protecting against ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(7):3235-3239.
- (174) Bolli R, Bhatti ZA, Tang XL, Qiu Y, Zhang Q, Guo Y et al. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ Res* 1997; 81:42-52.
- (175) Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 268(5 Pt 2):H2157-H2161.
- (176) Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:207-216.
- (177) Forman MB, Velasco CE, Jackson EK. Adenosine attenuates reperfusion injury following regional myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1993; 27(1):9-17.
- (178) Lasley RD, Konyn PJ, Hegge JO, Mentzer RM, Jr. Effects of ischemic and adenosine preconditioning on interstitial fluid adenosine and myocardial infarct size. *Am J Physiol* 1995; 269(4 Pt 2):H1460-H1466.
- (179) Downey JM, Liu GS, Thornton JD. Adenosine and the anti-infarct effects of preconditioning. *Cardiovasc Res* 1993; 27:3-8.
- (180) Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1994; 74:416-421.

- (181) Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, Soifer BE, Kuzume K, Davis RF. Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the  $K_{ATP}$  channel. *Am J Physiol* 1994; 266:H829-H839.
- (182) Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by  $A_1$  adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991; 84:350-356.
- (183) Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM. Intravenous pretreatment with  $A_1$ -selective adenosine analogues protects the heart against infarction. *Circulation* 1992; 85:659-665.
- (184) Silva PH, Dillon D, Van Wylen DG. Adenosine deaminase inhibition augments interstitial adenosine but does not attenuate myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1995; 29(5):616-623.
- (185) Lasley RD, Noble MA, Konyn PJ, Mentzer RM, Jr. Different effects of an adenosine  $A_1$  analogue and ischemic preconditioning in isolated rabbit hearts. *Ann Thorac Surg* 1995; 60(6):1698-1703.
- (186) Hale SL, Bellows SD, Hammerman H, Kloner RA. An adenosine  $A_1$  receptor agonist, R(-)-N-(2-phenylisopropyl)- adenosine (PIA), but not adenosine itself, acts as a therapeutic preconditioning-mimetic agent in rabbits. *Cardiovasc Res* 1993; 27:2140-2145.
- (187) Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine  $A_1$  receptors,  $K_{ATP}$  channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264:H1327-H1336.
- (188) Tsuchida A, Liu GS, Wilborn WH, Downey JM. Pretreatment with the adenosine  $A_1$  selective agonist, 2-chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (CCPA), causes a sustained limitation of infarct size in rabbits. *Cardiovasc Res* 1993; 27:652-656.

- (189) Miura T, Ogawa T, Iwamoto T, Shimamoto K, Iimura O. Dipyridamole potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning. *Circulation* 1992; 86:979-985.
- (190) Grover GJ, Sleph PG, Dzwonczyk S. Role of myocardial ATP-sensitive potassium channels in mediating preconditioning in the dog heart and their possible interaction with adenosine A<sub>1</sub>-receptors. *Circulation* 1992; 86:1310-1316.
- (191) Yao Z, Gross GJ. A comparison of adenosine-induced cardioprotection and ischemic preconditioning in dogs: Efficacy, time course, and role of K<sub>ATP</sub> channels. *Circulation* 1994; 89:1229-1236.
- (192) Matherne GP, Linden J, Byford AM, Gauthier NS, Headrick JP. Transgenic A<sub>1</sub> adenosine receptor overexpression increases myocardial resistance to ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(12):6541-6546.
- (193) Headrick JP, Gauthier NS, Berr SS, Morrison RR, Matherne GP. Transgenic A<sub>1</sub> adenosine receptor overexpression markedly improves myocardial energy state during ischemia-reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(5):1059-1064.
- (194) Lee HT, LaFaro RJ, Reed GE. Pretreatment of human myocardium with adenosine during open heart surgery. *J Card Surg* 1995; 10(6):665-676.
- (195) Leeser MA, Stoddard M, Ahmed M, Broadbent J, Bolli R. Preconditioning of human myocardium with adenosine during coronary angioplasty. *Circulation* 1997; 95(11):2500-2507.

- (196) Leung JM, Stanley T, III, Mathew J, Curling P, Barash P, Salmenpera M et al. An initial multicenter, randomized controlled trial on the safety and efficacy of acadesine in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. SPI Research Group. *Anesth Analg* 1994; 78(3):420-434.
- (197) Lawson CS. Does ischaemic preconditioning occur in the human heart? *Cardiovasc Res* 1994; 28(10):1461-1466.
- (198) Li Y, Kloner RA. The cardioprotective effects of ischemic 'preconditioning' are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. *Circulation* 1993; 87:1642-1648.
- (199) Li Y, Kloner RA. Adenosine deaminase inhibition is not cardioprotective in the rat. *Am Heart J* 1993; 126(6):1293-1298.
- (200) Cave AC, Collis CS, Downey JM, Hearse DJ. Improved functional recovery by ischaemic preconditioning is not mediated by adenosine in the globally ischaemic isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 1993; 27:663-668.
- (201) Schomig A, Dart AM, Dietz R, Mayer E, Kubler W. Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part A: Locally mediated release. *Circ Res* 1984; 55(5):689-701.
- (202) Toombs CF, Wiltse AL, Shebuski RJ. Ischemic preconditioning fails to limit infarct size in reserpinized rabbit myocardium. Implication of norepinephrine release in the preconditioning effect. *Circulation* 1993; 88(5 Pt 1):2351-2358.
- (203) Hu K, Nattel S. Mechanisms of ischemic preconditioning in rat hearts. Involvement of alpha 1B-adrenoceptors, pertussis toxin-sensitive G proteins, and protein kinase C. *Circulation* 1995; 92(8):2259-2265.

- (204) de Jong JW, Cargnoni A, Bradamante S, Curello S, Janssen M, Pasini E et al. Intermittent v continuous ischemia decelerates adenylate breakdown and prevents norepinephrine release in reperfused rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(1):659-671.
- (205) Seyfarth M, Richardt G, Mizsnyak A, Kurz T, Schomig A. Transient ischemia reduces norepinephrine release during sustained ischemia. Neural preconditioning in isolated rat heart. *Circ Res* 1996; 78(4):573-580.
- (206) Vegh A, Papp JG, Parratt J. Attenuation of the antiarrhythmic effects of ischaemic preconditioning by blockade of bradykinin B<sub>2</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 1994; 113:1167-1172.
- (207) Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:681-689.
- (208) Brew EC, Mitchell MB, Rehring TF, Gamboni-Robertson F, McIntyre RC, Jr., Harken AH et al. Role of bradykinin in cardiac functional protection after global ischemia-reperfusion in rat heart. *Am J Physiol* 1995; 269:H1370-H1378.
- (209) Linz W, Martorana PA, Schölkens BA. Local inhibition of bradykinin degradation in ischemic hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15 (Suppl 6):S99-S109.
- (210) Chahine R, Adam A, Yamaguchi N, Gaspo R, Regoli D, Nadeau R. Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B<sub>1</sub> receptor. *Br J Pharmacol* 1993; 108:318-322.

