



HAL
open science

Mise en évidence de l'implication du NO dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique chez le rat

Claire Arnaud

► **To cite this version:**

Claire Arnaud. Mise en évidence de l'implication du NO dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique chez le rat. Sciences pharmaceutiques. 2000. dumas-01468251

HAL Id: dumas-01468251

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01468251>

Submitted on 15 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



2^e exemplaire

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2000

N° d'ordre :

7039

MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DU NO
DANS LA CARDIOPROTECTION INDUITE PAR LE STRESS
HYPERTHERMIQUE CHEZ LE RAT

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

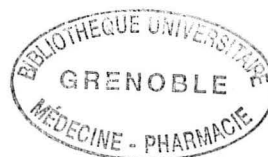
Claire ARNAUD

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le 10 Novembre à 18 heures
Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur **Pierre DEMENGE**
Monsieur le Professeur **Christophe RIBUOT**
Madame le Docteur **Marie FAURE**
Madame le Docteur **Sandrine LECOUR**
Monsieur le Docteur **Serge BOTTARI**

Président du Jury
Directeur de thèse



**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2000

N° d'ordre :

**MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DU NO
DANS LA CARDIOPROTECTION INDUITE PAR LE STRESS
HYPERTHERMIQUE CHEZ LE RAT**

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

Claire ARNAUD

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le 10 Novembre à 18 heures
Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur **Pierre DEMENGE**

Monsieur le Professeur **Christophe RIBUOT**

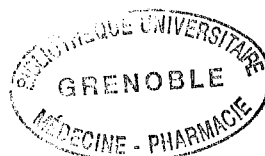
Madame le Docteur **Marie FAURE**

Madame le Docteur **Sandrine LECOUR**

Monsieur le Docteur **Serge BOTTARI**

Président du Jury

Directeur de thèse



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	<i>Josette</i>	<i>Chimie Analytique</i>
BAKRI	<i>Abdelaziz</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>
BENOIT-GUYOD	<i>Jean-Louis</i>	<i>Chimie Toxicologie et Eco- toxicologie</i>
CALOP	<i>Jean</i>	<i>Pharmacie Clinique et Bio- technique</i>
CUSSAC	<i>Max</i>	<i>Chimie Thérapeutique</i>
DECOUT	<i>Jean-Luc</i>	<i>Chimie Générale</i>
DEMENGE	<i>Pierre</i>	<i>Physiologie/Pharmacologie</i>
DROUET	<i>Emmanuel</i>	<i>Microbiologie-Immunologie</i>
FAVIER	<i>Alain</i>	<i>Biochimie</i>
GOULON	<i>Chantal</i>	<i>Physique-Pharmacie</i>
GRILLOT	<i>Renée</i>	<i>Parasitologie</i>
MARIOTTE	<i>Anne-Marie</i>	<i>Pharmacognosie</i>
RIBUOT	<i>Christophe</i>	<i>Physiologie-Pharmacologie</i>
ROUSSEL	<i>Anne-Marie</i>	<i>Biochimie</i>
SEIGLE-MURANDI	<i>Françoise</i>	<i>Botanique et Cryptogamie</i>
STEIMAN	<i>Régine</i>	<i>Biologie Cellulaire</i>
WOUESSIDJEWÉ	<i>Denis</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

MAITRES DE CONFÉRENCE DE PHARMACIE

ALDEBERT	<i>Delphine</i>	<i>Parasitologie</i>
ALLENET	<i>Benoit</i>	<i>Pharmacie Clinique</i>
BARTOLI	<i>Marie-Hélène</i>	<i>Pharmacie Clinique et Biotech.</i>
BOUMENDJEL	<i>Ahcène</i>	<i>Pharmacognosie</i>
BURMEISTER	<i>Wilhelm</i>	<i>Physique</i>
CARON	<i>Cécile</i>	<i>Biologie Moléculaire</i>
CHARLON	<i>Claude</i>	<i>Chimie Pharmacie</i>
DELETRAZ	<i>Martine</i>	<i>Droit Economie pharmaceutique</i>
DIJOUX-FRANCA	<i>M.-Geneviève</i>	<i>Pharmacognosie</i>
DURMORT-MEUNIER	<i>Claire</i>	<i>Virologie moléculaire structur</i>
ESNAULT	<i>Danielle</i>	<i>Chimie Analytique</i>
FAURE	<i>Patrice</i>	<i>Biochimie C</i>
FAURE-JOYEUX	<i>Marie</i>	<i>Physiologie-Pharmacologie.</i>
FOUCAUD-GAMEN	<i>Jacqueline</i>	<i>Bactériologie-Virologie.</i>
GEZE	<i>Annabelle</i>	<i>Pharmacotechnie Galénique</i>
GILLY	<i>Catherine</i>	<i>Chimie Thérapeutique</i>
GUIRAUD	<i>Pascale</i>	<i>Biologie cellulaire</i>
GROSSET	<i>Catherine</i>	<i>Chimie analytique</i>
HININGER-FAVIER	<i>Isabelle</i>	<i>LBSO-Biochimie C</i>
KRIVOBOK	<i>Serge</i>	<i>Botanique-Cryptogamie</i>
MORAND	<i>Jean-Marc</i>	<i>Chimie thérapeutique</i>
NICOLLE	<i>Edwige</i>	<i>Chimie organique</i>
PERA	<i>Marie-Hélène</i>	<i>Chimie organique</i>
PEYRIN	<i>Eric</i>	<i>Chimie Analytique Alimentaire</i>
PINEL	<i>Claudine</i>	<i>Parasitologie</i>
RAVEL	<i>Anne</i>	<i>Chimie Analytique</i>
RIBUOT	<i>Diane</i>	<i>Physio. Pharmaco</i>
RICHARD	<i>Jean-Michel</i>	<i>Chimie Toxic-Ecotoxicologie</i>
RIONDEL	<i>Jacqueline</i>	<i>Physiologie Pharmacologie</i>
TAILLANDIER	<i>Georges</i>	<i>Chimie organique</i>
VILLEMAIN	<i>Danièle</i>	<i>Physique Pharmacie</i>
VILLET	<i>Annick</i>	<i>Chimie analytique</i>

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire du stress cardiovasculaire et des pathologies associées (LSCPA), à la faculté de Pharmacie de Grenoble.

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Les membres du jury :

Monsieur le Professeur Pierre Demenge qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui, par son enseignement, a su me transmettre sa passion pour la pharmacologie.

Monsieur le Professeur Christophe Ribuot qui m'a orientée vers la recherche alors que je voulais 'tout arrêter' et qui, par sa rigueur scientifique et ses qualités humaines, nous permet à tous de travailler dans un climat agréable.

Madame le Docteur Marie Faure avec qui j'ai réalisé mes premières 'manips'. Un grand merci pour ta patience, ton aide et ta bonne humeur.

Madame le Docteur Sandrine Lecour à qui j'ai dérobé beaucoup de temps, dans des moments pas toujours très propices. Merci pour ta disponibilité, tes conseils précieux et ton enthousiasme débordant.

Monsieur le Docteur Serge Bottari qui a accepté de participer à ce jury de thèse et avec qui nous établirons, je l'espère, une grande collaboration. Merci pour votre bonne humeur et votre enthousiasme.

Tous mes remerciements à **Monsieur le Professeur Luc Rochette** qui m'a permis de réaliser une grande partie de ce travail dans son laboratoire de physiopathologie et pharmacologie cardiovasculaire expérimentale (LPPCE), à Dijon. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux et pour son accueil si chaleureux au sein de son équipe.

Enfin, un grand merci à toute l'équipe, et notamment à Diane pour son entrain, et à Caro pour son aide et son amitié.

Encore deux mots...

Merci à ma petite famille,

A mes parents, qui m'ont laissées foncer,

A Pascale, Yann, Romain et Florent, pour leur présence et leur soutien,

Et enfin, à Ronald, parce que tu es là...

SOMMAIRE

A. Introduction	13
------------------------------	-----------

B. Partie Bibliographique	16
--	-----------

1. Stress Hyperthermique.....	17
--------------------------------------	-----------

1.1 Les protéines de stress.....	17
---	-----------

1.1.1 Généralités / Synthèse des HSP.....	17
---	----

1.1.2 HSP et cardioprotection.....	20
------------------------------------	----

1.1.2.1 HSP 70	20
----------------------	----

1.1.2.2 HSP 27.....	21
---------------------	----

1.2 Médiateurs impliqués dans la cardioprotection	22
--	-----------

1.2.1 Les récepteurs α_1 -adrénergiques	23
--	----

1.2.2 Les protéines kinases	23
-----------------------------------	----

1.2.2.1 Protéines kinases C	23
-----------------------------------	----

1.2.2.2 Tyrosine kinases	24
--------------------------------	----

1.2.2.3 MAP kinases	24
---------------------------	----

1.2.3 Les canaux potassiques ATP-dépendants	27
---	----

1.2.4 Les enzymes antioxydantes	29
---------------------------------------	----

1.2.5 Lien entre médiateurs impliqués dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique et les HSP	30
---	----

2. Monoxyde d'azote	31
----------------------------------	-----------

2.1 Les NO synthases	31
-----------------------------------	-----------

2.1.1 NOS neuronale	33
---------------------------	----

2.1.2 NOS constitutive	33
------------------------------	----

2.1.3 NOS inductible	33
----------------------------	----

2.2 Rôles du NO	34
------------------------------	-----------

2.3 Implication du NO dans les mécanismes cardioprotecteurs	35
2.3.1 Préconditionnement ischémique	35
2.3.2 Préconditionnement par le MLA	36
2.3.3 Interaction NO-canaux K_{ATP}	37
3. Conclusion	38

C. Partie expérimentale	40
--------------------------------------	----

1. Objectifs de l'étude	41
--------------------------------------	----

2. Matériel et Méthodes	42
--------------------------------------	----

2.1 Modèle expérimental	42
--------------------------------------	----

2.1.1 Matériel biologique	42
---------------------------------	----

2.1.2 Stress hyperthermique	42
-----------------------------------	----

2.1.3 Traitements pharmacologiques	42
--	----

2.2 Étude sur cœur isolé perfusé selon la technique de Langendorff	43
---	----

2.2.1 Groupes expérimentaux	43
-----------------------------------	----

2.2.2 Modèle de Langendorff	43
-----------------------------------	----

2.2.2.1 Paramètres hémodynamiques	44
---	----

2.2.2.2 Détermination de la taille de l'infarctus	44
---	----

2.3 Détection des protéines de stress	45
--	----

2.3.1 Groupes expérimentaux	45
-----------------------------------	----

2.3.2 Immunohistochimie	45
-------------------------------	----

2.4 Dosage du NO	46
-------------------------------	----

2.4.1 Groupes expérimentaux	46
-----------------------------------	----

2.4.2 Technique de dosage du NO	46
---------------------------------------	----

2.4.3 Prélèvement des tissus et du sang total	47
---	----

2.4.4 Spectroscopie RPE	47
-------------------------------	----

2.5 Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase	48
2.5.1 Groupes expérimentaux	48
2.5.2 Préparation des homogénats tissulaires	48
2.5.3 Dosage de l'activité SOD	49
2.6 Analyse statistique	49
3. Résultats	51
3.1 Cœur isolé	51
3.1.1 Paramètres hémodynamiques	51
3.1.2 Taille de l'infarctus	54
3.2 Détection des protéines de stress par immunohistochimie	56
3.2.1 HSP 27	56
3.2.2 HSP 70	56
3.3 Dosage du NO	59
3.3.1 Teneurs tissulaires en NO	59
3.3.2 Teneurs sanguines en NO	61
3.4 Dosage de l'activité Superoxyde Dismutase	63
3.4.1 Activité de la Mn-SOD	63
3.4.2 Activité de la Cu,Zn-SOD	64
4. Discussion	65

D. Conclusion	74
----------------------------	----

E. Références Bibliographiques	77
---	----

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>AT</i>	3-Aminotriazole
<i>BH₄</i>	6(R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine
<i>Canaux K_{ATP}</i>	Canaux potassiques ATP-dépendants
<i>Cu,Zn SOD</i>	SOD-cuivre, zinc (cytosolique)
<i>DC</i>	Débit Coronaire
<i>EDRF</i>	Endothelium-Derived Relaxing Factor
<i>ERKs</i>	Extracellular-signal Regulated Kinases
<i>FAD</i>	Flavine Adénine Dinucléotide
<i>FC</i>	Fréquence Cardiaque
<i>FMN</i>	Flavine Adénine Mononucléotide
<i>HbNO</i>	Nitrosylhémoglobine
<i>HS</i>	Stress Hyperthermique
<i>HSE</i>	Heat Shock Element
<i>HSF</i>	Heat Shock Factor
<i>HSP</i>	Protéines de stress
<i>I</i>	Zone infarctée du ventricule gauche
<i>L-NAME</i>	Nitro- L-Arginine-Méthylester
<i>L-NIL</i>	L-N ⁶ -(1-imino-ethyl)lysine
<i>LPS</i>	Lipopolysaccharide bactérien
<i>MAPKs</i>	Mitogen Activated Protein Kinases
<i>MetHb</i>	Méthémoglobine
<i>MGD</i>	N-méthyl-D-glucamine dithiocarbamate
<i>MLA</i>	Monophosphoryl Lipid A
<i>Mn-SOD</i>	SOD-manganèse (mitochondriale)
<i>NADPH</i>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate réduit

<i>NO</i>	Monoxyde d'azote
<i>NOS</i>	NO synthase
<i>NOS_e</i>	NOS endothéliale
<i>NOS_i</i>	NOS inductible
<i>NOS_n</i>	NOS neuronale
<i>O₂⁻</i>	Anion superoxyde
<i>PdVG</i>	Pression développée par le ventricule gauche
<i>PKC</i>	Protéine kinase C
<i>R</i>	Zone à risque
<i>RLO</i>	Radicaux Libres dérivés de l'Oxygène
<i>RPE</i>	Résonance Paramagnétique Électronique
<i>SAPKs</i>	Stress Activated Protein Kinases
<i>SOD</i>	Superoxyde Dismutase
<i>UA</i>	Unité Arbitraire
<i>VG</i>	Ventricule Gauche



LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Inducteurs de la réponse cellulaire au stress	18
Figure 2 : La voie des ERKs et des SAPKs	25
Figure 3 : Canaux potassiques ATP-dépendants : Canaux sarcolémiques <i>versus</i> mitochondriaux	28
Figure 4 : Domaines structuraux du dimère des NO synthases	32
Figure 5 : Réaction de synthèse du NO	32
Figure 6 : Voies de signalisation hypothétiques de la cardioprotection induite par le stress hyperthermique	39
Figure 7 : Produit pression développée x fréquence cardiaque	53
Figure 8 : Zone à risque exprimée en pourcentage du ventricule gauche	55
Figure 9 : Taille de l'infarctus exprimée en pourcentage de la zone à risque	55

Figure 10 :	
Immunomarquage des HSP 27 sur des ventricules gauches de rats	57
Figure 11 :	
Immunomarquage des HSP 70 sur des ventricules gauches de rats	58
Figure 12 :	
Spectre caractéristique du complexe [(MGD) ₂ -Fe ²⁺ -NO]	
obtenu en RPE sur le rein	59
Figure 13 :	
Spectre caractéristique du complexe HbNO obtenu en RPE	61
Figure 14 :	
Activité de la SOD mitochondriale	63
Figure 15 :	
Activité de la SOD cytosolique	64
Figure 16 :	
Contrôle des taux de NO.....	66
Figure 17 :	
Voies possibles de production et de métabolisation	
des radicaux libres dérivés de l'oxygène lors de la reperfusion	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :

Évolution de la pression développée par le ventricule gauche 51

Tableau 2 :

Évolution du débit coronaire 52

Tableau 3 :

Évolution de la fréquence cardiaque 52

Tableau 4 :

Zone à risque et infarctus, exprimés en pourcentage du ventricule gauche 54

Tableau 5 :

Quantités de NO exprimées en UA/g de tissu frais
et détectées dans différents organes 60

Tableau 6 :

Quantités de HbNO et MetHb, exprimées en UA 62

INTRODUCTION

A. INTRODUCTION

L'infarctus du myocarde reste la cause la plus fréquente de décès, chez l'Homme, dans les pays industrialisés. Une meilleure compréhension des mécanismes protecteurs endogènes pourrait conduire à une amélioration de la récupération du myocarde lors de la reperfusion post-ischémique.

En effet, le cœur peut être protégé contre les lésions causées par une séquence d'ischémie-reperfusion grâce à l'activation de mécanismes protecteurs intrinsèques. Au cours des vingt dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à ces mécanismes, parmi lesquels nous pouvons distinguer le préconditionnement ischémique et le stress hyperthermique.

Le préconditionnement ischémique se caractérise par de brèves séquences d'ischémie-reperfusion, précédant une période d'ischémie prolongée (Murry et al, 1986). Ce préconditionnement permet une meilleure récupération fonctionnelle post-ischémique (Bolli et al, 1997), une réduction de l'incidence des arythmies (Hagar et al, 1991) et une restriction de la nécrose cellulaire (Murry et al, 1986).

Le stress hyperthermique induit la synthèse de protéines de stress, les HSP, qui semblent impliquées dans la survie cellulaire suite à un stress délétère comme la séquence ischémie-reperfusion (Currie et al, 1988 ; Yellon et al, 1992 ; Marber et al, 1995). D'autre part, il a été montré une amélioration de la récupération fonctionnelle post-ischémique (Currie et al, 1988), une diminution de l'incidence des arythmies (Joyeux et al, 1997a), ainsi qu'une diminution de la taille de l'infarctus observé après une séquence d'ischémie-reperfusion (Donnelly et al, 1992 ; Joyeux et al, 1999), sur différents modèles animaux préalablement soumis à un stress hyperthermique.

Dans la première partie bibliographique de cette thèse, nous ferons tout d'abord un rappel général sur le stress hyperthermique et la cardioprotection associée, dans lequel nous aborderons les protéines de stress ainsi que les médiateurs impliqués. Puis, nous nous intéresserons au monoxyde d'azote qui semble jouer un rôle primordial dans divers mécanismes cardioprotecteurs.

La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée à l'étude expérimentale de l'implication du monoxyde d'azote dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique, chez le rat.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

B. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le stress hyperthermique

1.1 Les protéines de stress

1.1.1 Généralités / Synthèse des HSP

Le stress hyperthermique a été décrit pour la première fois par Currie et White, en 1983, comme le moyen d'induire la synthèse de protéines de stress (HSP), plus communément appelées HSP, dans de nombreux organes et notamment au niveau du cœur.

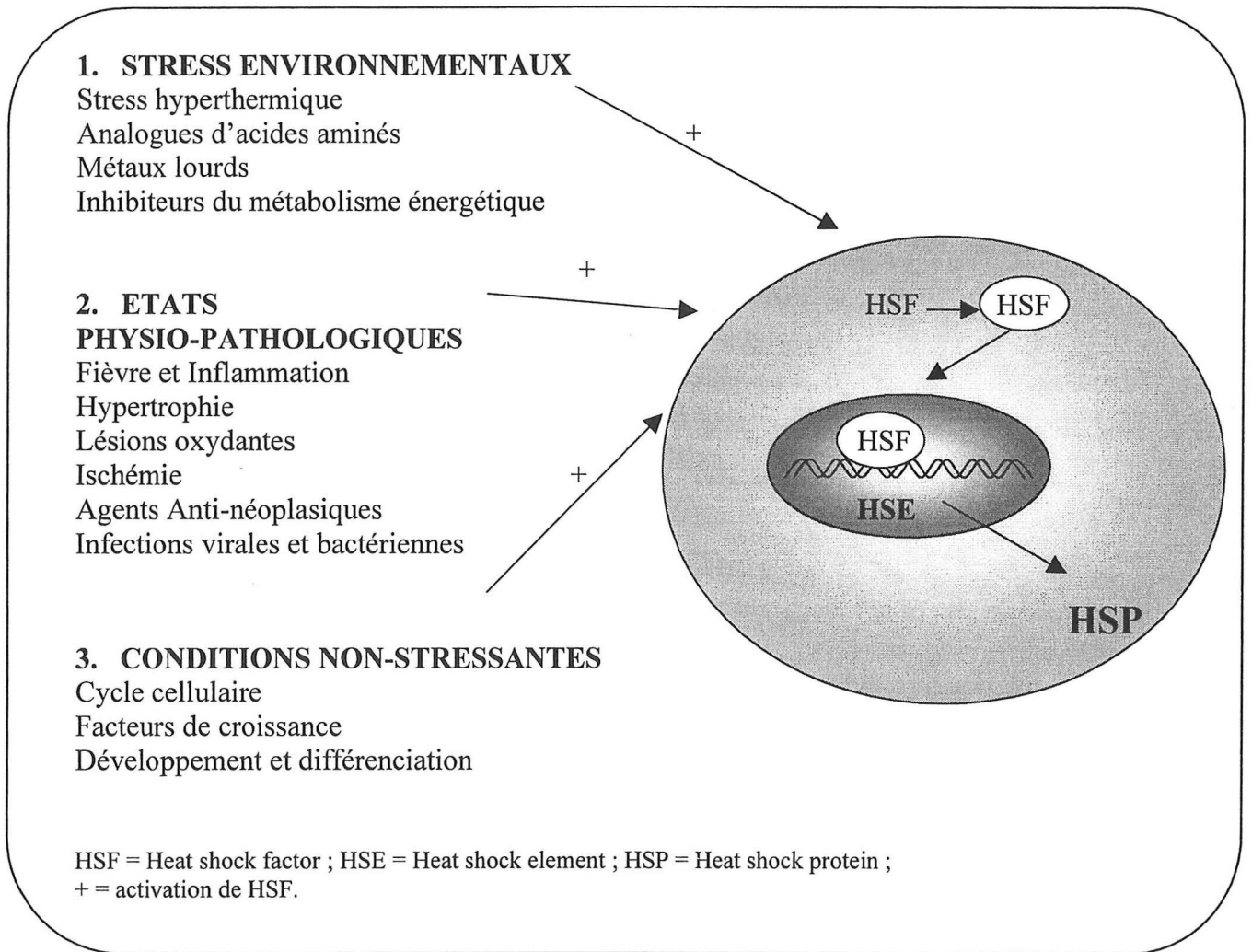
Les HSP sont synthétisées dans les cellules en réponse à différents stress, tout comme lors du développement normal d'un organisme (Schlesinger, 1990). La synthèse d'HSP constitue une phase de la réponse adaptative des cellules à différents stress. Elle peut aussi être régulée dans des conditions physiologiques telles que le développement cellulaire par exemple (Burel et al, 1992).