- (211) Vegh A, Szekeres L, Parratt J. Preconditioning of the ischaemic myocardium; Involvement of the L-arginine nitric oxide pathway. *Br J Pharmacol* 1992; 107:648-652.
- (212) Parratt JR, Vegh A, Zeitlin IJ, Ahmad M, Oldroyd K, Kaszala K et al. Bradykinin and endothelial-cardiac myocyte interactions in ischemic preconditioning. *Am J Cardiol* 1997; 80:124A-131A.
- (213) Tsuura Y, Ishida H, Hayashi S, Sakamoto K, Horie M, Seino Y. Nitric oxide opens ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels through suppression of phosphofructokinase activity and inhibits glucose-induced insulin release in pancreatic beta cells. *J Gen Physiol* 1994; 104(6):1079-1098.
- (214) Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP- sensitive potassium channels. *J Physiol (Lond)* 1995; 486(Pt 1):47-58.
- (215) Alexander RW, Kent KM, Pisano JJ, Keiser HR, Cooper T. Regulation of postocclusive hyperemia by endogenously synthesized prostaglandins in the dog heart. *J Clin Invest* 1975; 55(6):1174-1181.
- (216) Coker SJ, Parratt JR, Ledingham IM, Zeitlin IJ. Thromboxane and prostacyclin release from ischaemic myocardium in relation to arrhythmias. *Nature* 1981; 291(5813):323-324.
- (217) Otani H, Engelman RM, Rousou JA, Breyer RH, Das DK. Enhanced prostaglandin synthesis due to phospholipid breakdown in ischemic-reperfused myocardium. Control of its production by a phospholipase inhibitor or free radical scavengers. *J Mol Cell Cardiol* 1986; 18(9):953-961.



- (218) Okada T. Hypoxia-induced change in prostanoids production and coronary flow in isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23:939-948.
- (219) Rabinowitz B, Arad M, Shotan A, Klein R, Har ZY, Elazar E. Effects of brief and prolonged ischemia on eicosanoid synthesis in dog and rat hearts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1995; 6(1):39-52.
- (220) Vegh A, Szekeres L, Parratt JR. Protective effects of preconditioning of the ischaemic myocardium involve cyclo-oxygenase products. *Cardiovasc Res* 1990; 24:1020-1023.
- (221) Arad M, Oxman T, Leor R, Rabinowitz B. Prostaglandins and the antiarrhythmic effect of preconditioning in the isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 1996; 160-161:249-55:249-255.
- (222) Li Y, Kloner RA. Cardioprotective effects of ischaemic preconditioning are not mediated by prostanoids. *Cardiovasc Res* 1992; 26:226-231.
- (223) Miura T, Ishimoto R, Sakamoto J, Tsuchida A, Suzuki K, Ogawa T et al. Suppression of reperfusion arrhythmia by ischemic preconditioning in the rat: is it mediated by the adenosine receptor, prostaglandin, or bradykinin receptor? *Basic Res Cardiol* 1995; 90(3):240-246.
- (224) Katircioglu SF, Ulus AT, Iscan Z, Yamak B, Saritas Z, Birincioglu L. Preservation of myocardial metabolism in acute coronary artery occlusions with retrograde coronary sinus perfusion and iloprost. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 59(3):169-174.
- (225) Hide EJ, Thiemermann C. Sulprostone-induced reduction of myocardial infarct size in the rabbit by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Br J Pharmacol* 1996; 118(6):1409-1414.

- (226) Corsi M, Parise M, Gaja G, Ferrero ME. Possible role of defibrotide in endothelial cell protection. *Int J Tissue React* 1993; 15(4):157-161.
- (227) Coker SJ, Parratt JR. Prostacyclin - antiarrhythmic or arrhythmogenic? Comparison of the effects of intravenous and intracoronary prostacyclin and ZX 36374 during coronary artery occlusion and reperfusion in the anaesthetised greyhound. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5:557-567.
- (228) Parratt JR, Coker SJ. Arachidonic acid cascade and the generation of ischemia- and reperfusion-induced ventricular arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7 Suppl 5:S65-70:S65-S70.
- (229) Karmazyn M. Contribution of prostaglandins to reperfusion-induced ventricular failure in isolated rat hearts. *Am J Physiol* 1986; 251(1 Pt 2):H133-H140.
- (230) Devane WA, Breuer A, Sheskin T, Jarbe TU, Eisen MS, Mechoulam R. A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 1992; 35(11):2065-2069.
- (231) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258(5090):1946-1949.
- (232) Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(8):3376-3380.

- (233) Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(1):83-90.
- (234) Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 1997; 388(6644):773-778.
- (235) Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A. N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 1996; 300(3):227-236.
- (236) Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(14):8268-8273.
- (237) Varga K, Lake K, Martin BR, Kunos G. Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol* 1995; 278(3):279-283.
- (238) Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281(3):1030-1037.
- (239) Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995; 232(1):54-61.

- (240) Chien GL, Van Winkle DM. Naloxone blockade of myocardial ischemic preconditioning is stereoselective. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28(9):1895-1900.
- (241) Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(8):2187-2195.
- (242) Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1- but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation* 1998; 97(13):1282-1289.
- (243) Tsuchida A, Miura T, Tanno M, Nozawa Y, Kita H, Shimamoto K. Time window for the contribution of the delta-opioid receptor to cardioprotection by ischemic preconditioning in the rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 1998; 12(4):365-373.
- (244) Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(5):1355-1362.
- (245) Wu S, Li HY, Wong TM. Cardioprotection of preconditioning by metabolic inhibition in the rat ventricular myocyte. Involvement of kappa-opioid receptor. *Circ Res* 1999; 84(12):1388-1395.
- (246) Miki T, Cohen MV, Downey JM. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol Cell Biochem* 1998; 186(1-2):3-12.
- (247) Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, Ghini AS, Ferri C et al. Effects of naloxone on myocardial ischemic preconditioning in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33(7):1863-1869.

- (248) Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res* 1996; 78(6):1100-1104.
- (249) Wang TL, Chang H, Hung CR, Tseng YZ. Morphine preconditioning attenuates neutrophil activation in rat models of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1998; 40(3):557-563.
- (250) Schultz JJ, Hsu AK, Nagase H, Gross GJ. TAN-67, a delta 1-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of Gi/o proteins and KATP channels. *Am J Physiol* 1998; 274(3 Pt 2):H909-H914.
- (251) Liang BT, Gross GJ. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels. *Circ Res* 1999; 84(12):1396-1400.
- (252) Lasley RD, Mentzer RM, Jr. Pertussis toxin blocks adenosine A<sub>1</sub> receptor mediated protection of the ischemic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25:815-821.
- (253) Sugden PH, Bogoyevitch MA. Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res* 1995; 30(4):478-492.
- (254) Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D. Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res* 1994; 210(2):287-297.
- (255) Brooks G. The role of 80K/MARCKS, a specific substrate of protein kinase C, in cell growth and tumour progression. *Pigment Cell Res* 1994; 7(6):451-457.
- (256) Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986; 233(4761):305-312.

- (257) Ferriola PC, Cody V, Middleton E, Jr. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(10):1617-1624.
- (258) Steinberg SF, Goldberg M, Rybin VO. Protein kinase C isoform diversity in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(1):141-153.
- (259) Simkhovich BZ, Przyklenk K, Kloner RA. Role of protein kinase C as a cellular mediator of ischemic preconditioning: a critical review. *Cardiovasc Res* 1998; 40(1):9-22.
- (260) Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 1995; 76:73-81.
- (261) Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH. Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C-epsilon is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin. *Circ Res* 1993; 72(4):757-767.
- (262) Rybin VO, Steinberg SF. Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. *Circ Res* 1994; 74(2):299-309.
- (263) Erdbrügger W, Keffel J, Knocks M, Otto T, Philipp T, Michel MC. Protein kinase C isoenzymes in rat and human cardiovascular tissues. *Br J Pharmacol* 1997; 120(2):177-186.
- (264) Gho BC, Eskildsen-Helmond YE, de Zeeuw S, Lamers JM, Verdouw PD. Does protein kinase C play a pivotal role in the mechanisms of ischemic preconditioning? *Cardiovasc Drugs Ther* 1997; 10(6):775-786.

- (265) Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266(3 Pt 2):H1145-H1152.
- (266) Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26:661-668.
- (267) Yang XM, Sato H, Downey JM, Cohen MV. Protection of ischemic preconditioning is dependent upon a critical timing sequence of protein kinase C activation. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(3):991-999.
- (268) Tsuchida A, Liu Y, Liu GS, Cohen MV, Downey JM.  $\alpha_1$ -adrenergic agonists precondition rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. *Circ Res* 1994; 75:576-585.
- (269) Liu Y, Tsuchida A, Cohen MV, Downey JM. Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(3):883-892.
- (270) Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X et al. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* 1997; 81:404-414.
- (271) Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C: its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* 1994; 75:586-590.

- (272) Strasser RH, Braun-Dullaeus R, Walendzik H, Marquetant R. Alpha 1-receptor-independent activation of protein kinase C in acute myocardial ischemia. Mechanisms for sensitization of the adenylyl cyclase system. *Circ Res* 1992; 70(6):1304-1312.
- (273) Vahlhaus C, Schulz R, Post H, Onallah R, Heusch G. No prevention of ischemic preconditioning by the protein kinase C inhibitor staurosporine in swine. *Circ Res* 1996; 79(3):407-414.
- (274) Simkhovich BZ, Przyklenk K, Hale SL, Patterson M, Kloner RA. Direct evidence that ischemic preconditioning does not cause protein kinase C translocation in rabbit heart. *Cardiovasc Res* 1996; 32(6):1064-1070.
- (275) Cohen MV, Liu Y, Liu GS, Wang P, Weinbrenner C, Cordis GA et al. Phospholipase D plays a role in ischemic preconditioning in rabbit heart. *Circulation* 1996; 94(7):1713-1718.
- (276) Maulik N, Watanabe M, Zu YL, Huang CK, Cordis GA, Schley JA et al. Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. *FEBS Lett* 1996; 396:233-237.
- (277) Baines CP, Wang L, Cohen MV, Downey JM. Protein tyrosine kinase is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(2):383-392.
- (278) Vahlhaus C, Schulz R, Post H, Rose J, Heusch G. Prevention of ischemic preconditioning only by combined inhibition of protein kinase C and protein tyrosine kinase in pigs. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(2):197-209.
- (279) Knight RJ, Buxton DB. Stimulation of c-Jun kinase and mitogen-activated protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218(1):83-88.



- (280) Fatehi-Hassanabad Z, Parratt JR. Genistein, an inhibitor of tyrosine kinase, prevents the antiarrhythmic effects of preconditioning. *Eur J Pharmacol* 1997; 338(1):67-70.
- (281) Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben Levy R, Ashworth A et al. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 1996; 79(2):162-173.
- (282) Kitakaze M, Hori M, Takashima S, Sato H, Inoue M, Kamada T. Ischemic preconditioning increases adenosine release and 5'-nucleotidase activity during myocardial ischemia and reperfusion in dogs: Implications for myocardial salvage. *Circulation* 1993; 87:208-215.
- (283) Kitakaze M, Hori M, Morioka T, Minamino T, Takashima S, Sato H et al. Alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor activation mediates the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through augmentation of 5'-nucleotidase activity. *J Clin Invest* 1994; 93:2197-2205.
- (284) Kitakaze M, Funaya H, Minamino T, Node K, Sato H, Ueda Y et al. Role of protein kinase C-alpha in activation of ecto-5'-nucleotidase in the preconditioned canine myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239:171-175.
- (285) Kitakaze M, Hori M, Morioka T, Minamino T, Takashima S, Sato H et al. Infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning is blunted by inhibition of 5'-nucleotidase activity and attenuation of adenosine release. *Circulation* 1994; 89:1237-1246.