Une courte exposition des cellules à divers stress induit l'expression rapide d'HSP (Ding et al, 1997, Lindquist et Craig, 1988). Même si les mécanismes impliqués dans cette synthèse ne sont pas totalement connus, il semblerait que, suite au stress, certaines protéines kinases soient activées, induisant l'activation de facteurs de régulation, puis de gènes spécifiques.

L'activation de la transcription des gènes Heat shock fait intervenir deux facteurs de transcription essentiels : les Heat shock factors 1 et 2 (HSF). Leur différence réside dans le fait que HSF1 nécessite une agression cellulaire pour se lier à l'ADN alors que l'affinité de HSF2 est constitutive.

A l'état normal, HSF1 inactivé est sous forme de monomère, lié aux HSP 70 cytosoliques. Lors d'un stress, HSF1 se sépare des HSP 70 et forme un trimère qui est sa forme active. Après avoir été phosphorylé, ce trimère subit alors une translocation vers le noyau où il se lie au Heat Shock Element (HSE), situé sur la région promotrice du gène Heat Shock, induisant l'expression de ce dernier (Ding et al, 1997 ; Kim et al, 1995) (figure 1).

Fig. 1. **Inducteurs de la réponse cellulaire au stress** (D'après Morimoto et al, 1992)



Outre le stress hyperthermique, consistant à élever la température rectale des animaux à 42°C et la maintenir ainsi 15 minutes, d'autres stress sont aussi capables d'induire la synthèse de protéines de stress. Des agents pharmacologiques, comme les amphétamines (Maulik et al, 1994), le lipopolysaccharide bactérien (LPS) (Meng et al, 1996a) ou le monophosphoryl lipid A (MLA) (Nayeem et al, 1997) ont été utilisés pour l'induction de la protection myocardique et de la synthèse d'HSP. Au niveau cardiaque, il a été montré qu'une séquence d'ischémie-reperfusion induisait l'expression rapide des ARNm codant pour les HSP 70 (Mehta et al, 1988). Plus récemment, il a été mis en évidence une rapide induction de l'expression des gènes codant pour les HSP ainsi que leur traduction en protéines, dans des cœurs de lapin, suite à une séquence d'ischémie-reperfusion *in vivo* (Knowlton et al, 1991 ; Heads et al, 1995).

De plus, les différents composants de la séquence ischémie-reperfusion, comme l'hypoxie ou la libération de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO), sont aussi capables d'induire l'expression des HSP 70 (Kukreja et al, 1994 ; Das et al, 1995).

Les HSP sont des protéines dont l'expression est ubiquitaire. On peut classer ces protéines de stress en 5 familles selon leur poids moléculaire qui varie de 20 à 100 kiloDalton. Les HSP 60, 90 et 110 sont exprimées constitutivement ou suite à différents stress. L'expression des HSP 27 est induite suite au stress hyperthermique (Kiang & Tsokos, 1998), néanmoins la plupart des travaux se sont penchés sur les HSP 70. Dans cette famille, nous pouvons distinguer les HSP 73, constitutives, des HSP 72, principalement induites en réponse à un stress (Lindquist et Craig, 1988 ; Knowlton, 1995).

Les HSP semblent jouer un rôle majeur dans l'adaptation de la cellule à son environnement. Elles sont considérées comme de véritables chaperons moléculaires et sont indispensables à la croissance, à la maturation, ainsi qu'à la survie de la cellule, par interaction avec les protéines cellulaires (Schlesinger, 1990). En effet, ces protéines s'associent à d'autres protéines dénaturées pour prévenir leur agrégation, éliminer les protéines anormales et faciliter le transfert vers différents organites intracellulaires tels que les mitochondries, le reticulum endoplasmique, les lysosomes ou le noyau (Knowlton, 1995).

La synthèse d'HSP est donc une réponse adaptative de la cellule et permet à l'organisme de se protéger contre un stress ultérieur plus intense (Lindquist & Craig, 1988).

1.1.2 HSP et cardioprotection

De nombreuses études se sont intéressées à l'implication des protéines de stress dans les mécanismes cardioprotecteurs. En effet, il a été montré que le stress hyperthermique entraînait une protection du myocarde vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion (Currie et al, 1988). Cette cardioprotection apparaît 24 heures après l'hyperthermie et est comparable à celle induite lors de la seconde fenêtre du préconditionnement ischémique (Parrat & Szekeres, 1995 ; Yellon & Baxter, 1995). D'autre part, 24 heures après ce stress, l'expression des HSP est maximale (Currie & White, 1983).

1.1.2.1 HSP 70

L'induction de l'expression des HSP 70, 24 heures après le stress hyperthermique, est désormais bien connue. Donnelly et ses collaborateurs (1992) ont montré, chez le rat *in vivo*, que l'hyperthermie entraînait une induction des HSP 72 associée à une diminution de la taille de l'infarctus suite à une séquence ischémie-reperfusion. Ces résultats ont été confirmés, par la suite, dans d'autres modèles *in vivo* (Marber et al, 1993), ainsi que dans des modèles de cœurs isolés perfusés (Walker et al, 1993 ; Joyeux et al, 1999).

Il semblerait, de plus, que le degré de protection myocardique soit directement corrélé avec les taux de HSP 70 induites suite au stress hyperthermique. Ceci a été montré chez le rat (Hutter et al, 1994) et chez le lapin (Marber et al, 1994). D'autre part, des études utilisant des souris transgéniques surexprimant les HSP 70 ont montré une diminution de la taille de l'infarctus suite à une séquence d'ischémie-reperfusion, par rapport à des souris non transgéniques (Marber et al, 1995 ; Hutter et al, 1996).

De nombreuses études se sont aussi intéressées aux effets protecteurs du stress hyperthermique au niveau cellulaire. Cumming et ses collaborateurs (1996) ont montré, sur des cultures primaires de cardiomyocytes de rat, que le stress hyperthermique induisait la synthèse d'HSP 70 et protégeait les cellules contre une hyperthermie létale ou une ischémie simulée ultérieure. Il semble donc que les HSP 70 soient des effecteurs de la protection cellulaire induite par le stress hyperthermique (Nayeem et al, 1997).

1.1.2.2 HSP 27

Plus récemment, les recherches se sont tournées vers le rôle éventuel des HSP de bas poids moléculaires (HSP 27) dans les mécanismes cardioprotecteurs.

En effet, dans des cardiomyocytes de rat, la surexpression des HSP 27 induit une résistance contre les lésions provoquées par une ischémie simulée (Martin et al, 1997). De même, d'autres équipes suggèrent que la cytoprotection retardée contre l'ischémie simulée pourrait être médiée par l'induction et l'accumulation des HSP 27 (Lavoie et al, 1993 ; Loktionova et al, 1998). Ces protéines joueraient un rôle protecteur en s'associant avec différentes structures du cytosquelette et en stabilisant les microfilaments d'actine (Lavoie et al, 1993 ; Huot et al, 1996).

1.2 Médiateurs impliqués dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique

Comme nous l'avons vu précédemment, la cardioprotection induite 24 heures après le stress hyperthermique est analogue à celle induite lors de la seconde fenêtre du préconditionnement ischémique (Parrat & Szekeres, 1995 ; Yellon & Baxter, 1995). Ces dernières années, de nombreuses équipes ont tenté d'identifier les divers médiateurs impliqués dans le préconditionnement ischémique.

Il semble que l'activation des récepteurs à l'adénosine (Baxter et al, 1994), la stimulation des diverses isoformes de la PKC (Baxter et al, 1995), des tyrosines kinases, ainsi que l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants (Tanno et al, 2000) soient impliquées dans ce mécanisme cardioprotecteur. Des études récentes ont suggéré que le préconditionnement retardé est médié par la production de monoxyde d'azote (NO) et d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (RLO). En effet, il a été montré qu'un inhibiteur des NO synthases abolissait la protection induite par le préconditionnement ischémique (Bolli et al, 1997) et que l'induction et l'activation des NO synthases étaient nécessaires au développement de la seconde fenêtre de préconditionnement dans un modèle de lapin *in vivo* (Zhao et al, 1997 ; Imagawa et al, 1997). D'autre part, certaines études suggèrent que la production de RLO lors du préconditionnement est indispensable à la cardioprotection retardée (Sun et al, 1996 ; Zhou et al, 1996). La production initiale de RLO induirait l'activation de divers systèmes de défenses antioxydantes, tels que la superoxyde dismutase (SOD). En effet, une corrélation entre la deuxième fenêtre de préconditionnement et la SOD mitochondriale (Mn-SOD) a été établie dans différents modèles (Hoshida et al, 1993 ; Yamashita et al, 1994). Une augmentation des défenses antioxydantes serait donc bénéfique pour s'opposer à la libération massive de RLO lors de la reperfusion qui sont responsables des lésions d'ischémie-reperfusion.

Ainsi, les médiateurs impliqués dans le préconditionnement ischémique pourraient potentiellement jouer un rôle dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique.

1.2.1 Les récepteurs α_1 -adrénergiques

Il a été montré que le prétraitement des animaux par la noradrénaline (NA) induisait une cardioprotection retardée contre les dysfonctions post-ischémiques, ainsi qu'une induction de l'expression des HSP 72, sur un modèle de cœur isolé de rat (Meng et al, 1996b). Kregel et ses collaborateurs (1991, 1993) ont montré que le stress hyperthermique était capable d'augmenter les concentrations plasmatiques de noradrénaline chez le rat. Il semble que l'effet cardioprotecteur du stress hyperthermique passe par la synthèse de noradrénaline et par son action sur les récepteurs α_1 -adrénergiques (Meng et al, 1996b). En effet, il a été montré, plus récemment, que les récepteurs α_1 -adrénergiques étaient impliqués dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique, puisqu'un antagoniste de ces récepteurs, la prazosine, abolit totalement cette protection (Joyeux et al, 1998).

1.2.2 Les protéines kinases

1.2.2.1 Protéines kinases C

Plusieurs équipes ont montré une implication des différentes isoformes des PKC dans la cardioprotection observée lors de la seconde fenêtre du préconditionnement ischémique (Baxter et al, 1995 ; Yamashita et al, 1994). Joyeux et ses collaborateurs (1997b) ont, depuis, mis en évidence un rôle de ces protéines kinases C dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique. En effet, il a été montré que la résistance acquise 24 heures après l'hyperthermie contre l'infarctus du myocarde est totalement abolie par la chélerythrine, un inhibiteur spécifique des protéines kinases C, administrée au moment du stress (Joyeux et al, 1997b). L'activation des protéines kinases C semble donc participer à la protection retardée induite par le stress hyperthermique, comme par le préconditionnement ischémique.

1.2.2.2 Tyrosine kinases

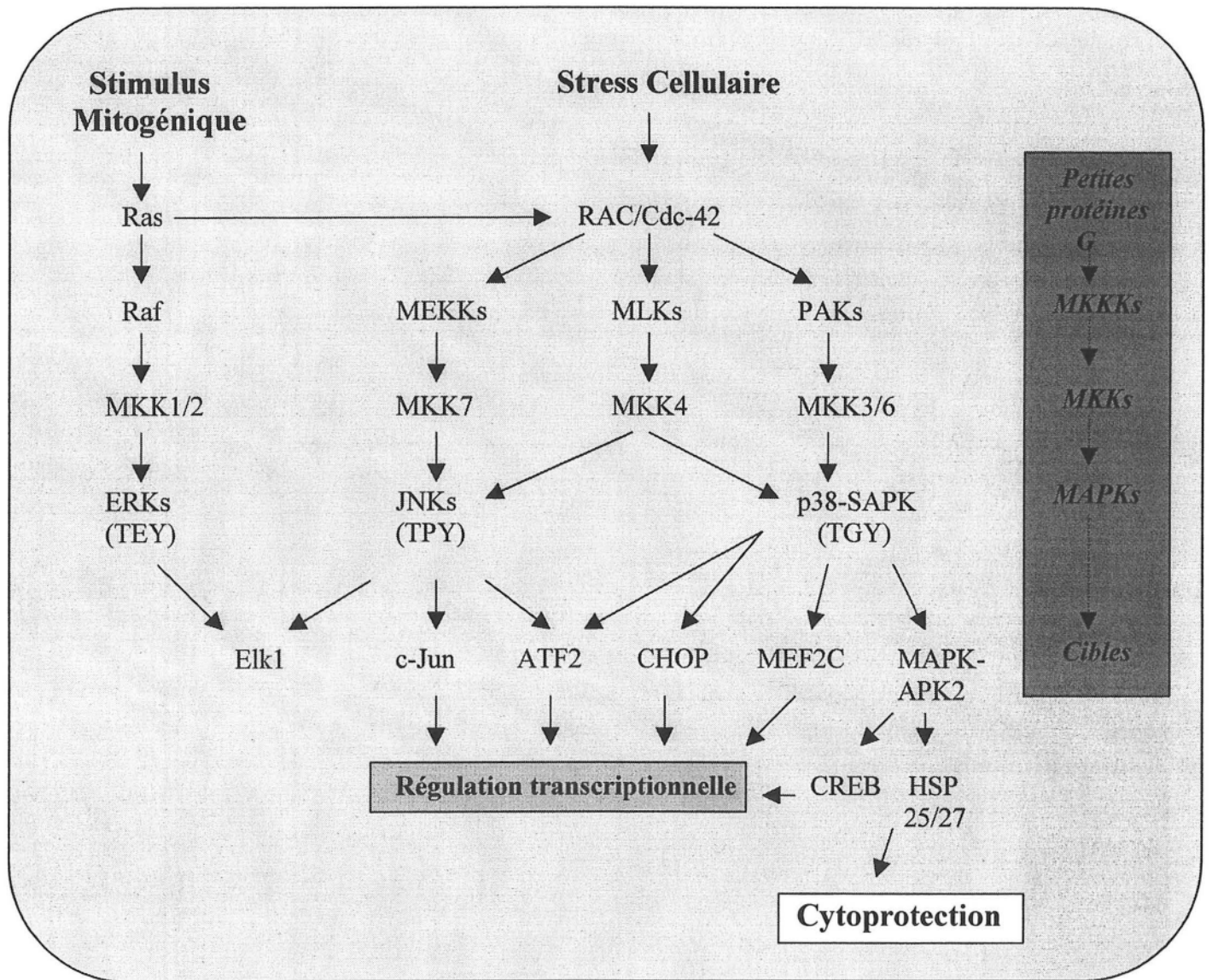
D'autre part, Imagawa et ses collaborateurs (1997) ont montré, grâce à l'utilisation de la génistéine, un inhibiteur de la tyrosine kinase, que l'activation de celle-ci jouait un rôle lors de la seconde fenêtre du préconditionnement ischémique, chez le lapin *in vivo*. En revanche, il semble que la cardioprotection induite par le stress hyperthermique chez le rat, soit conservée suite à un traitement à la génistéine (Joyeux et al, 1997b).

La tyrosine kinase ne semble donc pas intervenir dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique mais ceci reste à confirmer par l'utilisation d'autres inhibiteurs des tyrosines kinases.

1.2.2.3 MAP kinases

Une des voies de transduction majeures, mise en jeu dans les cellules suite à des modifications environnementales et qui conduit à une modification de l'expression génique, est la voie des MAP kinases. Ce mécanisme de transduction implique une succession de phosphorylations/déphosphorylations de résidus sérine/thréonine qui aboutit à l'amplification rapide du signal. Les kinases impliquées dans cette voie de transduction sont les MAP (Mitogen Activated Protein) kinases et on peut distinguer trois sous familles, les ERKs (Extracellular signal Regulated Kinases), les SAPKs (Stress Activated Protein Kinases) et les JNKs (Jun N-Terminal Kinases) (Kyriakis & Avruch, 1996) (figure 2).

Fig. 2. La voie des ERKs et des SAPKs (Sugden & Clerk, 1998)



ATF : Activating Transcription factor ; CHOP : C/EBP Homologous protein ; CREB : Cyclic-AMP Response Element-Binding protein ; ERK : Extracellular signal Regulated Kinase ; HSP : Heat Shock Protein ; JNK : Jun N-Terminal Kinase ; MAP : Mitogen Activated Protein ; MAPK : MAP-kinase ; MKKK : MAP kinase-kinase-kinase ; MAPKAPK : MAP Kinase-Activated Protein Kinase ; MEF : Myocyte Enhancer Factor ; MLK : Mixed Lineage Kinase ; PAK : p21-Activated Kinase ; SAPK : Stress Activated Protein Kinase ; TEY, TPY, TGY : Séquences consensus, Thréonine-Glutamate/Proline/Glycine-Tyrosine.

Les cascades de phosphorylation mettent en jeu des MAP kinase-kinase-kinases, des MAP kinase-kinases et des MAP kinases dont les substrats sont des facteurs de transcription et une kinase particulière, la MAPKAPK2. Cette kinase contribue à la phosphorylation des protéines de stress de bas poids moléculaires, les HSP 27, qui semblent jouer un rôle cytoprotecteur (Stokoe et al, 1992).

En effet, plus que leur induction, il semble que l'état de phosphorylation des HSP 27 soit primordial dans les mécanismes protecteurs (Huot et al, 1996) et il semble que la voie des MAP kinases soit fortement impliquée dans ce mécanisme (Clerk et al, 1998). D'autre part, une équipe a montré, sur une lignée de myoblastes de rat, que des séquences répétées d'hypoxie-réoxygénation induisait la redistribution des HSP 27 du cytosol vers le cytosquelette et qu'un inhibiteur de la p38 MAP kinase abolissait cette redistribution des HSP 27 ainsi que l'effet cardioprotecteur du préconditionnement (Sakamoto et al, 1998). Il semble donc que la protection induite par le préconditionnement passe par les HSP 27, après leur phosphorylation par la voie des MAP kinases. En effet, deux études récentes ont établi un lien direct entre la cardioprotection induite par le préconditionnement ischémique et l'état des HSP 27 (Dana et al, 2000 ; Sakamoto et al, 2000). Il se pourrait que l'activation de la protéine kinase C (PKC), suivie de celle de la p38 MAP kinase induisent la phosphorylation des HSP 27 ainsi que leur translocation du cytosol vers le sarcomère. Ceci est en accord avec les résultats des travaux de Eaton et collaborateurs (2000).

Le stress hyperthermique est capable d'activer la p38 MAP kinase (McLaughlin et al, 1996) et une étude récente a montré qu'un inhibiteur de cette kinase abolit totalement la cardioprotection induite par le stress hyperthermique (Joyeux et al, 2000). Il semble donc que la p38 MAP kinase joue un rôle dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique et il serait intéressant d'évaluer l'implication et le rôle exacte des HSP 27 dans ce mécanisme.

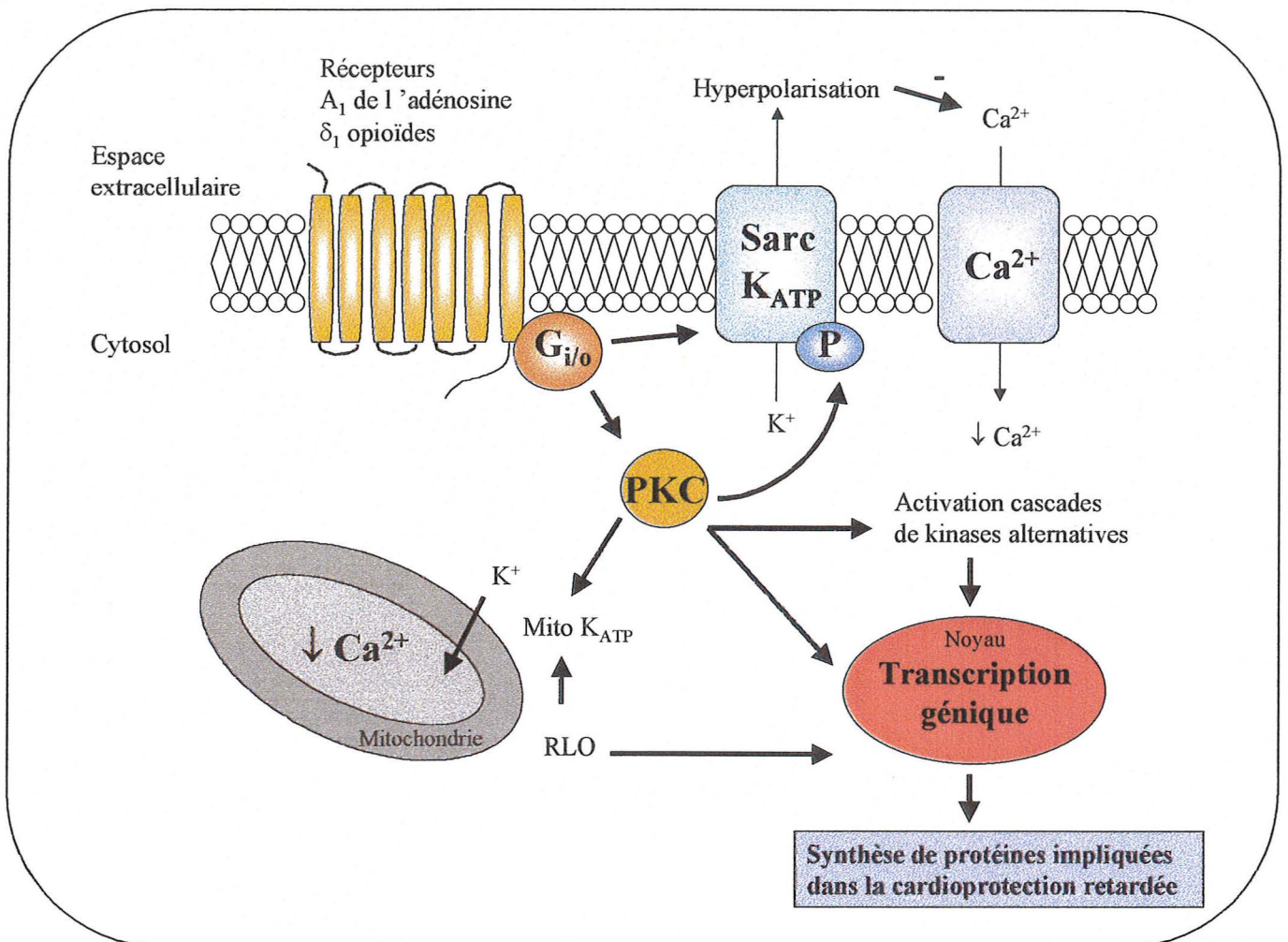
1.2.3 Les canaux potassiques ATP-dépendants

Les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}) myocardiques ont été découverts par Noma qui émit l'hypothèse que ces canaux liaient le métabolisme cardiaque à l'activité électrique de la membrane et que l'ouverture de ces canaux représentait un mécanisme endogène cardioprotecteur (Noma, 1983). Cela a été vérifié dans des modèles variés. En effet, il a été montré que des agonistes des canaux K_{ATP} produisaient un effet bénéfique sur le myocarde dans différents modèles d'ischémie (Grover, 1997) et les canaux K_{ATP} ont été suggérés comme des effecteurs essentiels du préconditionnement ischémique (Parratt & Kane, 1994). D'autre part, il semble que ces canaux soient impliqués lors de la phase précoce tout comme lors de la seconde fenêtre du préconditionnement ischémique. Il semblait, tout d'abord, que les canaux K_{ATP} jouant un rôle dans les mécanismes cardioprotecteurs étaient les canaux sarcolémiques, mais de nombreuses évidences suggèrent que ce sont plutôt les canaux K_{ATP} mitochondriaux qui sont impliqués (Gross & Fryer, 1999) (figure 3).

Le rôle des canaux K_{ATP} a, depuis, été étudié dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique et il semble que ces canaux soient fortement impliqués dans ce mécanisme. En effet, Joyeux et ses collaborateurs (1998) ont montré que la cardioprotection induite par l'hyperthermie était totalement abolie par le glibenclamide ou le 5-hydroxydécanoate, deux inhibiteurs des canaux K_{ATP} , chez le rat *in vitro*. Ces résultats sont concordants avec ceux de Pell et collaborateurs (1997) utilisant un modèle de lapin *in vivo*.

Fig. 3 : Canaux potassiques ATP-dépendants

Canaux sarcolémiques *versus* mitochondriaux (D'après Gross & Fryer, 1999)



Ca²⁺ : ions calcium ; K⁺ : ions potassium ; G_{i/o} : petites protéines G ; Mito K_{ATP} : Canaux potassiques ATP-dépendants mitochondriaux ; P : Phosphorylation ; PKC : Protéine Kinase C ; Sarc K_{ATP} : Canaux potassiques ATP-dépendants sarcolémiques.

Conséquences de l'ouverture des canaux K_{ATP} sarcolémiques :

- Raccourcissement de la durée de la phase 3 du potentiel d'action
- Hyperpolarisation de la membrane
- Diminution de l'entrée de calcium
- Préservation de l'ATP

Conséquences de l'ouverture des canaux K_{ATP} mitochondriaux :

- Dépolarisation de la membrane
- Gonflement de la matrice
- Réduction de la surcharge calcique

1.2.4 Les enzymes antioxydantes

La libération de radicaux libres dérivés de l'oxygène est considérée comme un des mécanismes responsables des lésions d'ischémie-reperfusion (Opie, 1989). L'induction des enzymes antioxydantes suite au stress hyperthermique est assez controversée.

Certaines études ont observé une augmentation de l'activité de la catalase myocardique, 24 heures après l'hyperthermie (Currie et al, 1988 ; Joyeux et al, 1997a). Cette enzyme antioxydante endogène semble impliquée dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique. En effet, l'administration d'un inhibiteur de la catalase, le 3-aminotriazole (AT), avant la séquence d'ischémie-reperfusion, abolit l'effet anti-arythmique (Joyeux et al, 1997a), ainsi que l'amélioration de la récupération fonctionnelle (Karmazyn et al, 1990) induits par le stress hyperthermique sur un modèle de cœur isolé de rat. De la même manière, la diminution de la taille de l'infarctus induite par l'hyperthermie dans des cœurs de lapin est abolie par l'AT (Kingma et al, 1996).

En considérant maintenant l'activité des superoxydes dismutases (SOD), les résultats de la littérature sont controversés. Il semble que les taux de SOD mitochondriale (Mn-SOD) soient augmentés 24 heures après le stress hyperthermique, sur des cardiomyocytes de rat (Yamashita et al, 1994), ainsi que dans le cœur de porc (Maulik et al, 1995). En revanche, dans le cœur de rat, l'activité des SOD n'est pas influencée par le stress hyperthermique lorsque mesuré 24 heures après celui-ci (Currie et al, 1988 ; Joyeux et al, 1997a). Yamashita et ses collaborateurs (1998) suggèrent une induction de l'activité de la Mn-SOD, dans le myocarde de rat, 48 à 72 heures après le stress hyperthermique. Enfin, une étude utilisant un oligodeoxyribonucléotide antisens de la Mn-SOD a montré une inhibition complète de la tolérance cellulaire induite par le stress hyperthermique, sans toutefois affecter la synthèse des HSP 70 induite par ce même stress (Yamashita et al, 1997).

Il semblerait donc qu'une augmentation des défenses antioxydantes endogènes, comme la synthèse d'HSP, soient impliquées dans le mécanisme cardioprotecteur induit par le stress hyperthermique (Mocanu et al, 1993).

1.2.5 Lien entre les médiateurs impliqués dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique et les HSP

Comme nous l'avons vu précédemment, les HSP semblent fortement impliquées dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique. Cependant, certaines études ont montré que l'abolition de cette réponse ne s'accompagnait pas d'une diminution de l'expression des HSP 70. En effet, Joyeux et al, (1997b) ont montré qu'un inhibiteur des PKC était capable d'abolir l'effet protecteur obtenu suite à l'hyperthermie, sans toutefois altérer l'expression des HSP 70. De même, un inhibiteur de la p38 MAP kinase s'oppose à la diminution de la taille de l'infarctus induite par le stress hyperthermique, mais n'a aucun effet sur les HSP 70 (Joyeux et al, 2000).

D'autres protéines de stress pourraient alors être impliquées dans ce mécanisme cardioprotecteur, et notamment les HSP 27, comme nous l'avons vu précédemment.

2. Le monoxyde d'azote

La grande aventure du monoxyde d'azote (NO) a commencé dans les années 80, lorsque Furchgott & Zawadzki, (1980) ont découvert l'EDRF, endothelium-derived relaxing factor, responsable de la vasodilatation induite par l'acétylcholine. Ce n'est que quelques années plus tard, qu'il a été suggéré que l'EDRF n'est autre que le NO, synthétisé par les NO synthases (Ignarro et al, 1987).

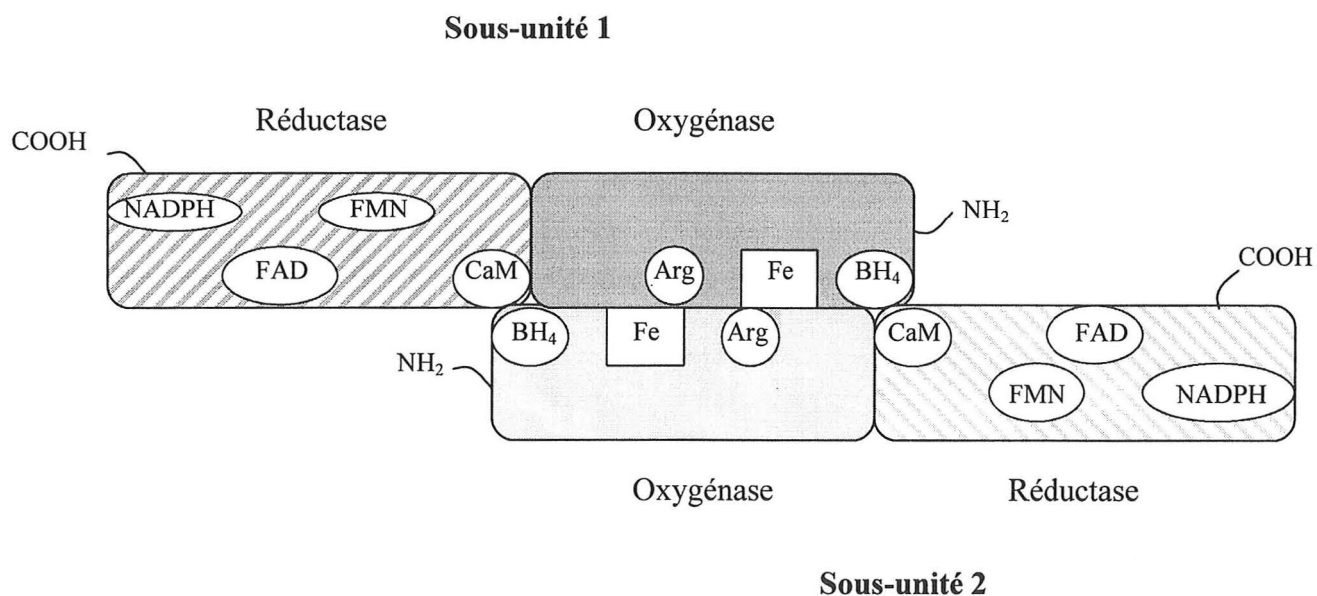
2.1 Les NO synthases

Les NO synthases sont des enzymes catalysant la synthèse du NO, via une réaction impliquant la transformation de la L-arginine en L-citrulline, sous l'influence de plusieurs cofacteurs. Ces cofacteurs sont le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH), la 6(R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH₄), le flavine adénine dinucléotide (FAD) et le flavine adénine mononucléotide (FMN).

Ces enzymes sont de trois types : neuronale, endothéliale et inducible. Elles fonctionnent comme des dimères constitués de deux monomères identiques, qui peuvent eux-mêmes être divisés en deux domaines majeurs : un domaine réductase C-terminal, et un domaine oxygénase N-terminal. Le premier possède des sites de liaison pour une molécule de NADPH, FAD et FMN, alors que le second lie l'hème, la BH₄, ainsi que le substrat L-arginine. Entre ces deux régions se trouve le domaine de liaison de la calmoduline, qui joue un rôle dans la structure et la fonction de ces enzymes (figure 4).

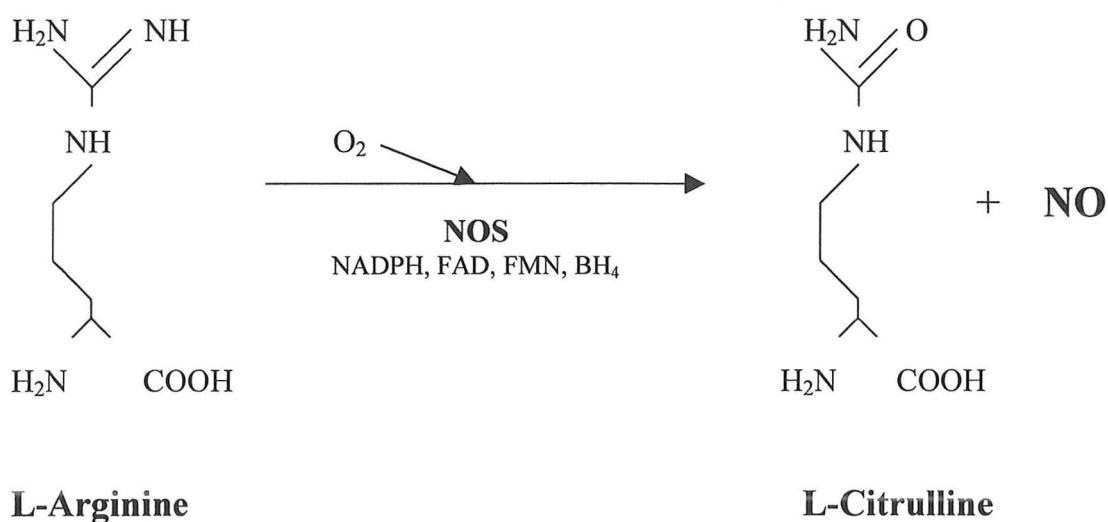
La synthèse du NO inclut une oxydation en deux temps de la L-arginine en L-citrulline, avec une production concomitante de NO (figure 5). Cependant, les NO synthases sont aussi capables, selon les conditions, de catalyser la synthèse de produits supplémentaires, et notamment l'anion superoxide (O₂⁻) (Andrew & Mayer, 1999).

Fig. 4. Domaines structuraux du dimère des NO synthases (D'après Andrew & Mayer, 1999)



Arg : L-Arginine ; CaM : Calmoduline ; BH₄ : 6(R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine ; FAD : Flavine Adénine Dinucléotide ; Fe : Fer ; FMN : Flavine Adénine Mononucléotide ; NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduit

Fig. 5. Réaction de synthèse du NO (D'après Andrew & Mayer, 1999)



BH₄ : 6(R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine ; FAD : Flavine Adénine Dinucléotide ; FMN : Flavine Adénine Mononucléotide ; NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduit ; NOS : NO synthase

2.1.1 La NOS neuronale

La NOS neuronale, ou NOS_n, est exprimée dans les neurones périphériques non-cholinergiques et non-adrénergiques. Elle entraîne une libération de NO calcium-dépendante.

2.1.2 La NOS endothéliale

La NOS endothéliale, ou NOS_e, est présente à l'état basal dans les cellules endothéliales, mais peut aussi être localisée dans d'autres types cellulaires, tels que les cardiomyocytes ou le tissu de conduction cardiaque. Son activation est dépendante du calcium intracellulaire et peut être induite par divers mécanismes comme le cisaillement, l'activation de protéines G, l'hypoxie ou par certaines substances telles que l'acétylcholine, la bradykinine ou l'histamine.

2.1.3 La NOS inductible

La NOS inductible, ou NOS_i, est calcium-indépendante. Son expression peut être induite par les médiateurs de l'inflammation dans différents types de cellules vasculaires, telles que les cellules endothéliales, les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses, ainsi que dans les macrophages.

2.2 Rôles du NO

Le NO est un facteur capital dans le système cardiovasculaire. Comme nous l'avons vu précédemment, le NO a initialement été décrit comme un puissant vasodilatateur (Ignarro et al, 1987). Dans les conditions physiologiques, les concentrations de NO fluctuent constamment à des taux relativement faibles, contrôlés par les NOS exprimées constitutivement, la NOSe et la NOSn. Parmi les multiples effets bénéfiques du NO, nous pouvons citer son rôle très important dans la régulation de nombreuses fonctions du système cardiovasculaire, incluant le tonus vasculaire, l'adhésion des cellules à l'endothélium, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la prolifération du muscle lisse vasculaire (Andrew & Mayer, 1999).

Cependant, les concentrations de NO peuvent rapidement augmenter sous l'action de la NOSi, dans certaines conditions pathologiques, comme l'inflammation par exemple. Dans ce cas, des taux non contrôlés et très élevés de NO peuvent être délétères. En effet, le NO peut réagir rapidement avec l'anion superoxide produit simultanément, ce qui se traduit par la synthèse de composés très toxiques, comme le peroxy-nitrite ou le radical hydroxyl (Colasanti & Suzuki, 2000).

Le NO peut donc être considéré comme une véritable épée à double tranchant.

2.3 Implications du NO dans les mécanismes cardioprotecteurs

Récemment, de nombreuses études se sont tournées vers l'éventuelle implication du NO dans les mécanismes cardioprotecteurs.

2.3.1 Préconditionnement ischémique

De nombreux travaux sur le preconditionnement ischémique ont suggéré un rôle du NO dans ce mécanisme cardioprotecteur. Le preconditionnement ischémique est un phénomène par lequel de brèves séquences d'ischémie-reperfusion augmentent la tolérance du myocarde à un stress ischémique plus intense. Deux phases de protection peuvent être distinguées : une phase précoce, qui se développe immédiatement et se prolonge de 2 à 4 heures, et une phase retardée, qui débute 12 à 24 heures après le stress et se prolongent 3 à 4 jours (Qiu et al, 1997). Le preconditionnement ischémique, implique de nombreux médiateurs, tels que l'adénosine, l'acétylcholine ou la bradykinine. Or, ces substances sont connues pour induire la synthèse de NO via l'activation de la NOSe.

Plusieurs études récentes ont montré qu'un inhibiteur des NOS était capable d'abolir la cardioprotection induite par le preconditionnement ischémique, que ce soit dans la phase précoce (Bolli et al, 1997) ou retardée (Bolli et al, 1997 ; Takano et al, 1998 ; Imagawa et al, 1999). D'autre part, Guo et ses collaborateurs (1999) ont suggéré que la seconde fenêtre du preconditionnement ischémique était associée à une surexpression de la NOS inductible, dans un modèle de souris *in vivo*. Ces résultats ont été confirmés par d'autres travaux suggérant une surexpression de la NOSi, dans le myocarde, suite à de brèves séquences d'ischémie-reperfusion, chez le lapin *in vivo* (Jones et al, 1999). La NOSi pourrait donc jouer un rôle bénéfique ou délétère en fonction du type de stress infligé et, éventuellement, de l'intensité de son induction.

Enfin, le NO peut agir comme un intermédiaire dans la formation de peroxynitrite ou d'autres espèces radicalaires. Paradoxalement à leurs effets délétères, les radicaux libres semblent nécessaires à l'induction de la cardioprotection, puisque l'administration d'un antioxydant lors du préconditionnement ischémique abolit les effets protecteurs (Sun et al, 1996). Le NO pourrait alors induire une cardioprotection via la formation de radicaux potentiellement délétères.

2.3.2 Préconditionnement par le MLA

Le monophosphoryl lipid A (MLA), obtenu par modification du lipopolysaccharide (LPS) de *Salmonella minnesota*, possède la plupart des propriétés du LPS, tout en étant beaucoup moins toxique (Elliott, 1998). Administré 24 heures avant un incident ischémique cardiaque, le MLA réduit les lésions causées par la reperfusion dans différents modèles animaux (György et al, 1999). Il semble que le NO joue un rôle dans cette cardioprotection induite par le MLA.

En effet, il a été montré que la cardioprotection induite par le MLA était abolie par un inhibiteur des NOS (Zhao et al, 1997 ; Tosaki et al, 1998). De plus, cette cardioprotection est associée avec une augmentation de l'activité NOS dans des cœurs de lapin traités par le MLA (Zhao et al, 1997) et avec une expression des ARNm de la NOSi dans des cœurs de rats (Tosaki et al, 1998).