- (286) Kitakaze M, Node K, Minamino T, Komamura K, Funaya H, Shinozaki Y et al. Role of activation of protein kinase C in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through activation of ecto-5'-nucleotidase. *Circulation* 1996; 93(4):781-791.
- (287) Amende I, Bentivegna LA, Zeind AJ, Wenzlaff P, Grossman W, Morgan JP. Intracellular calcium and ventricular function. Effects of nisoldipine on global ischemia in the isovolumic, coronary-perfused heart. *J Clin Invest* 1992; 89(6):2060-2065.
- (288) Przyklenk K, Hata K, Kloner RA. Is calcium a mediator of infarct size reduction with preconditioning in canine myocardium? *Circulation* 1997; 96:1305-1312.
- (289) Node K, Kitakaze M, Sato H, Minamino T, Komamura K, Shinozaki Y et al. Role of intracellular Ca<sup>2+</sup> in activation of protein kinase C during ischemic preconditioning. *Circulation* 1997; 96:1257-1265.
- (290) Zucchi R, Ronca-Testoni S, Yu G, Galbani P, Ronca G, Mariani M. Postischemic changes in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channels. A possible mechanism of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1995; 76(6):1049-1056.
- (291) Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305(5930):147-148.
- (292) Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Trapp S, Ryder TJ, Haug T et al. Molecular determinants of KATP channel inhibition by ATP. *EMBO J* 1998; 17(12):3290-3296.

- (293) Schultz JE, Yao Z, Cavero I, Gross GJ. Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart. *Am J Physiol* 1997; 272:H2607-H2615.
- (294) Nichols CG, Lederer WJ. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol* 1991; 261:H1675-H1686.
- (295) Cason BA, Gordon HJ, Avery EG, Hickey RF. The role of ATP sensitive potassium channels in myocardial protection. *J Card Surg* 1995; 10(4 Suppl):441-444.
- (296) Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992; 70:223-233.
- (297) Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. Coupling of ATP-sensitive  $K^+$  channels to  $A_1$  receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1990; 259:H820-H826.
- (298) Yao Z, Mizumura T, Mei DA, Gross GJ. KATP channels and memory of ischemic preconditioning in dogs: synergism between adenosine and KATP channels. *Am J Physiol* 1997; 272:H334-H342.
- (299) Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent  $K^+$  channel. Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model. *Circ Res* 1995; 77:1030-1035.
- (300) Stiles GL. Adenosine receptors: physiological regulation and biochemical mechanisms. *News Physiol Sci* 1991; 6:161-164.

- (301) Light PE, Sabir AA, Allen BG, Walsh MP, French RJ. Protein kinase C-induced changes in the stoichiometry of ATP binding activate cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. A possible mechanistic link to ischemic preconditioning. *Circ Res* 1996; 79(3):399-406.
- (302) Liu YG, Gao WD, O'Rourke B, Marban E. Synergistic modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents by protein kinase C and adenosine: implications for ischemic preconditioning. *Circ Res* 1996; 78:443-454.
- (303) Liu Y, Sato T, Seharaseyon J, Szewczyk A, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels. Viable candidate effectors of ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 874:27-37:27-37.
- (304) Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 1997; 81(6):1072-1082.
- (305) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. New insights into potential mechanisms of ischemic preconditioning. *Circulation* 1991; 84(1):442-445.
- (306) Ganote C, Armstrong S. Ischaemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation. *Cardiovasc Res* 1993; 27(8):1387-1403.
- (307) Tosaki A, Pali T, Droy-Lefaix MT. Effects of Ginkgo biloba extract and preconditioning on the diabetic rat myocardium. *Diabetologia* 1996; 39:1255-1262.

- (308) Tosaki A, Engelman DT, Engelman RM, Das DK. The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 1996; 31:526-536.
- (309) Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 1994; 16:383-391.
- (310) Abiru T, Watanabe Y, Kamata K, Kasuya Y. Changes in endothelium-dependent relaxation and levels of cyclic nucleotides in the perfused mesenteric arterial bed from streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 1993; 53:PL7-PL12.
- (311) Rodrigues B, McNeill JH. The diabetic heart: metabolic causes for the development of a cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 1992; 26:913-922.
- (312) Miller TB. Cardiac performance of isolated perfused hearts from alloxan diabetic rats. *Am J Physiol* 1979; 236:808-812.
- (313) Paulson DJ. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiovasc Res* 1997; 34:104-112.
- (314) Feuvray D, Lopaschuk GD. Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury is decreased. *Cardiovasc Res* 1997; 34:113-120.
- (315) Vegh A, Szekeres L, Parratt JR. Local intracoronary infusions of bradykinin profoundly reduce the severity of ischaemia-induced arrhythmias in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol* 1991; 104:294-295.

- (316) Schwarz ER, Mohri M, Sack S, Arras M. Duration of infarct size limiting effect of ischemic preconditioning in the pig. *Circulation* 84 (Suppl. II), II-432. 1991.
- (317) Yellon DM, Alkhulaifi AM, Browne EE, Pugsley WB. Ischaemic preconditioning limits infarct size in the rat heart. *Cardiovasc Res* 1992; 26:983-987.
- (318) Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46:157-193.
- (319) Mankad PS, Chester AH, Yacoub MH. 5-Hydroxytryptamine mediates endothelium dependent coronary vasodilatation in the isolated rat heart by the release of nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1991; 25:244-248.
- (320) Bauer B, Simkhovich BZ, Kloner RA, Przyklenk K. Does preconditioning protect the coronary vasculature from subsequent ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 1993; 88:659-672.
- (321) Parratt JR. Protection of the heart by ischaemic preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:19-25.
- (322) Parratt JR, Kane KA.  $K_{ATP}$  channels in ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1994; 28:783-787.
- (323) Grover GJ. Protective effects of ATP sensitive potassium channel openers in models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* 1994; 28:778-782.

- (324) Miura T, Iimura O. Infarct size limitation by preconditioning: its phenomenological features and the key role of adenosine. *Cardiovasc Res* 1993; 27:36-42.
- (325) Grover GJ, Newburger J, Sleph PG, Dzwonczyk S, Taylor SC, Ahmed SZ et al. Cardioprotective effects of the potassium channel opener cromakalim: stereoselectivity and effects on myocardial adenine nucleotides. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257:156-162.
- (326) Hosoda H, Sunamori M, Suzuki A. Effect of pinacidil on rat hearts undergoing hypothermic cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1994; 58:1631-1636.
- (327) Janigro D, West GA, Gordon EL, Winn HR. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat aorta and brain microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1993; 265:C812-C821.
- (328) Adams DJ, Barakeh J, Laskey R, Van Breemen C. Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J* 1989; 3:2389-2400.
- (329) Lückhoff A, Busse R. Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflugers Arch* 1990; 416:305-311.
- (330) Schiele JO, Schwabe U. Characterization of the adenosine receptor in microvascular coronary endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1994; 269:51-58.
- (331) Ramkumar V, Stiles GL, Beaven MA, Ali H. The A<sub>3</sub> adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J Biol Chem* 1993; 268:16887-16890.

- (332) Linden J. Cloned adenosine A<sub>3</sub> receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:298-306.
- (333) Sanz E, Garcia Dorado D, Oliveras J, Barrabés JA, Gonzalez MA, Ruiz-Meana M et al. Dissociation between anti-infarct effect and anti-edema effect of ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 1995; 268:H233-H241.
- (334) Bouchard J-F, Lamontagne D. Mechanisms of protection afforded by preconditioning to endothelial function against ischemic injury. *Am J Physiol* 1996; 271:H1801-H1806.
- (335) Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263:H321-H326.
- (336) Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1986; 131:75-78.
- (337) Head RJ, Longhurst PA, Panek RL, Stitzel RE. A contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from the rat and rabbit. *Br J Pharmacol* 1987; 91:275-286.
- (338) Smits P, Kapma J-A, Jacobs M-C, Lutterman J. Endothelium-dependent vascular relaxation in patients with type I diabetes. *Diabetes* 1988; 42:148-153.
- (339) Yang BC, Nicolini FA, Nichols WW, Mehta JL. Failure of brief ischemic episodes to protect against myocardial dysfunction caused by ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. *Am Heart J* 1994; 128:1192-1200.



- (340) Szilvassy Z, Ferdinandy P, Szilvassy J, Nagy I, Karcsu S, Lonovics J et al. The loss of pacing-induced preconditioning in atherosclerotic rabbits: role of hypercholesterolaemia. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:2559-2569.
- (341) Tosaki A, Maulik N, Engelman DT, Engelman RM, Das DK. The role of protein kinase in C ischemic/reperfused preconditioned isolated rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28:723-731.
- (342) Inoguchi T, Xia P, Kunisaki M, Higashi S, Feener EP, King GL. Insulin's effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. *Am J Physiol* 1994; 267:E369-E379.
- (343) Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H, King GL. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes* 1994; 43:1372-1377.
- (344) Kamata K, Miyata N, Kasuya Y. Functional changes in potassium channels in aortas from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol* 1989; 166:319-323.
- (345) Cameron NE, Cotter MA. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin- diabetic rats: Role of polyol pathway. *Diabetologia* 1992; 35:1011-1019.
- (346) Sack S, Mohri M, Arras M, Schwarz ER, Schaper W. Ischaemic preconditioning: time course of renewal in the pig. *Cardiovasc Res* 1993; 27:551-555.

- (347) Parratt JR, Vegh A, Papp JG. Bradykinin as an endogenous myocardial protective substance with particular reference to ischemic preconditioning: a brief review of the evidence. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73:837-842.
- (348) Regoli D, Calo G, Rizzi A, Bogoni G, Gobeil F, Campobasso C et al. Bradykinin receptors and receptor ligands (with special emphasis on vascular receptors). *Regul Pept* 1996; 65:83-89.
- (349) Gobeil F, Neugebauer W, Filteau C, Jukic D, Nsa Allogho S, Pheng LH et al. Structure-activity studies of B<sub>1</sub> receptor-related peptides: antagonists. *Hypertension* 1996; 28:833-839.
- (350) Linz W, Wiemer G, Schölkens BA. Role of kinins in the pathophysiology of myocardial ischemia. In vitro and in vivo studies. *Diabetes* 1996; 45 (Suppl 1):S51-S58.
- (351) Marceau F, Regoli D. Kinins receptors of the B<sub>1</sub> type and their antagonists. In: Burch RM, editor. *Bradykinin antagonists: basic and clinical research*. New York: Marcel Dekker, 1991: 33-49.
- (352) Miyoshi H, Nakaya Y, Moritoki H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1994; 345:47-49.
- (353) Bouchard J-F, Dumont E, Lamontagne D. Evidence that prostaglandins I<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, and D<sub>2</sub> may activate ATP sensitive potassium channels in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 1994; 28:901-905.
- (354) Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 1995; 47:25-49.

- (355) Li Y, Kloner RA. Cardioprotective effects of ischaemic preconditioning are not mediated by prostanoids. *Cardiovasc Res* 1992; 26(3):226-231.
- (356) Crichton CA, Templeton AGB, McGrath JC, Smith GL. Thromboxane A<sub>2</sub> analogue, U-46619, potentiates calcium- activated force in human umbilical artery. *Am J Physiol* 1993; 264:H1878-H1883.
- (357) Campbell WB, Halushka PV. Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet-activating factor. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A, editors. *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996: 601-616.
- (358) Ren J, Karpinski E, Benishin CG. The actions of prostaglandin E<sub>2</sub> on potassium currents in rat tail artery vascular smooth muscle cells: regulation by protein kinase A and protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277(1):394-402.
- (359) Bouchard J-F, Chouinard J, Lamontagne D. Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol* 1998; 123:413-420.
- (360) Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N- arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci* 1997; 17(4):1226-1242.
- (361) Schmid PC, Kuwae T, Krebsbach RJ, Schmid HH. Anandamide and other N-acylethanolamines in mouse peritoneal macrophages. *Chem Phys Lipids* 1997; 87(2):103-110.

- (362) Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996; 384(6604):83-87.
- (363) Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997; 277(5329):1094-1097.
- (364) Hillard CJ, Auchampach JA. In vitro activation of brain protein kinase C by the cannabinoids. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1220(2):163-170.
- (365) De Petrocellis L, Orlando P, Di Marzo V. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic substance, modulates rat brain protein kinase C in vitro. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 36(6):1127-1133.
- (366) Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 1995; 359(2-3):133-136.
- (367) Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M et al. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 1996; 237(3):704-711.
- (368) Bouchard J-F, Lamontagne D. Protection afforded by preconditioning to the diabetic heart against ischaemic injury. *Cardiovasc Res* 1998; 37:82-90.
- (369) Bouchard J-F, Chouinard J, Lamontagne D. Participation of prostaglandin E<sub>2</sub> in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 2000; 45(2):418-427.