Plus récemment, une équipe a montré que le MLA induisait une augmentation de la production de NO dans des cœurs de rat, et que cet effet précédait la cardioprotection. Une inhibition de la NOSi au moment de l'administration de MLA abolit l'augmentation de production de NO ainsi que l'effet cardioprotecteur. En revanche, l'inhibition de la NOSi juste avant la séquence ischémie-reperfusion n'atténue pas la cardioprotection. Il semble donc que le NO agisse comme un déclencheur, et non comme un médiateur direct de l'effet cardioprotecteur retardé médié par le MLA (György et al, 1999).

2.3.3 Interactions NO-canaux potassiques ATP-dépendants

Le mécanisme par lequel les canaux potassiques ATP-dépendant protègent le myocarde contre les lésions ischémiques (Grover, 1994) était initialement associé à une diminution de la durée du potentiel d'action et la diminution de l'influx calcique associé. Cependant, il semblerait maintenant que les canaux K_{ATP} mitochondriaux jouent un rôle plus important que les canaux sarcolémiques (Liu et al, 1998). Le mécanisme par lequel l'ouverture des canaux K_{ATP} mitochondriaux résulte en une cardioprotection n'est pas encore bien défini. Il pourrait inclure la réduction de l'influx calcique et la préservation de l'ATP via la modulation de la phosphorylation oxydative par l'intermédiaire du contrôle volumique de la matrice mitochondriale.

D'autre part, certains effets physiologiques du NO semblent liés à l'activation des canaux K_{ATP} . La réponse vasculaire de vasodilatation périphérique, par exemple, impliquerait les canaux K_{ATP} (Champion & Kadowitz, 1997) et le NO potentialiserait le courant potassique ATP-dépendant sur un modèle de cellules ventriculaires isolées de cobaye (Shinbo & Iijima, 1997).

Comme nous l'avons vu précédemment, le NO semble, de plus, jouer un rôle de médiateur de la seconde fenêtre du préconditionnement ischémique dans laquelle les canaux K_{ATP} mitochondriaux sont les effecteurs les plus probables. Le lien entre NO et canaux K_{ATP} reste peu connu, mais des études récentes suggèrent une activation sélective des canaux K_{ATP} mitochondriaux, et non des canaux K_{ATP} sarcolémiques, par le NO (Sasaki et al, 2000 ; Ockaili et al, 1999). De plus, un inhibiteur des canaux K_{ATP} , le glibenclamide, est capable d'abolir totalement la cardioprotection induite par un donneur de NO, le S-nitrosogluthathione. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une activation NO-dépendante des canaux K_{ATP} dans les mécanismes cardioprotecteurs (Stambaugh et al, 1999).

3. Conclusion

Les médiateurs impliqués dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Toutes les interrelations entre les différents acteurs de cette réponse ne sont pas encore connues, mais de nombreuses hypothèses peuvent être formulées quant aux voies de signalisation impliquées dans ce processus.

Nous pouvons, en effet, émettre l'hypothèse que l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques suite au stress hyperthermique induise l'activation des PKC et l'ouverture des canaux K_{ATP} aboutissant à une cytoprotection.

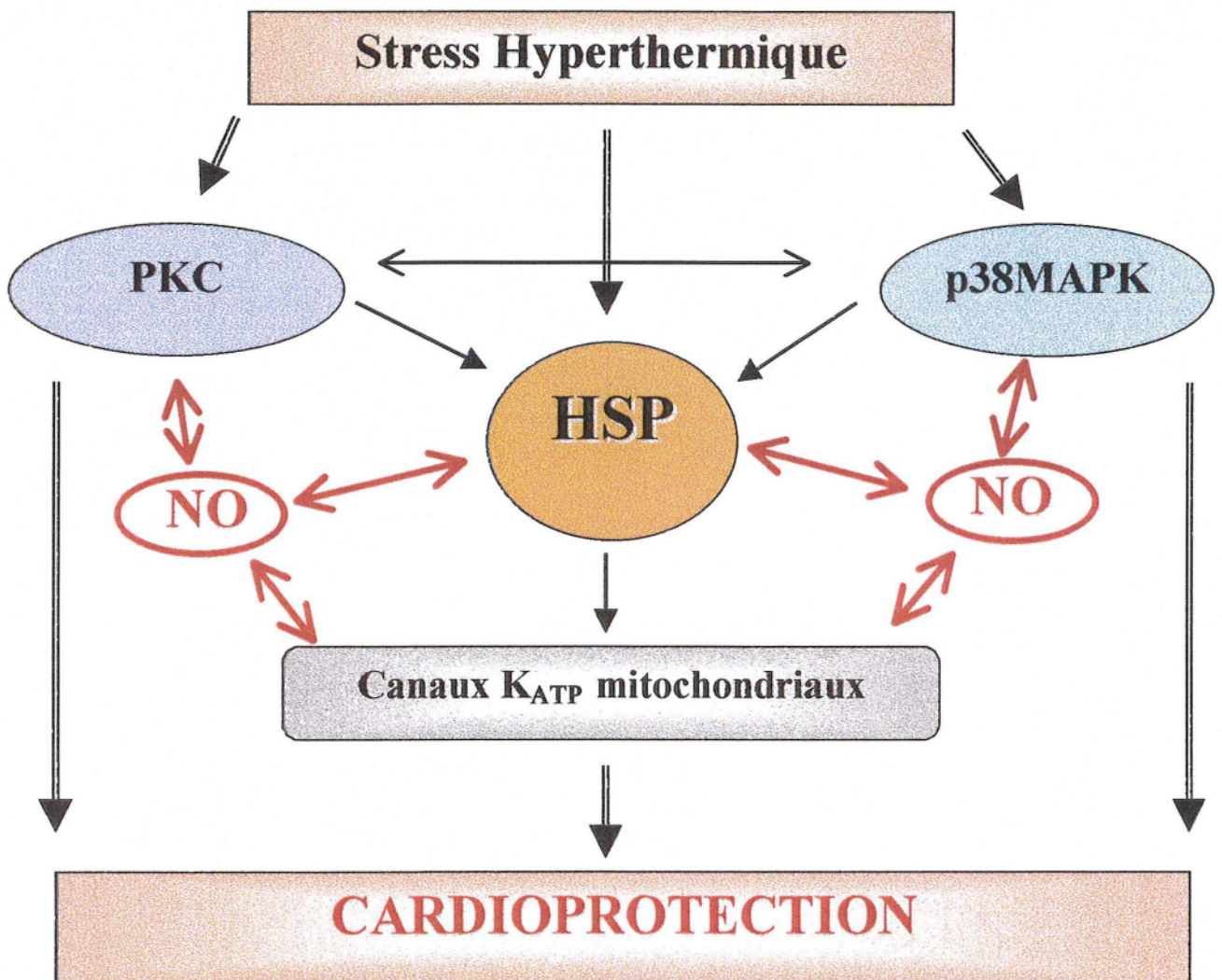
D'autre part, il semble que la voie des MAP kinase soit fortement impliquée dans ce mécanisme cardioprotecteur. La MAPKAPK 2, substrat de la p38 MAP kinase, est capable de phosphoryler les protéines de stress de bas poids moléculaires (HSP 27), qui semblent aussi jouer un rôle cytoprotecteur.

Suite au stress hyperthermique, ces différentes voies de transduction possibles pourraient aboutir à la régulation de certains facteurs de transcription et donc à la synthèse de nouvelles protéines, comme les HSP 70, qui semblent jouer un rôle important dans ce mécanisme.

Le rôle du NO dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique n'est pas encore défini et fait l'objet de la partie expérimentale de ce travail.

La figure 6 est un schéma très simplifié des différentes voies de signalisation potentiellement impliquées dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique.

Fig. 6. Voies de signalisation hypothétiques de la cardioprotection induite par le stress hyperthermique



HSP : Protéines de stress ; Canaux K_{ATP} : Canaux Potassiques ATP-dépendants ; NO : Monoxyde d'azote ; PKC : Protéine Kinase C ; p38MAPK : p38 Mitogen Activated Protein Kinases.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

C. PARTIE EXPERIMENTALE

1. Objectifs de l'étude

Comme nous l'avons vu dans la première partie, le stress hyperthermique est capable d'induire une cardioprotection contre des lésions provoquées par une séquence d'ischémie-reperfusion. Une augmentation de la synthèse des HSP 70 est détectée 24 heures après ce stress et pourrait jouer un rôle primordial dans ce mécanisme cardioprotecteur.

De nombreux médiateurs semblent, de plus, impliqués, comme les protéines kinases C (Joyeux et al, 1997b), les canaux K_{ATP} (Joyeux et al, 1998) et les enzymes antioxydantes (Zhou et al, 1996). Récemment, il a été montré que le NO joue un rôle majeur dans plusieurs mécanismes cardioprotecteurs, tels que le préconditionnement ischémique (Bolli et al, 1997) ou la cardioprotection médiée par le MLA (György et al, 1999).

D'autre part, il semblerait qu'un lien existe entre la production de NO et la synthèse d'HSP. Malyshev et al, (1995) ont observé une augmentation de la production de NO dans des cœurs de rat, 1 heure après un stress hyperthermique. De plus, il semble qu'un donneur de NO soit capable d'augmenter la production myocardique d'HSP 70, 24 heures après son administration à des rats non exposés au stress (Malyshev et al, 1996).

Nous nous sommes donc intéressés, dans ce travail, à l'implication éventuelle du NO dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique.

La première partie a consisté en une étude *in vitro*, sur cœur isolé perfusé selon la technique de Langendorff. Elle visait à montrer les effets de deux inhibiteurs des NO synthases, le L-NAME, un inhibiteur non spécifique des NOS et le L-NIL, un inhibiteur spécifique de la NOS inductible, sur la diminution de la taille de l'infarctus induite par un stress hyperthermique. Les traitements utilisés dans notre étude inhibent ces différentes isoformes de NOS au moment du stress (Schwartz et al, 1997), sans répercussion hémodynamique, 24 heures après la fin du traitement (Lagneux et al, 2000).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'hyperthermie sur l'expression des HSP, la production de NO, ainsi que l'activité des superoxydes dismutases suite au stress hyperthermique.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Modèle Expérimental

2.1.1 Matériel biologique

Les expériences sont effectuées sur des rats mâles de souche Wistar (280-340 g, IFFA Credo). Les rats sont placés dans des conditions constantes de température et d'humidité, les cycles subis sont de 12 heures de jour/12 heures de nuit et l'accès à l'eau et la nourriture est libre.

2.1.2 Stress hyperthermique

Le modèle de stress hyperthermique que nous avons utilisé est celui décrit par Currie et White (1983). Les rats, anesthésiés au pentobarbital sodique (20 mg.kg^{-1} , i.p.), sont placés dans une enceinte close dont la température est élevée à l'aide d'une lampe infrarouge. La température corporelle, contrôlée en continu grâce à une sonde rectale, est augmentée jusqu'à $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ et maintenue ainsi 15 minutes.

Les animaux sont ensuite replacés dans les conditions standards de l'animalerie pour une période variant de 1 à 24h.

2.1.3 Traitements pharmacologiques

Les groupes L et HL sont traités par le nitro-L-arginine-methylester (L-NAME), un inhibiteur non spécifique des NO synthases (NOS), administré dans l'eau de boisson (80 mg.l^{-1}) pendant 48h, puis en injection intrapéritonéale (50 mg.kg^{-1}) 10 minutes avant le stress hyperthermique.

Les groupes N et HN sont traités par le L-N⁶-(1-imino-ethyl)lysine (L-NIL), un inhibiteur spécifique des NOS inductibles, administré en injection intrapéritonéale (3 mg.kg^{-1}), 36h, 24h, 12h et 10 minutes avant le stress hyperthermique.

2.2 Étude sur cœur isolé de rat perfusé selon la technique de

Langendorff

2.2.1 Groupes expérimentaux

Six groupes ont été étudiés pour la détermination de la taille de l'infarctus.

- **Groupe C** (n=6) : les animaux ne sont pas stressés et ne reçoivent aucun traitement pharmacologique.
- **Groupe HS** (n=6) : les animaux sont soumis au stress hyperthermique 24h avant l'étude de la taille de l'infarctus.
- **Groupe L** (n=6) : les animaux sont traités par le L-NAME mais ne sont pas stressés.
- **Groupe HL** (n=6) : les animaux sont traités par le L-NAME et sont soumis au stress hyperthermique 24h avant l'étude de la taille de l'infarctus.
- **Groupe N** (n=6) : les animaux sont traités par le L-NIL mais ne sont pas stressés.
- **Groupe HN** (n=6) : les animaux sont traités par le L-NIL et sont soumis au stress hyperthermique 24h avant l'étude de la taille de l'infarctus.

2.2.2 Modèle de Langendorff

Vingt quatre heures après le stress thermique, les animaux sont héparinés (1000 U.kg^{-1} , i.p.), et anesthésiés au pentobarbital sodique (60 mg.kg^{-1} , i.p.). Le cœur est rapidement prélevé puis immergé dans une solution de Krebs-Henseleit à 4°C afin de stopper la contraction. L'aorte est ensuite canulée et le cœur est perfusé de façon rétrograde, selon la technique de Langendorff, à pression constante (100 cm d'eau). Le liquide de perfusion est une solution de Krebs-Henseleit modifiée composée de (en mM) : NaCl 118 ; KCl 4,7 ; KH_2PO_4 1,2 ; MgSO_4 1,2 ; NaHCO_3 25,2 ; CaCl_2 2,5 ; Glucose 11 ; EDTA 0,5 ; tamponnée à pH 7,4 ; équilibrée par un mélange gazeux composé de 95% d' O_2 et de 5% de CO_2 et perfusée à une température de $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

2.2.2.1 Paramètres hémodynamiques

Un ballonnet, rempli d'eau et relié à un capteur de pression, est inséré dans le ventricule gauche *via* l'oreillette gauche afin de mesurer la pression intraventriculaire. La pression télédiastolique du ventricule gauche (PTDVG) est ajustée entre 5 et 10 mmHg par gonflement du ballonnet. La température du myocarde, mesurée à l'aide d'une sonde thermique insérée dans le ventricule gauche, est maintenue à 37°C. La fréquence cardiaque et la pression développée par le ventricule gauche (PdVG) sont enregistrées continuellement (Windograph, Gould Instrument ; Mac Lab 4S, AD Instruments). Le débit coronaire est mesuré par gravimétrie.

2.2.2.2 Détermination de la taille de l'infarctus

Une ischémie régionale est effectuée en passant un fil de suture (Sutrel, n°2) autour de l'artère coronaire gauche. Après 20 minutes de stabilisation, le fil est resserré pendant 30 minutes (ischémie régionale), puis la reperfusion, obtenue en desserrant le fil de suture, est prolongée pendant 120 minutes.

A la fin de la reperfusion, l'artère coronaire gauche est de nouveau ligaturée et un colorant (bleu Irgasperse, Ciba) est perfusé par l'aorte afin de délimiter la taille de l'infarctus. Après avoir ôté le ventricule droit et le tissu conjonctif, le cœur est congelé quelques minutes à -80°C, puis découpé en tranches transversales de 2 mm d'épaisseur de la base vers l'apex (7 lamelles par cœur). Les tranches sont ensuite incubées 10 minutes à 37°C dans du chlorhydrate de triphenyltetrazolium 1%, tampon phosphate, pH 7,4, puis fixées dans une solution de formaldéhyde 10%, pour distinguer le tissu viable du tissu nécrosé. La taille de la zone infarctée du ventricule gauche (I) est obtenue par planimétrie (Minichromax, Biolab) et exprimée en pourcentage de la zone à risque (R), définie comme étant la zone normalement perfusée par le vaisseau occlus, et en pourcentage du ventricule gauche (VG).

2.3 Détermination des HSP par immunohistochimie

2.3.1 Groupes expérimentaux

Cinq groupes ont été étudiés pour la détection des HSPs.

- **Groupe C** (n=2) : les animaux ne sont pas stressés et ne reçoivent aucun traitement.
- **Groupe HS 8h** (n=2) : les animaux sont soumis au stress hyperthermique 8h avant la détection des HSPs par immunohistochimie.
- **Groupe HS 24h** (n=2) : les animaux sont soumis au stress hyperthermique 24h avant la détection des HSPs par immunohistochimie.
- **Groupe L** (n=2) : les animaux sont traités par le L-NAME mais ne sont pas stressés.
- **Groupe HL 24h** (n=2) : les animaux sont traités par le L-NAME et sont soumis au stress hyperthermique 24h avant la détection des HSPs par immunohistochimie.

2.3.2 Technique d'immunohistochimie

Les animaux sont héparinés (1000 U.kg^{-1} , i.p.) et anesthésiés au pentobarbital sodique (60 mg.kg^{-1} , i.p.). Le cœur est rapidement prélevé puis rincé dans du sérum physiologique stérile avant d'être tranché transversalement en trois fragments. Le fragment de la région moyenne du cœur est fixé dans une solution tamponnée de formol 10% pendant 24 heures, déshydraté dans des bains d'alcool éthylique de titre croissant (70° , 95° et 100°), plongé dans trois bains de toluène puis inclus dans la paraffine. Des coupes de $5 \mu\text{m}$ d'épaisseur sont recueillies sur des lames silanisées (SuperFrost plus, CML) avant d'être déparaffinées par trois bains successifs de toluène puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de degré décroissant (2 bains d'éthanol 100° et 1 bain d'éthanol 70°). Après rinçage, les coupes sont chauffées 5 minutes dans un autocuiseur sous pression dans un tampon citrate (10 mM, pH 6), puis de nouveau rincées, avant d'être plongées dans un tampon TBS-Tween (tampon Tris, pH 8, Tween 20 0.05%) pendant 5 minutes. Elles sont alors incubées une heure, à température ambiante, avec les différents anticorps anti-HSPs, dilués au 1/50 pour les HSP 27 et au 1/100 pour les HSP 70. Les coupes sont ensuite rincées trois fois dans du TBS-Tween puis la révélation est réalisée à l'aide d'une technique Streptavidine-biotine-peroxydase. L'intensité de coloration rouge correspond à l'intensité du marquage HSP 27 ou 70.

2.4 Dosage du NO

2.4.1 Groupes expérimentaux

Quatre groupes ont été étudiés pour les dosages du NO.

- **Groupe C** (n=10) : Les animaux ne sont pas soumis au stress hyperthermique.
- **Groupe HS 1h** (n=6) : Les animaux sont soumis au stress hyperthermique 1h avant les dosages du NO.
- **Groupe HS 8h** (n=6) : Les animaux sont soumis au stress hyperthermique 8h avant les dosages du NO.
- **Groupe HS 24h** (n=6) : Les animaux sont soumis au stress hyperthermique 24h avant les dosages du NO.

2.4.2 Technique de dosage du NO

La demi-vie extrêmement faible du NO nécessite sa complexation sous une forme plus stable pour permettre sa détection. Au niveau sanguin, l'utilisation de la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE) permet la détection des complexes nitrés endogènes, tels que la nitrosylhémoglobine (HbNO) et la méthémoglobine (MetHb). Au niveau tissulaire, il est nécessaire d'utiliser un piègeur de NO. Nous avons utilisé le *N*-méthyl-D-glucamine dithiocarbamate (MGD), très hydrosoluble, capable de diffuser dans les tissus et de piéger le NO, après complexation préalable avec le fer (Fe^{2+}) (Lecour et al, 1999). Ce complexe est préparé extemporanément dans une solution de NaCl 9‰, dans des proportions 1/5 (36.7 mg.kg⁻¹ de fer et 230 mg.kg⁻¹ de MGD). Trente minutes avant le sacrifice, les animaux sont de nouveau anesthésiés au pentobarbital sodique (30 mg.kg⁻¹, i.p.) et le complexe Fe-MGD est administré par la veine pénienne sous un volume de 1 ml.

2.4.3 Prélèvement des tissus et du sang total

Au moment du prélèvement, les rats sont héparinés (500 U.kg^{-1} , i.v) et les organes sont prélevés rapidement (ventricule gauche, ventricule droit, aorte, rein, foie, poumon), puis rincés dans une solution de NaCl à 4°C . Les tissus sont découpés en fines lamelles, introduits dans des cathéters de polyéthylène et conservés à -80°C jusqu'à la mesure en résonance paramagnétique électronique. Le sang hépariné est centrifugé à 5000 g pendant 5 minutes. Le culot globulaire est introduit dans un cathéter de polyéthylène et conservés à -80°C jusqu'à la mesure en RPE des complexes HbNO et MetHb.

2.4.4 Spectroscopie RPE

Les spectres RPE sont enregistrés grâce à un spectromètre de type BRUCKER ESP 300 EX. Les échantillons sont placés dans un tube en quartz, au sein d'une cavité. Les conditions d'enregistrement sont les suivantes :

- Température : 100K
- Champ magnétique :
 - HbNO : $3350 \pm 150 \text{ G}$
 - MetHb : $1200 \pm 200 \text{ G}$
 - $[(\text{MGD})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}]$: $3350 \pm 40 \text{ G}$
- Puissance de la micro-onde : 5 mW
- Fréquence de la micro-onde : 9.6 GHz
- Modulation d'amplitude : 5.73 G
- Modulation de fréquence : 100 KHz.