- (370) Needleman P, Key SL, Denny SE, Isakson PC, Marshall GROUSI M. Mechanism and modification of bradykinin-induced coronary vasodilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(6):2060-2063.
- (371) Zhu P, Zaugg CE, Simper D, Hornstein P, Allegrini PR, Buser PT. Bradykinin improves postischaemic recovery in the rat heart: role of high energy phosphates, nitric oxide, and prostacyclin. *Cardiovasc Res* 1995; 29(5):658-663.
- (372) Rajani V, Hussain Y, Bolla BS, de Guzman FQ, Montiague RR, Igic R et al. Attenuation of epinephrine-induced dysrhythmias by bradykinin: role of nitric oxide and prostaglandins. *Am J Cardiol* 1997; 80(3A):153A-157A.
- (373) Gallagher AM, Yu H, Printz MP. Bradykinin-induced reductions in collagen gene expression involve prostacyclin. *Hypertension* 1998; 32(1):84-88.
- (374) Sato M, Das DK, Engelman RM. Interaction of bradykinin with angiotensin, prostacyclin, and nitric oxide in myocardial preservation. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 874:286-94:286-294.
- (375) Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(9):3825-3829.
- (376) Mackie K, Devane WA, Hille B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 1993; 44(3):498-503.

- (377) Deadwyler SA, Hampson RE, Bennett BA, Edwards TA, Mu J, Pacheco MA et al. Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Receptors Channels* 1993; 1(2):121-134.
- (378) Henry DJ, Chavkin C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus oocytes*. *Neurosci Lett* 1995; 186(2-3):91-94.
- (379) Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 1995; 312(Pt 2):637-641.
- (380) Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(16):7656-7660.
- (381) Shivachar AC, Martin BR, Ellis EF. Anandamide- and delta9-tetrahydrocannabinol-evoked arachidonic acid mobilization and blockade by SR141716A [N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboximide hydrochloride]. *Biochem Pharmacol* 1996; 51(5):669-676.
- (382) Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW, Jr., Herrmann HC, Laskey WK. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 1990; 82:2044-2051.

- (383) Cribier A, Korsatz L, Koning R, Rath P, Gamra H, Stix G et al. Improved myocardial ischemic response and enhanced collateral circulation with long repetitive coronary occlusion during angioplasty: a prospective study. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:578-586.
- (384) Eltchaninoff H, Cribier A, Tron C, Derumeaux G, Koning R, Hecketsweiler B et al. Adaptation to myocardial ischemia during coronary angioplasty demonstrated by clinical, electrocardiographic, echocardiographic, and metabolic parameters. *Am Heart J* 1997; 133(4):490-496.
- (385) Strauer BE, Heidland UE, Heintzen MP, Schwartzkopff B. Pharmacologic myocardial protection during percutaneous transluminal coronary angioplasty by intracoronary application of dipyridamole: impact on hemodynamic function and left ventricular performance. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28(5):1119-1126.
- (386) Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, Polisca P et al. Effects of A1 adenosine receptor blockade by bamiphylline on ischaemic preconditioning during coronary angioplasty. *Eur Heart J* 1996; 17(6):846-853.
- (387) Claeys MJ, Vrints CJ, Bosmans JM, Conraads VM, Snoeck JP. Aminophylline inhibits adaptation to ischaemia during angioplasty. Role of adenosine in ischaemic preconditioning. *Eur Heart J* 1996; 17(4):539-544.
- (388) Okazaki Y, Kodama K, Sato H, Kitakaze M, Hirayama A, Mishima M et al. Attenuation of increased regional myocardial oxygen consumption during exercise as a major cause of warm-up phenomenon. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21(7):1597-1604.

- (389) Maybaum S, Ilan M, Mogilevsky J, Tzivoni D. Improvement in ischemic parameters during repeated exercise testing: a possible model for myocardial preconditioning. *Am J Cardiol* 1996; 78(10):1087-1091.
- (390) Tzivoni D, Maybaum S. Attenuation of severity of myocardial ischemia during repeated daily ischemic episodes. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30(1):119-124.
- (391) Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV et al. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 1995; 91(1):37-45.
- (392) Muller DW, Topol EJ, Califf RM, Sigmon KN, Gorman L, George BS et al. Relationship between antecedent angina pectoris and short-term prognosis after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group. *Am Heart J* 1990; 119(2 Pt 1):224-231.
- (393) Hirai T, Fujita M, Yoshida N, Yamanishi K, Inoko M, Miwa K. Importance of ischemic preconditioning and collateral circulation for left ventricular functional recovery in patients with successful intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1993; 126(4):827-831.
- (394) Nakagawa Y, Ito H, Kitakaze M, Kusuoka H, Hori M, Kuzuya T et al. Effect of angina pectoris on myocardial protection in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction: retrospective clinical evidence of "preconditioning". *J Am Coll Cardiol* 1995; 25(5):1076-1083.
- (395) Pasceri V, Cianflone D, Finocchiaro ML, Crea F, Maseri A. Relation between myocardial infarction site and pain location in Q-wave acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1995; 75(4):224-227.



- (396) Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR, Davies GJ, Haider AW, Maseri A. Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1996; 334(1):7-12.
- (397) Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 40(6):517-547.
- (398) Ishihara M, Sato H, Tateishi H, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S et al. Implications of prodromal angina pectoris in anterior wall acute myocardial infarction: acute angiographic findings and long-term prognosis. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30(4):970-975.
- (399) Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 1997; 77(4):314-318.
- (400) Perrault LP, Menasche P, Bel A, de Chaumaray T, Peynet J, Mondry A et al. Ischemic preconditioning in cardiac surgery: a word of caution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112(5):1378-1386.
- (401) Mentzer RM, Jr., Rahko PS, Molina-Viamonte V, Canver CC, Chopra PS, Love RB et al. Safety, tolerance, and efficacy of adenosine as an additive to blood cardioplegia in humans during coronary artery bypass surgery. *Am J Cardiol* 1997; 79(12A):38-43.
- (402) Mentzer RM, Jr., Birjiniuk V, Khuri S, Lowe JE, Rahko PS, Weisel RD et al. Adenosine myocardial protection: preliminary results of a phase II clinical trial. *Ann Surg* 1999; 229(5):643-649.

- (403) Tsuchida A, Thompson R, Olsson RA, Downey JM. The anti-infarct effect of an adenosine A<sub>1</sub>-selective agonist is diminished after prolonged infusion as is the cardioprotective effect of ischaemic preconditioning in rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26:303-311.
- (404) Dana A, Baxter GF, Walker JM, Yellon DM. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A<sub>1</sub> receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31(5):1142-1149.
- (405) Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Pharmacol Ther* 1997; 74(2):129-180.