Les taux de HbNO, MetHb et de $[(\text{MGD})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}]$ sont déterminés par l'intensité de chaque spectre, qui est proportionnelle au nombre de centres magnétiques qui résonnent, et sont exprimés en unité arbitraire (UA) (Wang & Zweier, 1996).

2.5 Dosage de l'activité des Superoxydes Dismutases (SOD)

2.5.1 Groupes expérimentaux

Quatre groupes ont été étudiés pour les dosages de l'activité SOD.

- **Groupe C** (n=7) : les animaux ne sont pas soumis au stress hyperthermique.
- **Groupe HS** (n=7) : les animaux sont soumis au stress hyperthermique 24h avant les dosages de l'activité SOD.
- **Groupe L** (n=7) : les animaux sont traités par le L-NAME avant les dosages de l'activité SOD.
- **Groupe HL** (n=5) : les animaux sont traités par le L-NAME, et sont soumis au stress hyperthermique 24h avant les dosages de l'activité SOD.

2.5.2 Préparation des homogénats tissulaires

Vingt quatre heures après le stress hyperthermique, les animaux sont héparinés (1000 U.kg⁻¹, i.p.), et anesthésiés au pentobarbital sodique (60 mg.kg⁻¹, i.p.). Les cœurs sont prélevés rapidement, rincés avec une solution de Krebs-Henseleit et clampés dans de l'azote liquide à l'aide d'une pince de Wollenberger. Les tissus sont ensuite homogénéisés dans un tampon Tris base 50 mM, contenant 1 mM DTPA (Acide Diéthylène Triamine Pentaacétique) et 1mM PMSF (Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride). Les homogénats sont réalisés sur glace avec un homogénéisateur (Polytron), avant d'être soniqués 8 fois 15 secondes. Les homogénats sont alors centrifugés pendant 10 minutes à 4000 rpm, à 4°C. Le surnageant est de nouveau centrifugé, pendant 20 minutes, à 13000 rpm et à 4°C afin de séparer les mitochondries de la fraction cytosolique. Le culot de mitochondries est repris dans 1 ml de tampon phosphate (KH₂PO₄, NaH₂PO₄, pH=7). Les aliquots des fractions cytosoliques ou mitochondriales sont conservés à -80°C.

2.5.3 Dosage de l'activité SOD (Mn SOD et Cu, Zn SOD)

Le dosage de l'activité de la superoxyde dismutase est réalisé selon la technique de Marklund (1976). Il consiste à mesurer l'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol avec l'anion superoxyde, par la SOD.

Le dosage est effectué sur microplaques. Le témoin contient 210 μ l de tampon ainsi que la quantité nécessaire de pyrogallol permettant d'obtenir une Δ DO/min = 0.020 ± 0.001 (soit environ 10 μ l). Dix microlitres d'échantillons sont incubés avec 200 μ l de tampon ainsi que la quantité de pyrogallol déterminée précédemment. Après 30 secondes d'incubation, la DO est suivie pendant 2 minutes à 410 nm et la Δ DO/min est calculée.

L'activité enzymatique est exprimée en unité par gramme (U/g) de protéines.

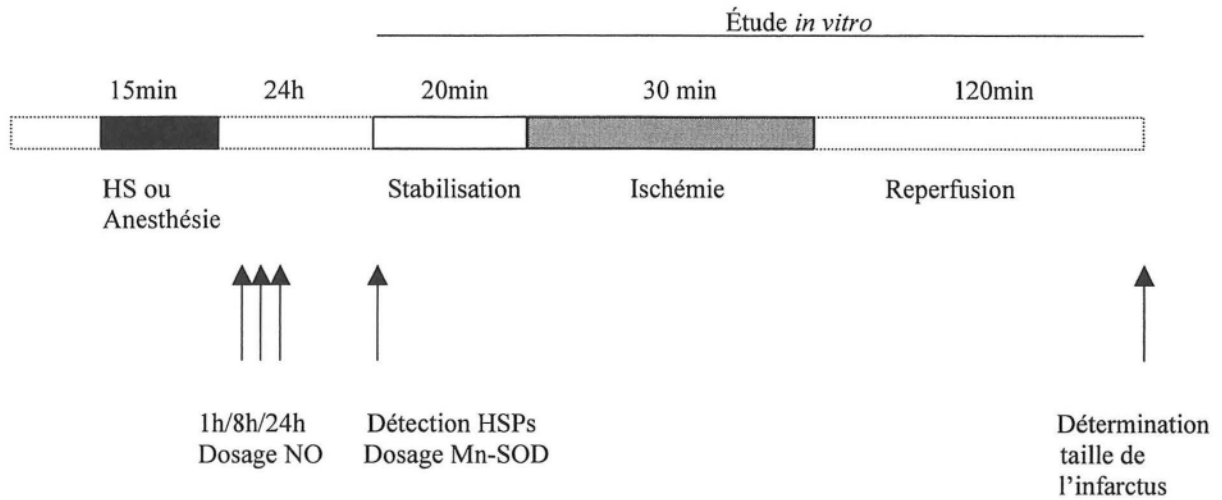
2.6 Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats est effectuée à l'aide du logiciel Sigma Stat (Jandel Scientific®).

Les paramètres hémodynamiques sont soumis à une analyse de variance à 2 voies (facteur traitement et facteur temps), suivie d'un test paramétrique (Tuckey) lorsque les tests de normalité et d'égalité des variances sont validés ou d'un test non paramétrique (Dunnett, Dunn) dans les conditions contraires. Les tailles d'infarctus, les dosages du NO et des activités SOD sont soumises à une analyse de variance unifactorielle suivie d'un test paramétrique (Tuckey) ou non paramétrique (Dunnett, Dunn) selon les cas.

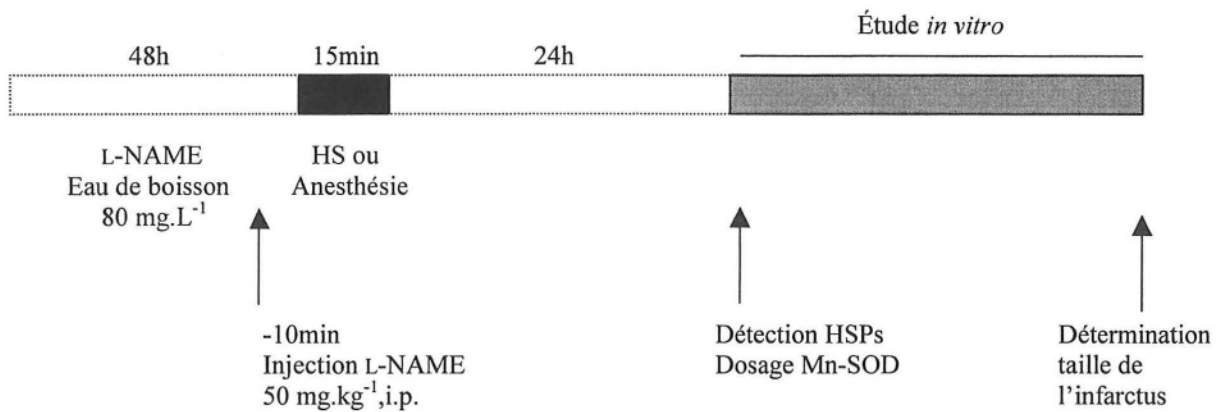
Le risque d'erreur est fixé pour $\alpha = 5\%$ ($*P < 0.05$).

Procédure générale :

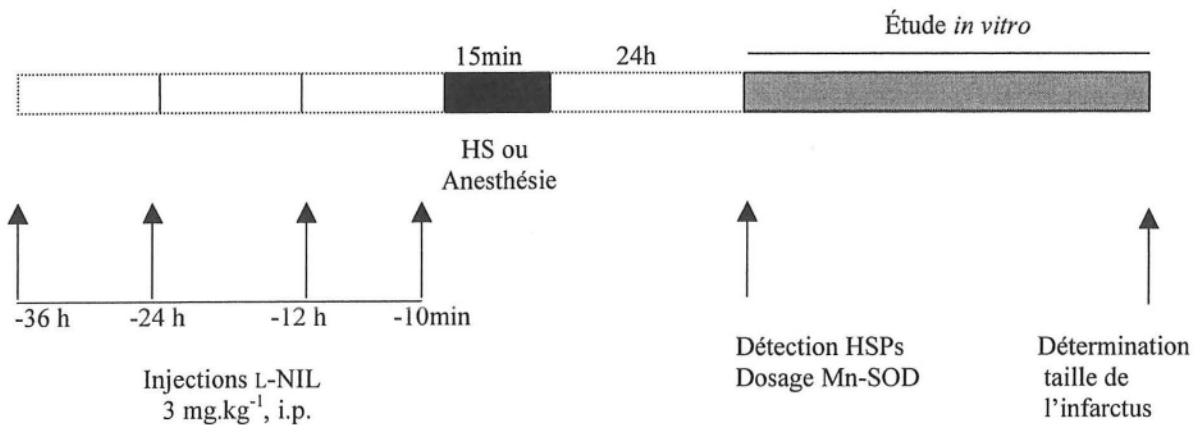


Traitements pharmacologiques :

• L-NAME :



• L-NIL :



3. RÉSULTATS

3.1 Cœur isolé

3.1.1 Paramètres hémodynamiques

Dans le groupe contrôle, la pression développée par le ventricule gauche chute très fortement au début de l'occlusion ($\approx 50\%$) puis augmente à nouveau au début de la reperfusion sans toutefois retrouver les valeurs de stabilisation ($\approx 75\%$). Elle évolue de la même manière dans les différents groupes étudiés : HS, L, HL, N, HN.

Tableau 1 Évolution de la pression développée par le ventriculaire gauche (PdVG)

PdVG (mmHg)	N	Stab	I 5	I 30	R 15	R 60	R 120
C	6	86.2 ± 5.7	38.3 ± 5.4*	55.0 ± 6.2*	75.2 ± 4.2*	67.7 ± 3.1*	55.2 ± 4.4*
HS	6	83.8 ± 4.9	42.5 ± 3.0*	60.2 ± 4.9*	74.3 ± 4.2*	64.0 ± 7.4*	58.6 ± 3.3*
L	6	95.2 ± 6.9	46.3 ± 5.6*	55.2 ± 2.2*	67.3 ± 5.3*	64.8 ± 7.0*	54.7 ± 5.6*
HL	6	70.3 ± 3.1	47.9 ± 2.6*	57.2 ± 5.8*	63.8 ± 7.7*	62.6 ± 6.2*	52.6 ± 5.9*
N	6	75.8 ± 1.2	37.7 ± 2.8*	45.7 ± 3.9*	60.1 ± 2.6*	56.3 ± 2.0*	50.0 ± 1.9*
HN	6	90.3 ± 7.4	39.4 ± 5.4*	54.1 ± 4.3*	70.5 ± 2.5*	55.7 ± 2.2*	49.9 ± 0.8*

Stab = Stabilisation, I5 = Ischémie 5 min, I30 = Ischémie 30 min, R15 = Reperfusion 15 min, R30 = Reperfusion 30 min, R120 = Reperfusion 120 min, C = contrôle, HS = Stress Hyperthermique, L = L-NAME, HL = HS+L, N = L-NIL, HN = HS+N (Moyennes ± e.s.m, * $P \leq 0.05$ v Stab).

De même, dans le groupe C, le débit coronaire diminue d'environ 30% pendant l'ischémie, puis augmente à nouveau en début de reperfusion. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes C, HS, L, HL, N et HN.

Tableau 2 Évolution du débit coronaire (DC)

DC (ml.min ⁻¹)	N	Stab	I 5	I 30	R 15	R 60	R 120
C	6	12.2 ± 0.6	7.5 ± 0.5*	7.7 ± 0.6*	10.5 ± 0.6*	9.8 ± 0.4*	8.8 ± 0.4*
HS	6	13.1 ± 0.3	8.0 ± 0.5*	8.8 ± 0.5*	12.4 ± 0.7*	10.8 ± 0.5*	9.8 ± 0.6*
L	6	11.3 ± 0.6	7.0 ± 0.6*	6.8 ± 0.5*	10.2 ± 0.6*	9.6 ± 0.6*	9.3 ± 0.8*
HL	6	11.2 ± 1.2	6.6 ± 1.2*	6.9 ± 0.9*	10.1 ± 1.2*	9.4 ± 1.4*	8.6 ± 1.1*
N	6	12.2 ± 0.6	6.5 ± 0.3*	6.5 ± 0.5*	10.7 ± 1.2*	9.8 ± 0.9*	9.0 ± 0.8*
HN	6	12.6 ± 0.6	7.2 ± 0.6*	7.1 ± 0.4*	11.0 ± 0.8*	10.0 ± 0.3*	9.0 ± 0.5*

Stab = Stabilisation, I5 = Ischémie 5 min, I30 = Ischémie 30 min, R15 = Reperfusion 15 min, R30 = Reperfusion 30 min, R120 = Reperfusion 120 min, C = contrôle, HS = Stress Hyperthermique, L = L-NAME, HL = HS+L, N = L-NIL, HN = HS+N (Moyennes ± e.s.m, *P ≤ 0.05 v Stab).

La fréquence cardiaque diminue légèrement dès le début de l'ischémie dans le groupe C. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes C, HS, L, HL, N et HN.

Tableau 3 Évolution de la fréquence cardiaque (FC)

FC (bpm)	n	Stab	I 5	I 30	R 15	R 60	R 120
C	6	307 ± 10	297 ± 8*	297 ± 6*	293 ± 7*	287 ± 8*	280 ± 7*
HS	6	322 ± 5	302 ± 5*	308 ± 10*	300 ± 9*	296 ± 10*	296 ± 12*
L	6	300 ± 7	293 ± 7*	287 ± 4*	287 ± 4*	288 ± 5*	287 ± 4*
HL	6	314 ± 10	304 ± 10*	308 ± 10*	302 ± 9*	292 ± 8*	292 ± 10*
N	6	302 ± 10	279 ± 10*	293 ± 6*	291 ± 15*	293 ± 9*	297 ± 8*
HN	6	313 ± 18	286 ± 12*	286 ± 4*	277 ± 5*	296 ± 3*	294 ± 8*

Stab = Stabilisation, I5 = Ischémie 5 min, I30 = Ischémie 30 min, R15 = Reperfusion 15 min, R30 = Reperfusion 30 min, R120 = Reperfusion 120 min, C = contrôle, HS = Stress Hyperthermique, L = L-NAME, HL = HS+L, N = L-NIL, HN = HS+N (Moyennes ± e.s.m, *P ≤ 0.05 v Stab).

Le produit de la pression développée par la fréquence cardiaque est un indice de la récupération fonctionnelle du ventricule gauche. Les valeurs de ce paramètre sont semblables dans les différents groupes étudiés, que ce soit en période de stabilisation, lors de l'ischémie ou à la reperfusion.

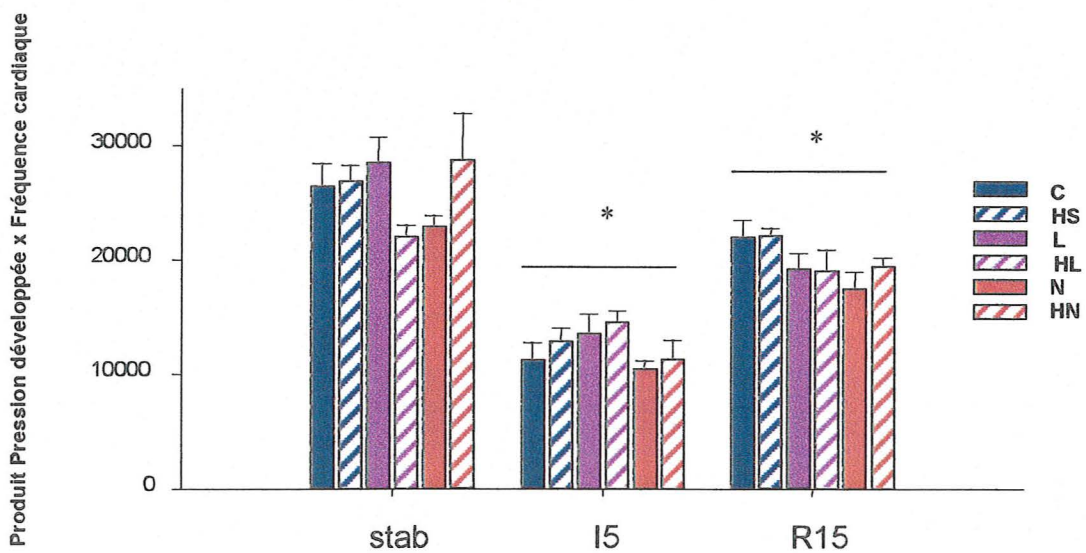


Fig. 7 : **Produit pression développée x fréquence cardiaque** dans les différents groupes étudiés, pendant la stabilisation (Stab), à 5 min d'ischémie (I5), et à 15 min de reperfusion (R15) (Moyennes \pm e.s.m, $*P \leq 0.05$ v Stab).

C = contrôle, HS = Stress Hyperthermique, L = L-NAME, HL = HS+L, N = L-NIL, HN = HS+N

3.1.2 Taille de l'infarctus

La taille de la zone à risque exprimée en pourcentage du ventricule gauche (R/VG) est similaire dans tous les groupes, excluant une réduction de la taille de l'infarctus due à une variabilité de la zone à risque (figure 8 et tableau 4).

La taille de l'infarctus (I) exprimée en pourcentage de la zone à risque (R) est de $33.5 \pm 2.7\%$ dans le groupe contrôle. Le stress hyperthermique réduit significativement la taille de l'infarctus ($19.8 \pm 2.6\%*$ dans le groupe HS). Cet effet disparaît aussi bien dans le groupe HL ($42.6 \pm 5.1\%$) que dans le groupe HN ($32.8 \pm 4.8\%$). Les traitements seuls sont sans effet sur ce paramètre (figure 9 et tableau 4).

Les mêmes remarques peuvent être formulées en considérant les rapports de la taille de l'infarctus sur la taille du ventricule gauche (I/VG) (tableau 4).

Tableau 4 Zone à risque (R) et Infarctus (I), exprimés en pourcentage du ventricule gauche (VG)

Groupes	n	R/VG (%)	I/VG (%)	I/R (%)
C	6	49.7 ± 2.7	16.4 ± 0.8	33.5 ± 2.7
HS	6	42.1 ± 3.9	$7.9 \pm 0.9*$	$19.8 \pm 2.6*$
L	6	48.1 ± 3.1	16.7 ± 1.8	35.4 ± 4.3
HL	6	47.8 ± 2.3	19.8 ± 1.8	42.6 ± 5.1
N	6	42.7 ± 3.2	16.5 ± 1.7	43.3 ± 6.9
HN	6	49.6 ± 3.2	15.6 ± 1.5	32.8 ± 4.8

C = contrôle, HS = Stress Hyperthermique, L = L-NAME, HL = HS + L, N = L-NIL, HN = HS+N
(Moyennes \pm e.s.m, $*P \leq 0.05$ v C)

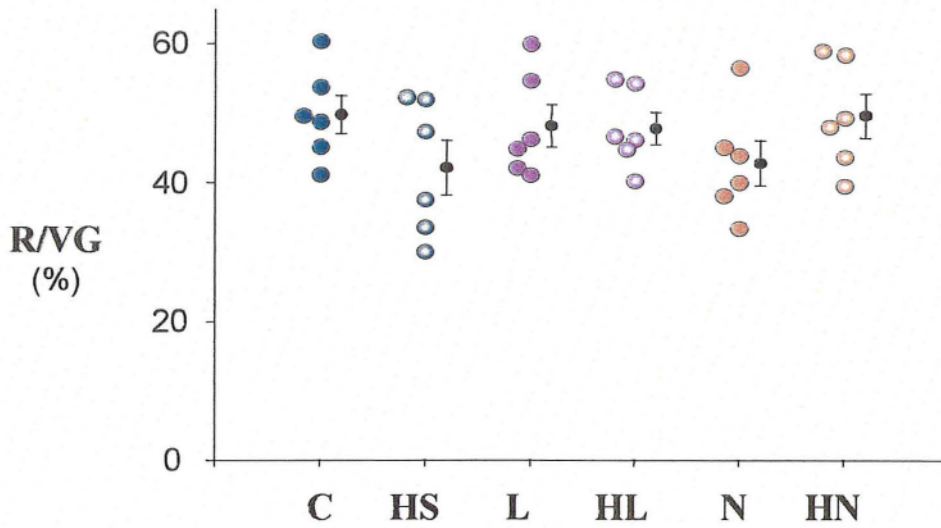


Fig. 8 : Zone à risque exprimée en pourcentage du ventricule gauche dans les différents groupes étudiés

C = contrôle, HS = Stress Hyperthermique, L = L-NAME, HL = HS + L, N = L-NIL, HN = HS + N

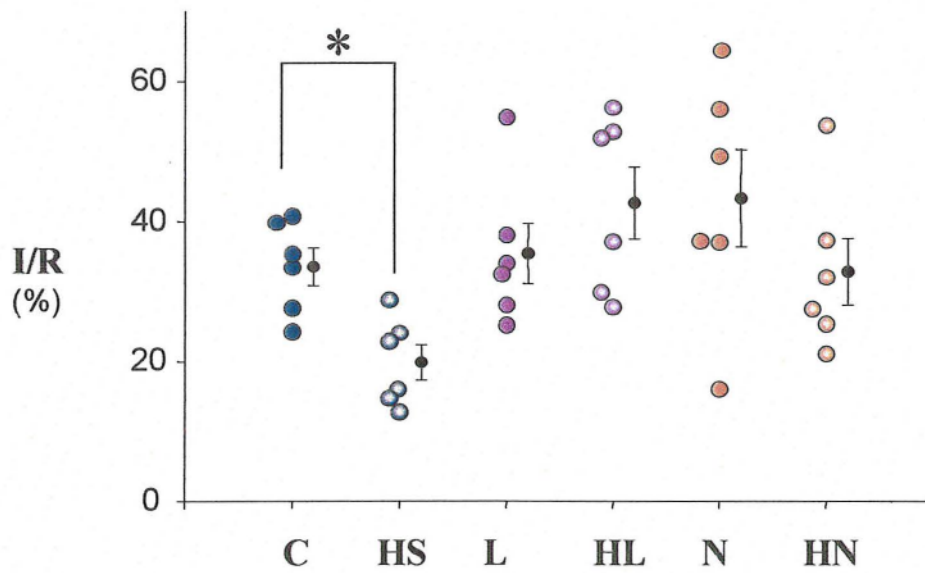


Fig. 9 : Taille de l'infarctus exprimée en pourcentage de la zone à risque dans les différents groupes étudiés, * $P \leq 0.05$.