*Annexe I**Curriculum Vitae*Articles originaux :

1. Marie Joyeux, Jean-François Bouchard, Daniel Lamontagne, Diane Godin-Ribuot, Christophe Ribuot. Heat stress protects endothelial function against ischaemic injury in the isolated rat heart. *Br. J. Pharmacol.* (sous presse)
2. A. Cabassi , J-F Bouchard, H. Girouard, M. Le Jossec, D. Lamontagne, J-G Besner, J. de Champlain. Effect of antioxidant treatments on nitrate tolerance development in normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2000 Feb; 18 (2):187-96
3. J-F Bouchard, J. Chouinard, and D. Lamontagne. Participation of prostaglandin E<sub>2</sub> in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning in the isolated rat heart. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45 (2) :418-427
4. Bouchard JF, Dumont EC, and Lamontagne D. Modifications of vascular reactivity to vasodilators in streptozotocin-induced diabetic rat. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 1999; 77: 980-5.
5. Bodart V., Bouchard J-F, McNicoll N., Escher E., Carrière P., Ghigo E., Sejlitz T., Sirois M.G., Lamontagne D., and Ong H. Identification and characterization of a growth hormone releasing-peptide receptor in the heart. *Circ. Res.* 1999, 85(9): 796-802.
6. Bouchard JF and Lamontagne D. Mechanisms of protection afforded by cyclooxygenase inhibitors to endothelial function against ischemic injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 34: 755-763
7. Bouchard JF, Lamontagne D. Protection afforded by preconditioning to the diabetic heart against ischemic injury. *Cardiovasc. Res.* 1998; 37 (1): 82-90
8. Bouchard JF, Chouinard J, and Lamontagne D. Role of kinins in the endothelial protective effect of ischemic preconditioning. *Br J Pharmacol.* 123(3), 413-420, 1998
9. Bouchard JF, Lamontagne D. Mechanisms of protection afforded by ischaemic preconditioning to endothelial function against ischaemic injury in the isolated rat heart. *Am. J. Physiol.* 271 (5Pt2) (Heart Circ. Physiol.40): H1801-H1806, 1996

10. Bouchard JF, Dumont E, and Lamontagne D. Evidence that prostaglandins I<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, and D<sub>2</sub> may activate ATP sensitive potassium channels in the isolated rat heart. *Cardiovasc. Res.* 1994;28 (6):901-905

Chapitres de livre et compte-rendus d'exposés scientifiques :

1. Bouchard J-F, J. Chouinard et D. Lamontagne. Implication des récepteurs B1 aux kinines dans la protection endothéliale produite par le préconditionnement ischémique. *Arch. Mal. Cœur.* 1998; 91(8): 941-5
2. H. Ong, V. Bodard, N. McNicoll, D. Lamontagne and J-F. Bouchard. Binding sites for growth hormone-releasing peptide. *Growth Hormone & IGF Research* 1998; 8: 137-140
3. Bouchard J-F, E.C Dumont et D. Lamontagne. Diminution de la réponse vasculaire à l'iloprost chez le rat diabétique. *Arch. Mal. Coeur* 1997; 90(8): 1071-4.

Article soumis ou en révision :

1. Jean-François Bouchard, Orval A. Mamer, and Daniel Lamontagne. Endogenous cannabinoids induced cardioprotection. *Nature Medicine.*
2. Jean-François Bouchard, Orval A. Mamer, and Daniel Lamontagne. Ischemic preconditioning in isolated rat heart is mediated by endogenous cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.*
3. Cabassi A, Dumont EC, Bouchard JF, Girouard H, Le Jossec M, Lamontagne D, Besner JG, de Champlain J. N-Acetylcysteine effects on oxidative vascular alterations in hypertensive rats. *Hypertension.*
4. Dumont EC, Bouchard JF, and Lamontagne D. Changes in the contractile response of conduit and coronary resistance arteries of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetologia.*

Brevets :

1. Les cannabinoïdes dans le traitement des maladies cardiaques. Jean-François Bouchard et Daniel Lamontagne

Abrégés:

1. J-F Bouchard and D. Lamontagne. Cardioprotection induced by endogenous cannabinoids. *MRC-Connection Meeting Program and Abstracts* (sur invitation).
2. H. Ong, D. Lamontagne, T. Deghengui, M.G. Sirois, A. Perreault, J.F. Bouchard, and V.Bodart. Signaling pathways involved in the cardiovascular activity of growth hormone releasing hexapeptides (sous presse).
3. J-F Bouchard and D. Lamontagne. Cardioprotection induced by endogenous cannabinoids. *The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Western Pharmacology Society Program and Abstracts*, 2000
4. J-F Bouchard et D. Lamontagne. Cannabinoïdes endogènes et cardioprotection. *Médecine Sciences*, Vol. 15, Suppl.2, 1999, p.17
5. A. Cabassi, E.C. Dumont, J-F Bouchard, H. Girouard, M. Le Jossec, D. Lamontagne, J-G Besner, J. de Champlain. Diversified N-Acetylcysteine effects against free radicals-induced vascular injury in normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertension* 17 (suppl.3), may 1999, page S92.
6. Audrey Perreault, Jean-François Bouchard, Véronique Bodart, Romano Deghenghi, D. Lamontagne, Huy Ong. Cardiovascular activity of EP 70905, a new growth hormone releasing peptide. *The endocrine Society, Program and abstracts*, page 558, P3-559.
7. J.F Bouchard and D. Lamontagne. Contribution of the endogenous cannabinoids in the endothelial protective effect of ischemic preconditioning. *The 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Western Pharmacology Society Program and Abstracts*, 1999, p.96. (Second prix présentation orale)
8. J.F Bouchard, J. Chouinard, and D. Lamontagne. Role of prostaglandins in the endothelial protective effect of ischemic preconditioning. *The 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Western Pharmacology Society Program and Abstracts*, Maui, 1999, p.27. (Second prix affiche)
9. J-F Bouchard, J. Chouinard et D. Lamontagne. Contribution de la prostaglandine E<sub>2</sub> dans la protection endothéliale amenée par le préconditionnement ischémique. *Médecine Sciences*, Vol. 15, Suppl.1, 1999, p.16
10. Cabassi A, Bouchard JF, Dumont EC, Girouard H, Le Jossec M, Lamontagne D, Besner JG et de Champlain J. Rôle du stress oxydatif dans le développement de la tolérance aux nitrates dans l'hypertension artérielle