C = contrôle, HS = Stress Hyperthermique, L = L-NAME, HL = HS + L, N = L-NIL, HN = HS + N

3.2 Détection des protéines de stress (HSPs) par immunohistochimie

3.2.1 HSP 27

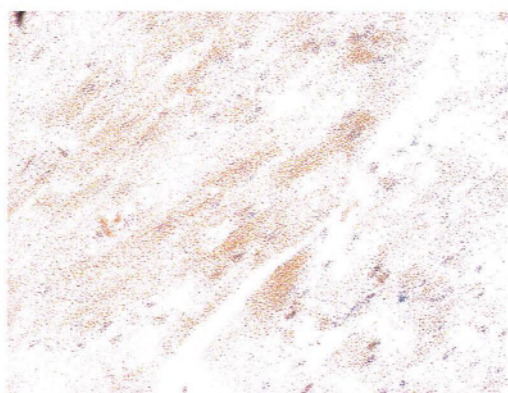
Une induction de l'expression des HSP 27 dans des cardiomyocytes de ventricule gauche de rat a été observée 8h et 24h après le stress hyperthermique (figure 10 B et C). Cette induction suite à l'hyperthermie n'est pas affectée par le prétraitement des animaux au L-NAME (figure 10E).

3.2.2 HSP 70

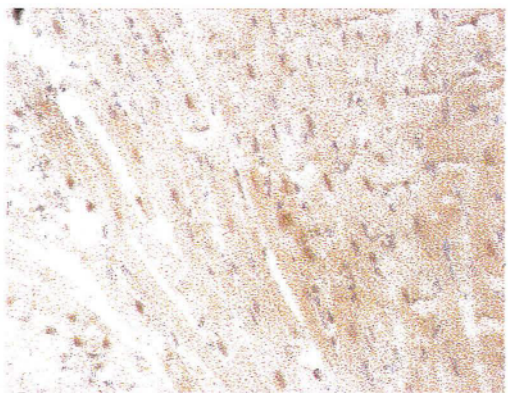
De même que pour les HSP 27, une induction de l'expression des HSP 70 dans des cardiomyocytes de ventricule gauche de rat a été observée 8h et 24h après le stress hyperthermique (figure 11 B et C). Cette induction suite à l'hyperthermie n'est pas affectée par le prétraitement des animaux au L-NAME (figure 11E).



A **Contrôle (x40)**



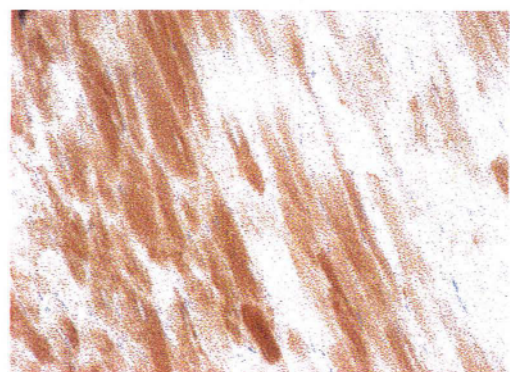
B **HS 8h (x40)**



C **HS 24h (x40)**

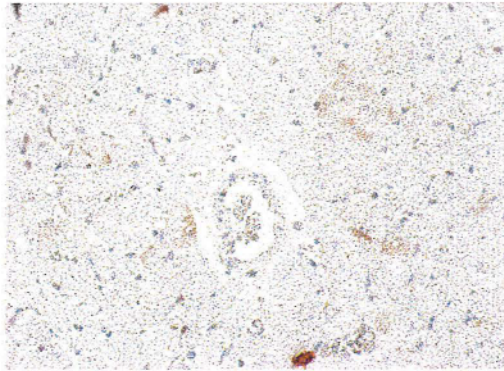


D **L (x40)**

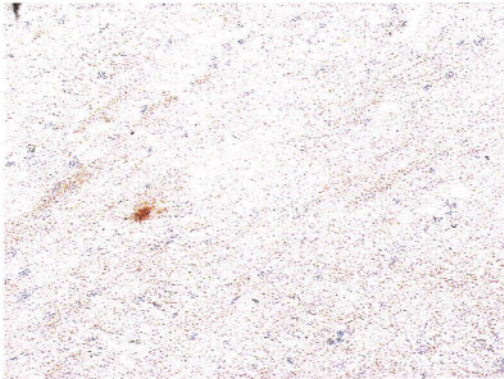


E **HL 24h (x40)**

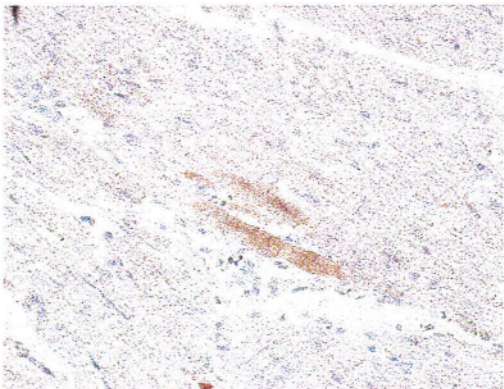
Fig.10 : **Immunomarquage des HSP 27** (coloration rouge) sur des ventricules gauches de rats contrôles (A), 8h après le stress hyperthermique (B), 24h après le stress hyperthermique (C), traités par le L-NAME et non stressés (D) ainsi que traités par le L-NAME et soumis au stress hyperthermique 24h avant le marquage (E).



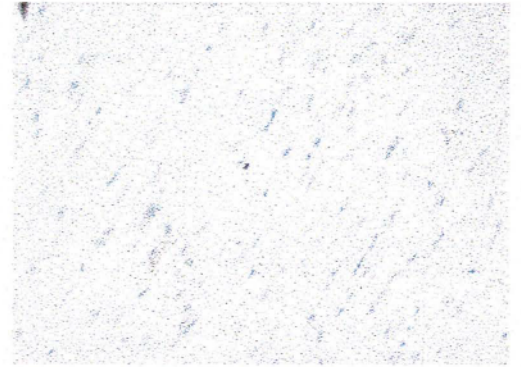
A **Contrôle** (x40)



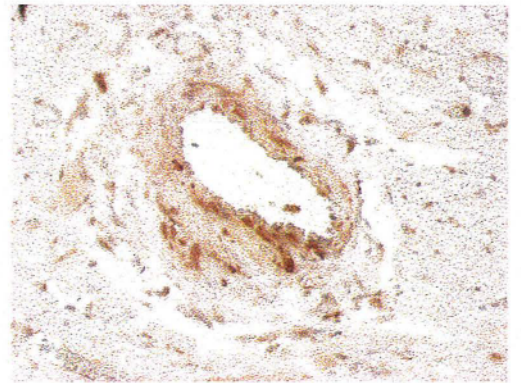
B **HS 8h** (x40)



C **HS 24h** (x40)



D **L** (x40)



E **HL 24h** (x40)

Fig. 11 : **Immunomarquage des HSP 70** (coloration rouge) sur des ventricules gauches de rats contrôles (A), 8h après le stress hyperthermique (B), 24h après le stress hyperthermique (C), traités par le L-NAME et non stressés (D) ainsi que traités par le L-NAME et soumis au stress hyperthermique 24h avant le marquage (E).

3.3 Dosage du NO

3.3.1 Teneurs tissulaires en NO

La figure 12 représente le spectre du complexe $[(MGD)_2-Fe^{2+}-NO]$ que nous avons obtenu en RPE, sur le rein. Sur les autres organes (foie, poumon, cœur, aorte) des spectres similaires sont obtenus. Le spectre constitue un triplet, caractérisé par une constante de couplage $a_N = 13.5$ G et un facteur $g = 2.04$.

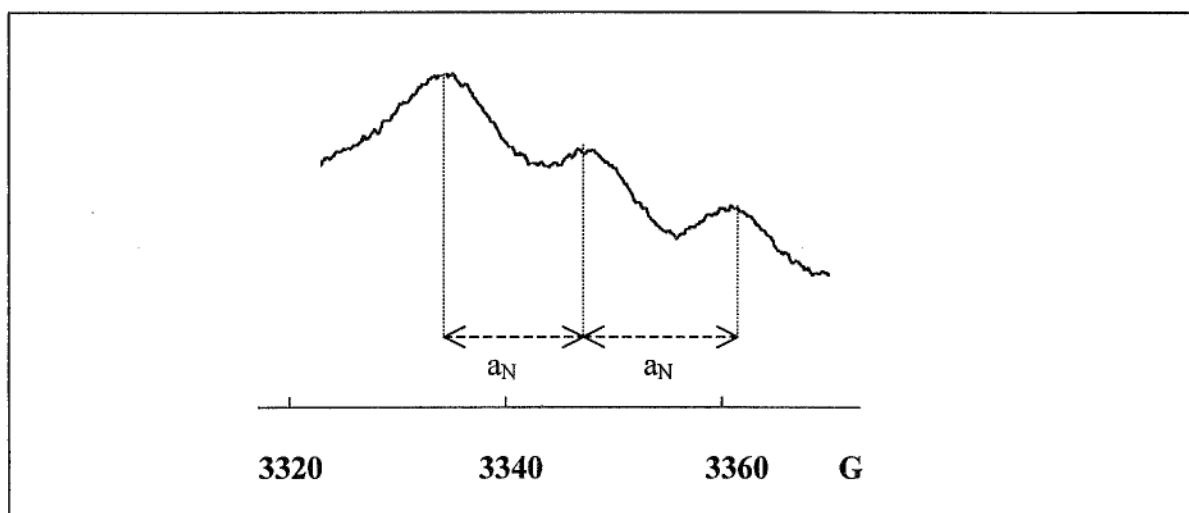


Fig. 12 : **Spectre caractéristique du complexe $[(MGD)_2-Fe^{2+}-NO]$** obtenu en RPE sur le rein, sous les conditions suivantes : température 100K, modulation de fréquence 100 KHz, modulation d'amplitude 5.73 G, puissance de la micro-onde 5 mW, fréquence de la micro-onde 9.6 GHz, champ magnétique 3350 ± 40 G, vitesse de balayage 83.89 G/s.

Les quantités de NO, en Unité Arbitraire (UA) par gramme de tissu frais, sont obtenues à partir des spectres de RPE et sont détaillées dans le tableau 5. Aucune différence significative dans les teneurs tissulaires en NO n'a été observée 1h, 8h ou 24h après le stress hyperthermique dans les différents organes étudiés.

Tableau 5 Quantités de NO exprimées en UA/g de tissu frais et détectées dans différents organes

ORGANES	C (n=10) (UA/g tissu frais)	HS 1h (n=6) (UA/g tissu frais)	HS 8h (n=6) (UA/g tissu frais)	HS 24h (n=6) (UA/g tissu frais)
Rein	35.1 ± 1.8	36.5 ± 5.5	25.8 ± 1.5	38.2 ± 2.7
Foie	18.4 ± 2.5	16.0 ± 1.9	16.5 ± 4.2	19.3 ± 0.9
Poumon	14.9 ± 1.0	18.2 ± 1.1	12.7 ± 0.5	17.6 ± 2.4
Aorte	18.2 ± 1.4	19.9 ± 2.5	15.3 ± 1.4	15.1 ± 1.7
Ventricule droit	< SD	< SD	< SD	< SD
Ventricule gauche	< SD	< SD	< SD	< SD

C = contrôle, **HS 1h** = 1h après le Stress Hyperthermique, **HS 8h** = 8h après le Stress Hyperthermique et **HS 24h** = 24h après le Stress Hyperthermique (Moyennes ± e.s.m, < SD = inférieur au seuil de détection).

3.3.2 Teneurs sanguines en NO

La figure 13 représente le spectre du complexe HbNO obtenu en RPE, sur le culot globulaire du rat. Il est caractérisé par une constante de couplage $a_N = 16.5$ G et un facteur $g = 2.015$.

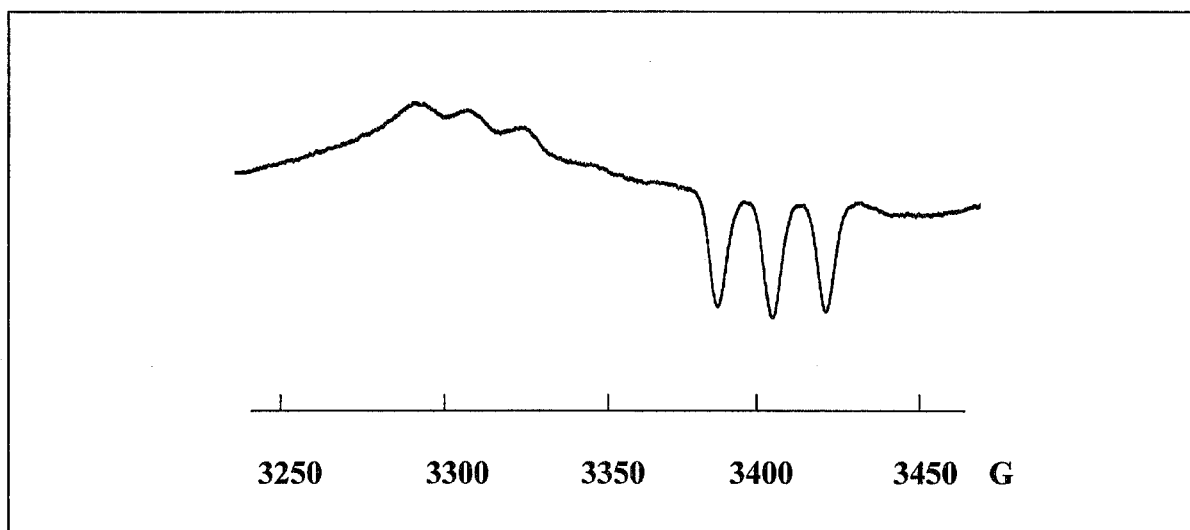


Fig. 13 : **Spectre caractéristique du complexe HbNO** obtenu en RPE, sous les conditions suivantes : température 100K, modulation de fréquence 100 KHz, modulation d'amplitude 5.73 G, puissance de la micro-onde 5 mW, fréquence de la micro-onde 9.6 GHz, champ magnétique 3350 ± 150 G, vitesse de balayage 83.89 G/s.

A partir des différents spectres obtenus, nous avons pu calculer les teneurs sanguines en HbNO et MetHb, exprimées en UA et détaillées dans le tableau 6. Aucune différence significative concernant les teneurs en HbNO et MetHb n'a été observée 1h, 8h ou 24h après le stress hyperthermique, par rapport au groupe contrôle.

Tableau 6 Quantités de HbNO et MetHb, exprimées en UA

COMPLEXES	C (n=10) (UA)	HS 1h (n=6) (UA)	HS 8h (n=6) (UA)	HS 24h (n=6) (UA)
HbNO	1.85 ± 0.08	2.03 ± 0.12	1.72 ± 0.11	1.72 ± 0.09
MetHb	0.62 ± 0.05	0.72 ± 0.08	0.80 ± 0.08	0.58 ± 0.04

C = contrôle, HS 1h = 1h après le Stress Hyperthermique, HS 8h = 8h après le Stress Hyperthermique et HS 24h = 24h après le Stress Hyperthermique (Moyennes ± e.s.m).

3.4 Dosage de l'activité des Superoxydes Dismutases (SOD)

3.4.1 Activité de la Mn-SOD

L'activité de la Mn-SOD ou SOD mitochondriale, mesurée 24h après le stress hyperthermique est représentée sur la figure 14 ; elle est exprimée en U/g de protéines. Dans le groupe contrôle, cette activité est égale à 1038 ± 226 U/g de protéines. Aucune différence significative n'a été observée dans les différents groupes HS, L et HL (1069 ± 179 , 707 ± 136 , 743 ± 116 U/g de protéines respectivement) par rapport au groupe contrôle.

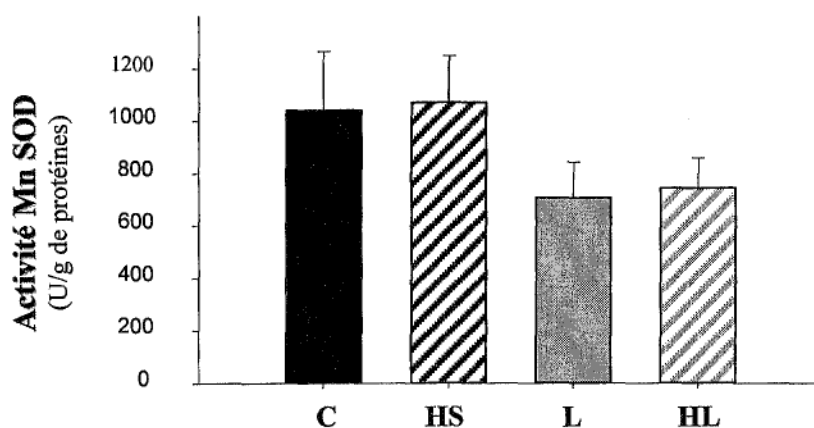


Fig. 14 : **Activité de la SOD mitochondriale exprimée en U/g de protéines dans les différents groupes**

C = contrôle, HS = Stress Hyperthermique, L = L-NAME, HL = HS + L

3.4.2 Activité de la Cu,Zn-SOD

L'activité de la Cu,Zn-SOD ou SOD cytosolique, mesurée 24h après le stress hyperthermique est représentée sur la figure 15 ; elle est exprimée en U/g de protéines. Dans le groupe contrôle, cette activité est égale à 7379 ± 451 U/g de protéines. Aucune différence significative n'a été observée dans les différents groupes HS, L et HL (8628 ± 427 , 8429 ± 971 , 7566 ± 627 U/g de protéines respectivement) par rapport au groupe contrôle.

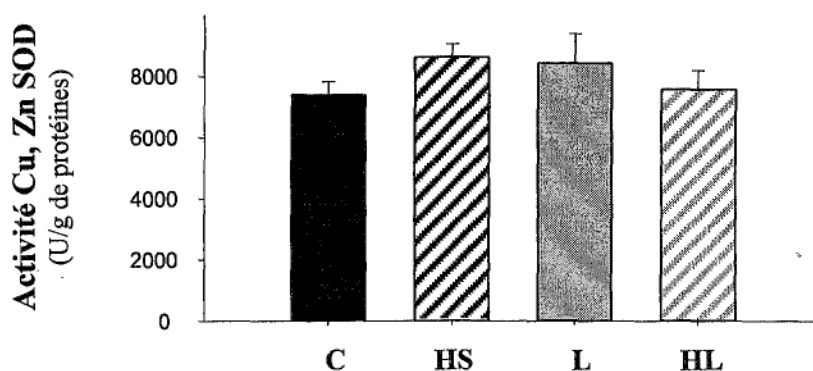


Fig. 15 : **Activité de la SOD cytosolique exprimée en U/g de protéines dans les différents groupes**

C = contrôle, HS = Stress Hyperthermique, L = L-NAME, HL = HS + L

4. DISCUSSION

Stress Hyperthermique et Protection myocardique

Nos résultats suggèrent pour la première fois l'implication du NO dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique chez le rat.

Dans un premier temps, nous avons observé qu'un stress hyperthermique diminue la taille de l'infarctus dans un modèle de cœur isolé perfusé de rat soumis à une séquence d'ischémie-reperfusion ultérieure. Ceci est en accord avec les données de nombreuses études préalables (Donnelly et al, 1992 ; Hutter et al, 1994 ; Joyeux et al, 1997a, 1998).

Nous avons ensuite évalué la contribution des différentes isoformes de NO synthases (NOS) dans le mécanisme de cardioprotection induite par le stress hyperthermique, en utilisant le L-NAME et le L-NIL, des inhibiteurs respectivement non sélectif des NOS constitutive, inductible ou neuronale et sélectif de la NOS inductible. Cette cardioprotection est totalement abolie par ces deux inhibiteurs, ce qui semble impliquer préférentiellement la NOS inductible dans la cardioprotection induite 24 heures après un stress hyperthermique, sur un modèle de cœur isolé de rat. Pour valider ce résultat il faudrait pouvoir utiliser un inhibiteur spécifique des NOS constitutive et neuronale, outil pharmacologique non disponible à l'heure actuelle.

Les résultats de la littérature sont controversés quant à l'activation de la NOS inductible par le stress hyperthermique. Certaines études suggèrent une inhibition de son expression suite à l'hyperthermie (Wong et al, 1997), inhibition liée au blocage de l'activation du NF- κ B, facteur de transcription nécessaire à la transcription du gène codant pour la NOS inductible (Feinstein et al, 1996). A l'inverse, une équipe a montré que le stress hyperthermique entraînait l'activation du NF- κ B par l'intermédiaire d'une augmentation de l'interleukine-1 (IL-1), chez le rat (Pogliaghi et al, 1995).

D'autre part, il existerait un mécanisme de régulation entre les différentes isoformes de NOS. Il semble que certains médiateurs, comme les cytokines par exemple, déplacent l'équilibre des NOS, constitutive et neuronale, vers un état phosphorylé inactif. Cet état inactif des NOS serait à l'origine d'une diminution de la production de NO qui pourrait alors stimuler l'activation du NF- κ B, permettant la transcription et l'activation de la NOS inductible, et favorisant la production de NO (figure 16) (Colasanti & Suzuki, 2000). Cette activation de la NOS inductible par le stress hyperthermique conduirait en retour à une régulation négative de la NOS constitutive (Schwartz et al, 1997 ; Lagneux et al, 2000).

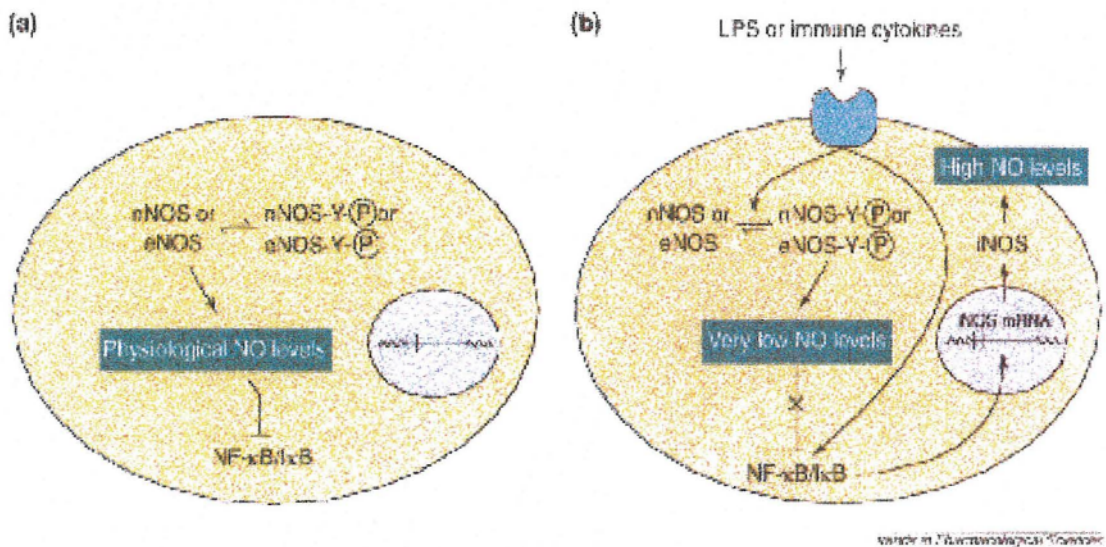


Fig. 16 : Contrôle des taux de NO (D'après Colasanti & Suzuki, 2000).

- (a) Conditions physiologiques normales maintenant NF- κ B sous forme inactive.
- (b) Conditions pathologiques. Les cytokines déplacent rapidement la NOS neuronale (nNOS) et la NOS constitutive (eNOS) vers un état phosphorylé inactif, conduisant à l'activation du NF- κ B et à l'expression de la NOS inductible (iNOS), entraînant une production importante de NO.

Il a été montré qu'un grand nombre de médiateurs impliqués dans le préconditionnement ischémique l'étaient aussi dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique. Les protéines kinases C (PKC) (Joyeux et al, 1997a) et les canaux potassiques ATP-dépendants (Joyeux et al, 1998) ont notamment été suggérés. L'équipe de Bolli a rapporté que, chez le lapin, le préconditionnement ischémique entraînait une augmentation des taux d'ARNm de la NOS inductible (Jones et al, 1999) et des études récentes suggèrent que le NO soit aussi impliqué dans la protection retardée médiée par le préconditionnement ischémique (Bolli et al, 1997 ; Takano et al, 1998 ; Guo et al, 1999 ; Imagawa et al, 1999).

D'autre part, le monophosphoryl lipid A (MLA), un dérivé du Lipopolysaccharide (LPS) est aussi capable d'induire une cardioprotection retardée contre l'ischémie-reperfusion dans différents modèles animaux dont le rat, protection qui passerait aussi par la voie de la NOS inductible (Tosaki et al, 1998).

Protéines de stress et cardioprotection

Dans un deuxième temps, nous avons montré, par marquage immunohistochimique, une induction de l'expression des HSP 70 dès 8 heures et se maintenant 24 heures après le stress hyperthermique.

Ces résultats sont en accord avec des études préalables réalisées dans notre laboratoire (Joyeux et al, 1997a), ainsi qu'avec la littérature. Plusieurs études se sont, en effet, intéressées aux protéines de stress afin d'expliquer la cytoprotection induite par le stress hyperthermique. Un des mécanismes proposés implique la caractéristique majeure des protéines de stress d'être de véritables chaperons moléculaires. En effet, elles s'associent avec d'autres protéines dénaturées pour prévenir leur agrégation et favoriser leur élimination lors de différents stress, conduisant à une protection et/ou à la restauration des fonctions cellulaires (Beckmann et al, 1990 ; Knowlton, 1995). De plus, des études utilisant des souris transgéniques surexprimant les HSP 70 ont montré une diminution de la taille de l'infarctus suite à une ischémie-reperfusion par rapport à des souris non transgéniques (Marber et al, 1995 ; Hutter et al, 1996). En revanche, certaines études ont montré que l'abolition de cette protection (par des inhibiteurs des PKC et de la p38 MAP kinase), ne s'accompagnait pas d'une altération de l'induction des HSP 70 (Joyeux et al, 1997a ; Joyeux et al, 2000). Nos résultats confirment ceci puisque l'abolition de la protection myocardique dans le groupe stressé et prétraité au L-NAME ne s'accompagne pas d'une diminution de l'expression des HSP 70, au niveau du cœur. Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par l'implication d'autres protéines de stress, telles que les HSP 27, dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique.

En effet, il a été observé que l'induction de l'expression des HSP 27 dans des cardiomyocytes de rat induisait une protection contre les lésions provoquées par une ischémie simulée (Martin et al, 1997). Nos résultats suggèrent une très nette augmentation de l'expression des HSP 27 dès 8 heures, mais surtout 24 heures après l'hyperthermie. En revanche, comme pour les HSP 70, cette induction n'est pas affectée par le L-NAME. Néanmoins, il semble que la cytoprotection induite par les HSP 27 ne résulte pas de l'induction de leur expression, mais plutôt de leur phosphorylation (Huot et al, 1996).

Deux études récentes ont établi un lien direct entre la cardioprotection induite par le préconditionnement ischémique et l'état des HSP 27 (Sakamoto et al, 2000 ; Dana et al, 2000). Il semble, en effet, que la phosphorylation et la translocation de ces protéines du cytosol vers le sarcomère soient indispensables à la cardioprotection induite par le préconditionnement ischémique, puisqu'un inhibiteur de la p38 MAP kinase abolit la translocation des HSP 27 ainsi que la cardioprotection (Sakamoto et al, 2000). Dana et ses collaborateurs (2000) suggèrent aussi que la phosphorylation des HSP 27 par la voie de la p38 MAP kinase puisse être l'un des effecteurs distaux du préconditionnement retardé induit par les récepteurs A₁ de l'adénosine.

Il se peut donc que la perte de protection observée suite au prétraitement par le L-NAME mette en jeu l'état de phosphorylation des HSP 27 qu'il serait intéressant d'étudier dans notre modèle de stress hyperthermique. Des études complémentaires sont nécessaires afin de définir le rôle de ces protéines dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique.

Stress hyperthermique et dosage du NO

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons dosé le NO tissulaire et sanguin afin de confirmer l'implication du NO dans la protection induite par le stress hyperthermique.

A l'état basal, le complexe NO-FeMGD a été détecté au niveau du rein, du foie, de l'aorte et du poumon, mais pas au niveau du cœur. Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature (Lecour et al, 1999). Au niveau sanguin, ce complexe n'est pas détecté, mais il a été possible de détecter directement les complexes nitrosylhémoglobine (HbNO) et méthémoglobine (MetHb) produits par l'action du NO sur la désoxyhémoglobine (Hb) et sur l'oxyhémoglobine (HbO₂) respectivement.

Toutefois, nous n'avons observé aucune différence par rapport au groupe contrôle, 1 heure, 8 heures ou 24 heures après le stress hyperthermique. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Malyshev et collaborateurs (1995) qui observaient une augmentation de la production de NO, 1 heure après un stress hyperthermique. Cette divergence pourrait éventuellement s'expliquer par le choix de l'anesthésique utilisé. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une interaction entre les taux de NO détectés et l'anesthésique utilisé. Les taux de NO détectés au niveau du cerveau de rat sont beaucoup plus importants chez les animaux anesthésiés à l'aide de l'halothane, que chez ceux anesthésiés au pentobarbital (Sjakste et al, 1999). De plus, il a été montré que le thiopental est capable d'inhiber la production de NO dans des aortes de rat (Castillo et al, 1999).

D'autre part, compte tenu de la complexité de la méthode, nous avons choisi de n'étudier que trois temps : 1 heure, 8 heures et 24 heures après le stress hyperthermique. Ce choix a été dicté par les observations suivantes : une induction de NO a été observée 1 heure après un stress hyperthermique (Malyshev et al, 1995), alors que celle-ci est observée 6 heures après une injection de LPS (Lecour et al, 1999) et 8 heures après une injection de MLA (György et al, 1999). Il est malgré tout envisageable qu'une production transitoire de NO ait pu échapper à notre investigation.

De plus, le NO détecté par le Fe-MGD ne représente que le «NO libre» qui peut provenir de l'activation des NOS constitutive ou inductible, mais également du catabolisme des différentes formes de stockage du NO pouvant varier en fonction de l'organe considéré (Lecour et al, 1999). De façon à confirmer ou infirmer nos résultats, nous pourrions utiliser des méthodes indirectes de détection du NO, comme par exemple le dosage des nitrites et des nitrates, la détermination du GMP_c produit ou la localisation et l'activation des NO synthases par immunohistochimie.

Certaines évidences suggèrent d'autre part que les NOS pourraient, dans certaines conditions, produire l'anion superoxyde (O₂⁻) plutôt que du NO, notamment lorsque les taux tissulaires locaux de cofacteurs sont diminués (Xia et al, 1996 ; Väsquez-Vivar et al, 1998). Ainsi, l'abolition de la cardioprotection induite par le stress hyperthermique par les inhibiteurs des NOS pourrait passer par l'inhibition de la libération de O₂⁻ plutôt que par une inhibition de la production de NO. L'administration d'un antioxydant au moment du préconditionnement ischémique abolit la cardioprotection induite lors de la deuxième fenêtre (Sun et al, 1996, Zhou et al, 1996). Il semble donc que la libération initiale de radicaux libres soit un des médiateurs de la seconde fenêtre du préconditionnement, ce qui illustre une nouvelle fois cette dualité d'action des radicaux libres comme du NO, bénéfiques dans certaines situations mais délétères dans d'autres.

Stress hyperthermique et superoxyde Dismutase

La libération de radicaux libres dérivés de l'oxygène est considérée comme un des mécanismes responsables des lésions d'ischémie-reperfusion (Opie, 1989). De toutes les enzymes antioxydantes, les superoxydes dismutases, permettant la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure 17) ont été parmi les plus étudiées.

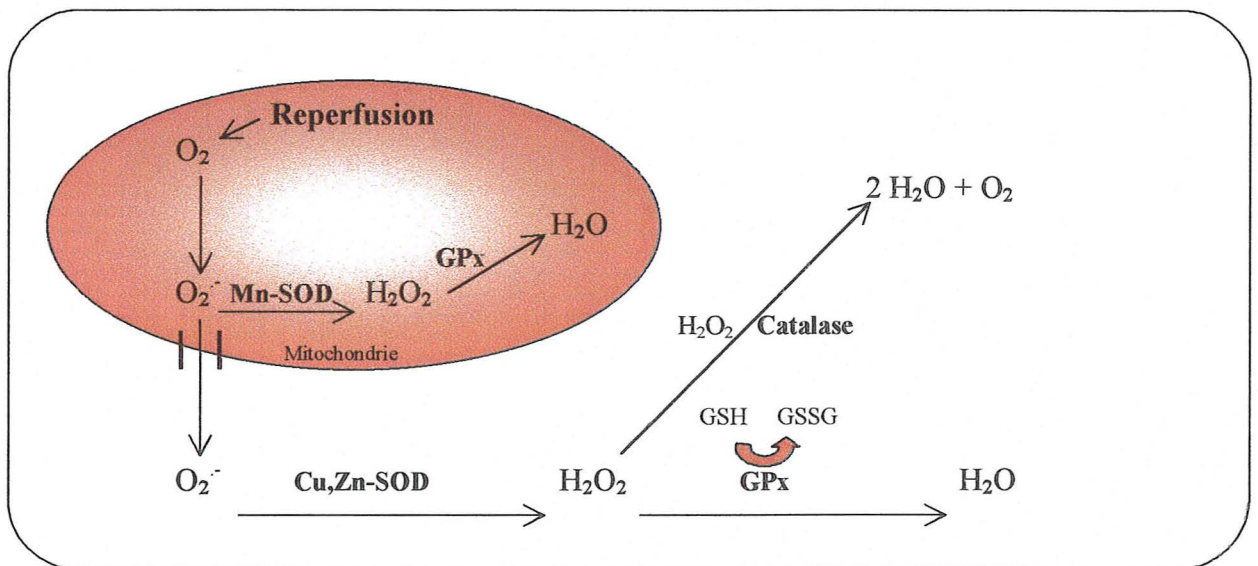


Fig. 17 : Voies possibles de production et de métabolisation des radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) lors de la reperfusion

$O_2^{\cdot -}$ = anion superoxyde, H_2O_2 = peroxyde d'hydrogène, Mn-SOD = Superoxyde Dismutase mitochondriale, Cu,Zn-SOD = Superoxyde Dismutase cytosolique, GPx = Glutathion Peroxydase, GSH = Glutathion réduit, GSSG = Glutathion oxydé

Il a été montré qu'une surexpression de la Mn-SOD sur un modèle de souris transgéniques entraîne une protection contre les lésions d'ischémie-reperfusion (Chen et al, 1998).

De plus, l'induction des superoxydes dismutases, et notamment de la Mn-SOD, semblent être impliquée dans la tolérance à l'ischémie induite lors de la seconde fenêtre du préconditionnement ischémique en diminuant la formation de radicaux libres toxiques libérés lors de la reperfusion (Yamashita et al, 1994). Il en est de même dans les mécanismes de protection induite par le MLA, puisque 24 heures après l'injection de MLA, l'activité de la Mn-SOD est augmentée de façon significative (Yamashita et al, 1999).

Dans notre modèle, nous n'avons observé aucune induction de l'activité de la Mn-SOD, ni de la Cu,Zn-SOD 24 heures après le stress hyperthermique. De plus, le L-NAME, bien que capable d'abolir la protection induite par le stress hyperthermique, n'a montré aucun effet sur ces activités.

Les études portant sur le lien entre le stress hyperthermique et l'activité des enzymes antioxydantes sont très controversées à cause des différences inter-espèces, de la méthodologie utilisée et des conditions expérimentales.

Il a été rapporté une augmentation des taux de Mn-SOD sur des cardiomyocytes de rat, 24 heures après un stress hyperthermique (Yamashita et al, 1997), de même que sur un modèle de porc (Maulik et al, 1995). En revanche, chez le rat, l'activité des superoxydes dismutases n'est pas influencée par le stress hyperthermique lorsque mesurée 24 heures après le stress hyperthermique (Currie et al, 1988 ; Joyeux et al, 1997b). Cependant, Yamashita et ses collaborateurs (1998) suggèrent une induction de la Mn-SOD, chez le rat, 48 à 72 heures après le stress hyperthermique, ce qui pourrait expliquer l'absence d'induction que nous observons à 24 heures.

CONCLUSION

Thèse soutenue par : Claire ARNAUD

Titre : **Mise en évidence de l'implication du NO dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique chez le rat.**

D. CONCLUSION

Nos travaux suggèrent, pour la première fois, une implication de la voie du NO dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique, puisque celle-ci est totalement abolie par des inhibiteurs des NOS. En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'induction de la production de NO, 1h, 8h ou 24h après l'hyperthermie, mais des expériences complémentaires seraient souhaitables afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats. Les protéines de stress de bas poids moléculaires (HSP 27) pourraient, de plus, être impliquées dans cette protection puisque nos résultats suggèrent une augmentation de leur expression suite à l'hyperthermie. Il est toutefois nécessaire de vérifier le rôle exact de ces protéines dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique puisque le prétraitement des animaux au L-NAME n'affecte pas leur expression. De même, l'expression des HSP 70 est augmentée par le stress hyperthermique, mais n'est pas affectée par le prétraitement au L-NAME. Enfin, les superoxydes dismutases ne semblent impliquées dans ce mécanisme cardioprotecteur induit 24h après un stress hyperthermique.

Dans un premier temps, il serait intéressant de vérifier l'induction de l'expression des HSP grâce à une autre technique, comme le western blot par exemple, afin d'obtenir des résultats quantitatifs. En effet, la technique d'immunohistochimie que nous avons utilisée pour la détection de ces protéines nous permet seulement d'obtenir des résultats qualitatifs, comme la localisation des protéines de stress.

Il serait ensuite intéressant d'étudier le lien éventuel entre les différents médiateurs suggérés dans cette protection par le stress hyperthermique et le NO. L'ouverture des canaux K_{ATP} mitochondriaux, considérés comme effecteurs de la cardioprotection induite par l'hyperthermie, pourrait être dépendante de la voie du NO. En effet, deux études récentes ont montré un lien entre l'activation de ces canaux et le NO (Ockaili et al, 1999 ; Sasaki et al, 2000).

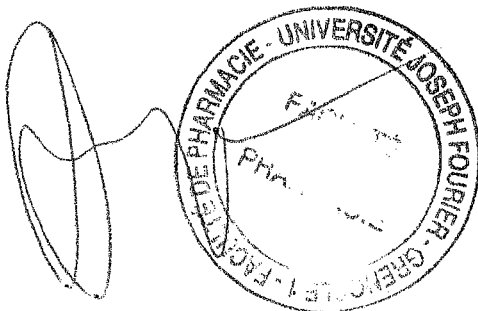
D'autre part, les PKC comme la p38 MAP kinase, médiateurs de la cardioprotection induite par le stress hyperthermique (Joyeux et al, 1997b ; Joyeux et al, 2000), ont un rôle important dans la phosphorylation des HSP 27 qui semblent fortement impliquées dans les mécanismes cardioprotecteurs (Sakamoto et al, 2000 ; Dana et al, 2000). Il serait alors intéressant de vérifier l'état de phosphorylation de ces protéines dans notre modèle de stress hyperthermique, ainsi que le rôle du NO dans l'activation des PKC et de la p38 MAP kinase dans ce même modèle.

Enfin, après avoir étudié le rôle du NO comme « déclencheur » de la cardioprotection induite par le stress hyperthermique, il serait aussi intéressant de vérifier s'il ne possède pas non plus un rôle d'effecteur direct de la réponse, en utilisant les mêmes inhibiteurs de NO synthases, administrés cette fois juste avant l'épisode d'ischémie-reperfusion.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le 9 Octobre 2000.

Le Doyen et Président du jury,



P. DEMENGE

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

E. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Andrew PJ & Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43 : 521-531, 1999.