- expérimentale. *Arch. Mal. Cœur*, Tome 91, Hors série, Déc 98, Clinique, O39, p.16.
11. J-F Bouchard, J. Chouinard et D. Lamontagne. Rôle protecteur des inhibiteurs de la cyclooxygénase sur la fonction endothéliale au cours de l'ischémie cardiaque. *Arch. Mal. Cœur*, Tome 91, Hors série, Déc 98, Coeur, P17, p.34
  12. J-F Bouchard, J. Chouinard et D. Lamontagne. Implication des prostaglandines dans la protection endothéliale amenée par le préconditionnement ischémique. *Arch. Mal. Cœur*. Tome 91, Hors série, Déc 98, Coeur, P20, p.34.
  13. J-F Bouchard et Daniel Lamontagne. Rôle protecteur des inhibiteurs de la cyclooxygénase sur la fonction endothéliale au cours de l'ischémie cardiaque. *Médecine Sciences* Vol. 14, Suppl.2, 1998, Prix Hans Seyle, p.46
  14. V Bodart, N McNicoll, P Carrière, J-F Bouchard, D. Lamontagne, T. Sejlitz and H Ong. Identification and characterization of a new GHRP receptor in the heart. *The endocrine Society, Program and abstracts*, P2-239, 1998, p.302.
  15. A Cabassi, J-F Bouchard, EC Dumont, D Lamontagne, J-G Besner, J de Champlain. Oxygen free radicals and coronary vascular dysfunction in hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. Volume 30, Abstract book, 1998, p. A165.
  16. J-F Bouchard and D Lamontagne. The endothelial deleterious effect of arachidonic acid cascade products during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. Volume 30, Abstract book, 1998, p. A189.
  17. Cabassi A, Bouchard J-F, Dumont EC, Lamontagne D, Besner J-G, de Champlain J. Role of oxidative stress in nitrate tolerance in experimental hypertension. *J. of Hypertension* 1998, 16 (suppl. 2): p. S83
  18. J-F Bouchard, J. Chouinard et D. Lamontagne. Implication des récepteurs B<sub>1</sub> aux kinines dans la protection endothéliale amenée par le préconditionnement ischémique. *Arch. Mal. Coeur*. Tome 90, Hors série, Déc 97, Vaisseaux 1, O11, p.9.
  19. Bouchard J-F, J Chouinard, and D. Lamontagne. Rôle des kinines dans la protection endothéliale produite par le préconditionnement ischémique. *Médecine Sciences*. Vol. 13, Suppl.2, 1997, Prix Hans Seyle, p.24
  20. Bouchard J-F, J Chouinard, and D. Lamontagne. Role of kinins in the endothelial protective effect of ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. Vol 29, number 5, may 97, p. A70.
  21. Bouchard J-F, E.C Dumont, and D. Lamontagne. Decreased vascular reactivity to iloprost in diabetic rats. *J. of Hypertension*.

22. Bouchard J-F, E.C Dumont, and D. Lamontagne. Diminution de la réponse vasculaire à l'iloprost chez le rat diabétique. *Médecine Sciences*. Vol. 13, Suppl.1, 1997, p.15
23. E.C Dumont, J-F Bouchard, and D. Lamontagne. Diminution de la réponse contractile de l'aorte de rat diabétique. *Arch. Mal. Coeur*. Tome 89, Hors série, Déc 96, Coeur et vaisseaux, P3, p.31
24. Bouchard J-F, E.C Dumont, and D. Lamontagne. Diminution de la réponse vasculaire à l'iloprost chez le rat diabétique. *Arch. Mal. Coeur*. Tome 89, Hors série, Déc 96, Vaisseaux 1, O9, p.9
25. J-F Bouchard, E.C. Dumont, and D. Lamontagne. Changes in vascular reactivity in aorta and coronary resistance arteries of diabetic rats. *J. Vasc. Res.* Volume 33, Supp 2, 1996, p.31
26. JF Bouchard, and D Lamontagne. Endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated diabetic and non-diabetic rat heart. *FASEB J.* Volume 10, number 3, 1996, p. A606.
27. JF Bouchard, D Lamontagne. Contribution des canaux  $K_{ATP}$  dans la protection de l'endothélium coronaire produit par le pré-conditionnement ischémique. *Médecine Sciences*. Vol 11 (Supp.2), 1995, p.12
28. JF Bouchard, D. Lamontagne. Ischaemic preconditioning protects endothelial function against ischaemic injury in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. Volume 27, Number 6, 1995, p. A150.
29. Bouchard JF, Dumont E, Lamontagne D. Activation of sensitive potassium channels by  $PGI_2$ ,  $PGE_2$  and  $PGD_2$  in the coronary vascular bed of the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* Vol 72 (Supp.1) 1994

#### Bourses et prix:

- |      |   |
|------|---|
| 2000 | Bourse post-doctorale du CRM<br>Bourse post-doctorale du FRSQ (déclinée)<br>Bourse post-doctorale du CRSNG (déclinée)<br>Bourse post-doctorale Jeanne Timmins Costello (déclinée)   |
| 1999 | Prix Parke Davis Centennial Pharmacy Research<br>Prix AFPC-Roche pour la recherche par un étudiant gradué<br>Bourse de la société québécoise d'hypertension artérielle (déclinée)<br>Bourse de doctorat de l'Association Diabète Québec<br>Bourse de l'ACIM-FRS/CRM |

- Bourse du FRSQ pour les détenteurs d'un diplôme professionnel en santé (donnée pour 6 mois)  
Bourse d'excellence de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal (déclinée)
- 1998 Bourse du FRSQ pour les détenteurs d'un diplôme professionnel en santé  
Bourse d'excellence de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal (déclinée)  
Bourse d'excellence Novartis pour le doctorat (acceptée partiellement; cause: cumul)
- 1997 Bourse du FRSQ pour les détenteurs d'un diplôme professionnel en santé  
Bourse d'excellence Novartis pour le doctorat (acceptée partiellement; cause: cumul)  
Bourse d'excellence de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal (déclinée)  
Prix Parke Davis Centennial Pharmacy Research
- 1996 Bourse du FRSQ pour les détenteurs d'un diplôme professionnel en santé  
Bourse d'excellence Sandoz pour le doctorat (acceptée partiellement; cause: cumul)  
Bourse de doctorat AFPC-Merck Frosst-Julien Braun (déclinée; cause: cumul)  
Bourse d'excellence de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal
- 1995 Bourse de maîtrise de l'AFPC Merck Frosst  
Bourse de maîtrise de l'Association Diabète Québec
- 1994 Bourse de maîtrise du GRSNA
- 1993 Bourse du CRM comme stagiaire d'été, Fondation Farquharson.
- 1988 Médaille du Gouverneur Général du Canada