Baxter GF, Marber MS, Patel VC & Yellon DM. Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation* 90 : 2993-3000, 1994.

Baxter GF, Goma FM & Yellon DM. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol* 115 : 224-224, 1995.

Beckmann RP, Mizzen LE & Welch WJ. Interaction of HSP 70 with newly synthesized proteins : implication for protein folding and assembly. *Science* 248 : 850-854, 1990.

Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, Takano H, Qiu Y, Guo Y, Zhang Q & Jadoon AK. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 81 : 1094-1107, 1997.

Burel C, Mezger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S & Morange M. Mammalian heat shock protein families. *Experientia* 48 : 630-634, 1992.

Castillo C, Asbun J, Escalante B, Villalon CM, Lopez P & Castillo EF. Thiopental inhibits nitric oxide production in rat aorta. *Can J Physiol Pharmacol* 77 : 958-966, 1999.

Champion HC & Kadowitz PJ. NO release and the opening of K ATP channels mediate vasodilator responses to histamine in the cat. *Am J Physiol* 273 : H928-H937, 1997.

Chen Z, Siu B, Ho Y, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC & Chua BHL. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 30 : 2281-2289, 1998.

Clerk A, Michael A & Sugden PH. Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem J* 333 : 581-589, 1998.

Colasanti M & Suzuki H. The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci* 21 : 249-252, 2000.

Cumming DVE, Heads RJ, Brand NJ, Yellon DM & Latchman DS. The ability of heat stress and metabolic preconditioning to protect primary rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 91 : 79-85, 1996.

Currie RW & White FP. Characterisation of the synthesis and accumulation of a 71-kilodalton protein induced in rat tissues after hyperthermia. *Can J Biochem Cell Biol* 61 : 438-446, 1983.

Currie RW, Karmazyn M, Kloc M & Mailer K. Heat-shock response is associated with enhanced postischemic recovery. *Circ Res* 63 : 543-549, 1988.

Dana A, Skarli M, Papakrivopoulou J & Yellon DM. Adenosine A₁ receptor induced delayed preconditioning in rabbits: Induction of p38 Mitogen-activated protein kinase activation and HSP 27 phosphorylation via a tyrosine kinase- and protein kinase C-dependent mechanism. *Circ Res* 86 : 989-997, 2000.

Das DK, Maulik N & Moraru II. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol* 27 : 181-193, 1995.

Ding XZ, Tsokos GC & Kiang JG. Heat shock factor-1 protein in heat shock factor-1 gene-transfected human epidermoid A431 cells requires phosphorylation before inducing heat shock protein-70 production. *J Clin Invest* 99 : 136-143, 1997.

Donnelly TJ, Sievers RE, Vissen FLJ, Welch WJ & Wolfe CL. Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation* 85 : 769-778, 1992.

Eaton P, Awad Wi, Miller JI, Hearse DJ & Shattock MJ. Ischemic preconditioning : a potential role for constitutive low molecular weight stress protein translocation and phosphorylation ? *J Mol Cell Cardiol* 32 : 961-971, 2000.

Feinstein DL, Galea E, Aquino DA, LI GC, Xu H & Reis DJ. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric oxide synthase expression by decreasing NF- κ B activation. *J Biol Chem* 271 : 17724-17732, 1996.

Furchgott RF & Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 : 373-376, 1980.

Gross GJ & Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* 84 : 973-979, 1999.

Grover G. Protective effect of ATP-sensitive potassium channel openers in experimental myocardial ischaemia. *J Cardiovascular Pharmacol* 24 : S18-S27, 1994.

Grover G. Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP})openers in models of myocardial ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 75 : 309-315, 1997.

Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, Han H, Laubach VE, Ping P, Yang Z, Qiu Y & Bolli R. The late phase of preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 11507-11512, 1999.

György K, Muller B, Végh A, Kleschyov AL & Stoclet JC. Triggering role of nitric oxide in the delayed protective effect of monophosphoryl A in rat heart. *Br J Pharmacol* 127 : 1892-1898, 1999.

Hagar JM, Hale SL & Kloner RA. Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res* 68 : 61-68, 1991.

Heads RJ, Latchman DS & Yellon DM. Differential stress protein mRNA expression during early ischaemic preconditioning in the rabbit heart and its relationship to adenosine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 27 : 2133-2148, 1995.

Hoshida S, Kuzuya T, Fuji H, Yamashita N, Oe H, Hori M, Suzuki K, Taniguchi N & Tada M. Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *Am J Physiol* 264 : H33-H39, 1993.

Huot J, Houle F, Spitz R & Landry J. HSP 27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* 56 : 273-279, 1996.

Hutter MM, Sievers RE, Barbosa V & Wolfe CL. Heat shock protein induction in rat hearts : direct correlation between the amount of heat shock protein induced and the degree of myocardial protection. *Circulation* 89 : 355-360, 1994.

Hutter JJ, Mestral R, Tam EK, Sievers RE, Dilmann WH & Wolfe CL. Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreases infarct size in vivo. *Circulation* 94 : 1408-1411, 1996.

Imagawa J, Baxter GF & Yellon DM. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, blocks the second window of protection 48 hours after ischaemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 1885-1893, 1997.

Imagawa J, Yellon DM & Baxter GF. Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br J Pharmacol* 126 : 701-708, 1999.

Ignarro LJ, Byrns R, Buga GM, Woods RS & Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide : use of pyrogallol and superoxide dismutase to study the endothelium-dependant and nitric oxide elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 244 : 181-189, 1987.

Joyeux M, Ribuot C, Bourlier V, Verdetti J, Durand A, Richard MJ, Godin-Ribuot D & Demenge P. *In vitro* antiarrhythmic effect of prior hyperthermia : Implication of catalase. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 3285-3292, 1997a.

Joyeux M, Baxter GF, Thomas DL, Ribuot C & Yellon DM. Protein kinase C is involved in resistance to myocardial infarction induced by heat stress. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 3311-3319, 1997b.

Joyeux M, Godin-Ribuot D & Ribuot C. Resistance to myocardial infarction induced by heat stress and the effect of ATP-sensitive potassium channel blockade in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol* 123 : 1085-1088, 1998.

Joyeux M, Godin-Ribuot D, Yellon DM, Demenge P & Ribuot C. Heat stress response and myocardial protection. *Fund Clin Pharmacol* 13 : 1-10, 1999.

Joyeux M, Boumendjel A, Carroll R, Ribuot C, Godin-Ribuot D & Yellon DM. SB 203580, a mitogen-activated protein kinase inhibitor, abolishes resistance to myocardial infarction induced by heat stress. *Cardiovasc Drug Ther* 14 : 387-393, 2000.

Jones WK, Flaherty MP, Tang XL, Takano H, Qui Y Banerjee S, Smith T & Bolli R. Ischemic preconditioning increases iNOS transcript levels in conscious rabbits via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 31 : 1469-1481, 1999.

Karmazyn M, Mailer K & Currie RW. Acquisition and decay of heat-shock-enhanced postischaemic ventricular recovery. *Am J Physiol* 259 : 424-431, 1990.

Kiang JG & Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa : Molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther* 80 : 183-201, 1998.

Kim D, Ouyang H & Li GC. Heat shock protein HSP 72 accelerates the recovery of heat-shocked mammalian cells through its modulation of heat shock transcription factor HSF1. *Cell Biology* 92 : 2126-2130, 1995.

Kingma JG, Simard D, Rouleau JR, Tanguay RM & Currie RW. Effect of 3-aminotriazole on hyperthermia-mediated cardioprotection in rabbits. *Am J Physiol* 270 : 1165-1171, 1996.

Knowlton AA, Brecher P & Apstein CS. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. *J Clin Invest* 87 : 139-147, 1991.

Knowlton AA. The role of heat shock proteins in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 27 : 121-131, 1995.

Kregel KC, Overton JM, Johnson DG, Tipton CM & Seals DR. Mechanism for pressor response to nonexertional heating in the conscious rat. *J Appl Physiol* 71 : 192-196, 1991.

Kregel KC, Johnson DG & Seals DR. Tissue-specific noradrenergic activity during acute heat stress in rats. *J Appl Physiol* 74 : 1988-1993, 1993.

Kukreja RC, Kontos MC, Loesser KE, Batra SK, Qian YZ, Gbur CJ, Nassem SA, Jesse RL & Hess ML. Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am J Physiol* 267 : H2213-2219, 1994.

Kyriakis JM & Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 18 : 567-577, 1996.

Lagneux C, Godin-Ribuot D, Demenge P & Ribuot C. Nitric oxide and its role in the induction of kinin B₁-receptors after heat stress in the rat. *Immunopharmacol* 48 : 43-49, 2000.

Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM & Landry J. Induction of chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. *J Biol Chem* 268 : 3420-3429, 1993.

Lecour S, Maupoil V, Siri O, Tabard A & Rochette L. Electron spin resonance detection of nitric oxide generation in major organs from LPS-treated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 33 : 78-85, 1999.

Lindquist S & Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 22 : 631-677, 1988.

Liu Y, Sato T, O'Rourke B & Marban E. Mitochondrial ATP-dependant potassium channels. Novel effectors of cardioprotection. *Circulation* 97 : 2463-2469, 1998.

Loktionova SA, Ilyinskaya OP & Kabakov AE. Early and delayed tolerance to simulated ischemia in heat preconditioned endothelial cells : a role for HSP 27. *Am J Physiol* 275 : H2147-H2158, 1998.

Malyshev IY, Manukhina EB, Mikoyan VD, Kubrina LN & Vanin AF. Nitric oxide is involved in heat-induced HSP70 accumulation. *FEBS Lett* 370 : 159-162, 1995.

Malyshev IY, Malugin AV, Golubeva LY, Zenina TA, Manukhina EB, Mikoyan VD & Vanin AF. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett* 391 : 21-23, 1996.

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* 88 : 1264-1272, 1993.

Marber MS, Walker JM, Latchman DS & Yellon DM. Myocardial protection after whole-body heat stress in the rabbit is dependant on metabolic substrate and is related to the amount of the inducible 70-kD heat stress protein. *J Clin Invest* 93 : 1087-1094, 1994.

Marber MS, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL & Dillman WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increase the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 95 : 1446-1456, 1995.

Marklund SL, Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 251 : 7504-7507, 1976.

Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL & Dilmann WH. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* 96 : 4343-4348, 1997.

Maulik N, Wei Z, Liu X, Engelman RM, Rousou JA & Das DK. Improved postischemic ventricular functional recovery by amphetamine is linked with its ability to induced heat shock. *Mol Cell Biochem* 137 : 17-24, 1994.

Maulik N, Engelman RM, Wei Z, Liu X, Rousou JA, Flack JE, Deaton DW & Das DK. Drug-induced heat-shock preconditioning improves postischemic ventricular recovery after cardiopulmonary bypass. *Circulation* 92 : II381-II388, 1995.

McLaughlin MM, Kumar S, McDonnell PC, Van Horn S, Lee JC, Livi GP & Young PR. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 271, 8488-8492, 1996.

Meng X, Brown JM, Ao L, Nordeen SK, Franklin W, Harken AH & Banerjee A. Endotoxin induces cardiac HSP70 and resistance to endotoxemic myocardial depression in rats. *Am J Physiol* 271 : 1316-1324, 1996a.

Meng X, Brown JM, Ao L & Banerjee A. Norepinephrine induces cardiac heat shock protein 70 and delayed cardioprotection in the rat through α_1 -adrenoreceptors. *Cardiovasc Res* 32 : 374-383, 1996b.

Mehta HB, Popovich BK & Dillman WH. Ischemia induces changes in the level of mRNAs coding for stress protein 71 and creatine kinase M. *Circ Res* 63 : 512-517, 1988.

Mocanu MM, Steare SE, Evans MC, Nugent JH & Yellon DM. Heat stress attenuates free radical release in the isolated perfused rat heart. *Free Radical Biol Med* 15 : 459-463, 1993.

Morimoto RI, Sarge KD & Abravaya K. Transcriptional regulation of heat shock genes. *J Biol Chem* 267 : 21987-21990, 1992.

Murry CE, Jennings RB & Reimer KA. Preconditioning with ischemia : a delay of sublethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 : 1124-1136, 1986.

Nayeem MA, Elliott GT, Shah MR, Hastillo-Hess SL & Kukreja RC. Monophosphoryl lipid A protects adult rat cardiac myocytes with induction of the 72-kD heat shock protein : A cellular model of pharmacologic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 2305-2310, 1997.

Noma A. ATP-regulated K⁺ channel in cardiac muscle. *Nature* 305 : 147-148, 1983.

Ockaili R, Emani VR, Okubo S, Brown M, Krottapalli K & Krukreja RC. Opening of mitochondrial KATP channel induces early and delayed cardioprotective effect : role of nitric oxide. *Am J Physiol* 277 : H2425-H2434, 1999.

Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacological modification. *Circulation* 80 : 1049-1062, 1989.

Parrat JR & Kane KA. KATP channels in ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 28 : 783-787, 1994.

Parrat JR & Szekeres L. Delayed protection of the heart against ischemia. *Trends Pharmacol Sci* 16 : 351-355, 1995.

Pell T, Baxter GF & Yellon DM. KATP channel blockade abolishes myocardial ischemic tolerance induced by heat stress. *J Mol Cell Cardiol* 29 : A111, 1997.

Pogliaghi G, Tacchini L, Anzon E, Radice L & Bernelli-Zazzera A. Heat shock activation of NF- κ B in rat liver is mediated by interleukin-1. *FEBS lett* 372 : 181-184, 1995.

Qiu Y, Tang XL, Park SW, Sun JZ, Kalya A & Bolli R. The early and late phases of ischemic preconditioning : a comparative analysis of their effects on infarct size, myocardial stunning, and arrhythmias in conscious pigs undergoing a 40-min coronary occlusion. *Circ Res* 80 : 730-742, 1997.

Sakamoto K, Urushidani T & Nagao T. Translocation of HSP27 to cytoskeleton by repetitive hypoxia-reoxygenation in the rat myoblast cell line, H9c2. *Biochem Biophys Res Commun* 251 : 576-579, 1998.

Sakamoto K, Urushidani T & Nagao T. Translocation of HSP27 to sarcomere induced by ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 269 : 137-142, 2000.

Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B & Marban E. Activation of mitochondrial ATP-dependant potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 101 : 439-445, 2000.

Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265 : 12111-12114, 1990.

Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB & Blantz RC. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest* 100 : 439-448, 1997.

Shinbo A & Ijima T. Potentiation by nitric oxide of the ATP-sensitive K current induced by K channel openers in guinea-pig ventricular cells. *Br J Pharmacol* 120 : 1568-1574, 1997.

Sjakste N, Baumane L, Meirena D, Lauberte L, Dzintare M & Kalvins I. Drastic increase in nitric oxide content in rat brain under halothane anesthesia revealed by EPR method. *Biochem Pharmacol* 58 : 1955-1959, 1999.

Stambaugh K, Elliott GT, Jacobson KA & Liang BT. Additive effects of late preconditioning produced by monophosphoryl lipid A and the early preconditioning mediated by adenosine receptors and K_{ATP} channel. *Circulation* 99 : 3300-3307, 1999.

Stokoe D, Engel K, Campbell D, Cohen P & Gaestel M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small heat shock proteins. *FEBS Lett* 313 : 307-313, 1992.

Sugden PH & Clerk A. Stress-responsive mitogen activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 83 : 345-352, 1998.

Sun JZ, Tang XL, Park SW, Qiu Y, Turrens JF & Bolli R. Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs. *J Clin Invest* 97 : 562-576, 1996.

Tanno M, Tsuchida A, Nozawa Y, Matsumoto T, Hasegawa T, Miura T & Shimamoto K. Roles of tyrosine kinase and protein kinase C in infarct size limitation by repetitive ischemic preconditioning in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 35 (3) : 345-352, 2000.

Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, Zhang Q & Bolli R. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 98 : 441-449, 1998.

Tosaki A, Maulik N, Elliott GT, Blasig IE, Engelman RM & Das DK. Preconditioning of rat heart with monophosphoryl lipid A : A role for nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 285 : 1274-1279, 1998.

Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Siler Masters BS, Karoui H, Tordo P & Pritchard KA. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase : the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 9220-9225, 1998.

Walker DM, Pasini E, Kucukoglu S, Marber MS, Iliodromitis E, Ferrari R & Yellon DM. Heat stress limits infarct size in the isolated perfused rabbit heart. *Cardiovasc Res* 27 : 962-967, 1993.

Wang P & Zweier J. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. *J Biol Chem* 271 (46) : 29223-29230, 1996.

Wong HR, Ryan M & Wispe JR. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I κ -B degradation and NF- κ B nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 231 : 257-263, 1997.

Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH & Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 6770-6774, 1996.

Yamashita N, Nishida M, Hoshida S, Kuzuya T, Hori M, Taniguchi N, Kamada T & Tada M. Induction of manganese superoxyde dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *J Clin Invest* 94, 2193-2199, 1994.

Yamashita N, Hoshida S, Nishida M, Igarashi J, Taniguchi N, Tada M, Kuzuya T & Hori M. Heat shock-induced manganese superoxide dismutase enhances the tolerance of cardiac myocytes to hypoxia-reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 1805-1813, 1997.

Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T & Hori M. Whole-body hyperthermia provides biphasic cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in the rat. *Circulation* 98 : 1414-1421, 1998.

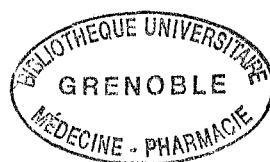
Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Taniguchi N, Kuzuya T & Hori M. Monophosphoryl lipid A provides biphasic cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Br J Pharmacol* 128 : 412-418, 1999.

Yellon DM, Pasini E, Cargnoni A, Marber MS, Latchman DS & Ferrari R. The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 24 : 895-907, 1992.

Yellon DM & Baxter GF. A «second window of protection» or delayed preconditioning phenomenon : future horizons for myocardial protection ? *J Mol Cell Cardiol* 27 : 1023-1034, 1995.

Zhao L, Weber PA, Smith JR, Comerford ML & Elliott GT. Role of inducible nitric oxide synthase in pharmacological «preconditioning» with monophosphoryl lipid A. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 1567-1576, 1997.

Zhou X, Zhai X & Ashraf M. Direct evidence that initial oxidative stress triggered by preconditioning contributes to second window of protection by endogenous antioxidant enzyme in myocytes. *Circulation* 93 : 1177-1184, 1996.



Mise en évidence de l'implication du monoxyde d'azote dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique, chez le rat

Résumé :

L'hyperthermie induit la synthèse de protéines de stress, les HSPs, qui semblent être impliqués dans la survie cellulaire suite à un stress délétère comme la séquence ischémie-reperfusion. Cette cardioprotection, induite 24h après l'hyperthermie, est analogue à celle induite lors de la seconde fenêtre du préconditionnement ischémique et implique, entre autre, les protéines kinases C et les canaux potassiques ATP-dépendants. L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence une éventuelle implication du NO dans la cardioprotection induite par le stress hyperthermique.

Des rats mâles de souche Wistar ont été séparés en six groupes : soumis ou non au stress hyperthermique (42°C, 15 minutes) et prétraités ou non par le L-NAME, un inhibiteur non spécifique des différentes isoformes de NO synthase (NOS) ou le L-NIL, un inhibiteur spécifique de la NOS inductible. Suite au stress hyperthermique, nous avons effectué la détermination de la taille de l'infarctus après une séquence d'ischémie-reperfusion (30 min ischémie régionale, 120 min reperfusion), grâce à une technique colorimétrique. La détection des HSPs a été effectuée par immunomarquage et la production de NO dans le foie, le rein, l'aorte, le cœur et le poumon a été déterminée par la technique de résonance paramagnétique électronique utilisant comme piègeur. Le NO sanguin a été mesuré directement par détection des complexes endogènes HbNO et MetHb, et nous avons dosé l'activité de la superoxyde dismutase.

La réduction de la taille de l'infarctus observée 24h après le stress hyperthermique ($19.8 \pm 2.6\%*$ vs $33.5 \pm 2.7\%$ chez les contrôles) est totalement abolie par les prétraitements par le L-NAME et le L-NIL ($42.6 \pm 5.1\%$ et $32.8 \pm 4.8\%$ respectivement). D'autre part, le stress hyperthermique induit l'expression des HSP 27 et 70, induction qui n'est pas affectée par le prétraitement au L-NAME. Alors que les NOS semblent être impliquées dans cette cardioprotection, nous n'avons pas détecté d'induction de la production de NO, 1h, 8h ou 24h après le stress hyperthermique. Enfin, nous n'avons observé aucune modification de l'activité de la superoxyde dismutase 24h après l'hyperthermie.

En conclusion, il semble que la cardioprotection induite 24h après le stress hyperthermique mette en jeu la voie du NO, favorisant l'expression de protéines de stress qui pourraient jouer un rôle dans ce mécanisme de protection.

Mots clés : Stress hyperthermique ; Cardioprotection ; NO ; L-NAME ; Protéines de stress ; Superoxyde dismutase.