

Université de Poitiers  
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2015

Thèse n°

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
(Arrêté du 17 juillet 1987)  
et

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES  
DE BIOLOGIE MEDICALE  
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement  
le 27 mars 2015 à POITIERS  
par Mademoiselle Sophie GUILLOU

Etude de l'effet cardioprotecteur du fondaparinux dans l'ischémie-reperfusion  
myocardique chez le rat

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur François Seguin  
Membres : - Monsieur le Professeur Thierry Hauet  
- Monsieur le Professeur Fabrice Prunier  
- Monsieur le Professeur Christophe Jayle

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Laurent Macchi



UNIVERSITE DE POITIERS

## Faculté de Médecine et de Pharmacie



Année universitaire 2014-2015

### PHARMACIE

#### Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

#### Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- GRIGNON Claire, PH
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

#### PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwine, Pharmacien

#### Professeur 2<sup>nd</sup> degré

- DEBAIL Didier

#### Maître de Langue - Anglais

- PERKINS Marguerite,

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

**Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers**

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. AGIUS Gérard, bactériologie-virologie</li><li>2. ALLAL Joseph, thérapeutique</li><li>3. BATAILLE Benoît, neurochirurgie</li><li>4. BENSADOUN René-Jean, cancérologie – radiothérapie (<b>en disponibilité 1 an à compter de janvier 2014</b>)</li><li>5. BRIDOUX Frank, néphrologie</li><li>6. BURUCOA Christophe, bactériologie - virologie</li><li>7. CARRETIER Michel, chirurgie générale</li><li>8. CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire</li><li>9. CHRISTIAENS Luc, cardiologie</li><li>10. CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire</li><li>11. DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation</li><li>12. DEBIAIS Françoise, rhumatologie</li><li>13. DROUOT Xavier, physiologie</li><li>14. DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie</li><li>15. EUGENE Michel, physiologie (<b>surnombre jusqu'en 08/2016</b>)</li><li>16. FAURE Jean-Pierre, anatomie</li><li>17. FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique</li><li>18. GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologie</li><li>19. GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie</li><li>20. GILBERT Brigitte, génétique</li><li>21. GOMBERT Jean-Marc, immunologie</li><li>22. GOJJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques</li><li>23. GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion</li><li>24. GUILLET Gérard, dermatologie</li><li>25. GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale</li><li>26. HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques</li><li>27. HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire</li><li>28. HERPIN Daniel, cardiologie</li><li>29. HOUETO Jean-Luc, neurologie</li><li>30. INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale</li><li>31. IRANI Jacques, urologie</li><li>32. JABER Mohamed, cytologie et histologie</li><li>33. JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes</li><li>34. JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire</li><li>35. KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie</li><li>36. KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (<b>en détachement 2 ans à compter de janvier 2014</b>)</li><li>37. KITZIS Alain, biologie cellulaire</li><li>38. KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale</li><li>39. LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire</li><li>40. LEVARD Guillaume, chirurgie infantile</li><li>41. LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie</li><li>42. LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques</li><li>43. MACCHI Laurent, hématologie</li><li>44. MARECHAUD Richard, médecine interne</li><li>45. MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire</li><li>46. MEURICE Jean-Claude, pneumologie</li><li>47. MIGEOT Virginie, santé publique</li><li>48. MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique</li><li>49. MIMOZ Olivier, anesthésiologie - réanimation</li><li>50. MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie</li><li>51. NEAU Jean-Philippe, neurologie</li><li>52. ORIOT Denis, pédiatrie</li><li>53. PACCALIN Marc, gériatrie</li><li>54. PAQUEREAU Joël, physiologie</li></ol> | <ol style="list-style-type: none"><li>55. PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique</li><li>56. PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire</li><li>57. PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique</li><li>58. POURRAT Olivier, médecine interne</li><li>59. PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologie</li><li>60. RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire</li><li>61. RICHER Jean-Pierre, anatomie</li><li>62. RIGAUD Philippe, neurochirurgie</li><li>63. ROBERT René, réanimation</li><li>64. ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales</li><li>65. ROBLOT Pascal, médecine interne</li><li>66. RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie</li><li>67. SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (<b>surnombre jusqu'en 08/2017</b>)</li><li>68. SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie</li><li>69. SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie</li><li>70. TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale</li><li>71. TOUCHARD Guy, néphrologie</li><li>72. TOURANI Jean-Marc, cancérologie</li><li>73. WAGER Michel, neurochirurgie</li></ol> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers**

1. ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
2. ARIES Jacques, anesthésiologie - réanimation
3. BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie - virologie
4. BEN-BRIK Eric, médecine du travail
5. BILAN Frédéric, génétique
6. BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
7. CASTEL Olivier, bactériologie - virologie - hygiène
8. CATEAU Estelle, parasitologie et mycologie
9. CREMNITER Julie, bactériologie - virologie
10. DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie - réanimation
11. DIAZ Véronique, physiologie
12. FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
13. FRASCA Denis, anesthésiologie - réanimation
14. HURET Jean-Loup, génétique
15. LAFAY Claire, pharmacologie clinique
16. SAPANET Michel, médecine légale
17. SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
18. THILLE Arnaud, réanimation
19. TOUGERON David, hépato-gastro-entérologie

**Professeur des universités de médecine générale**

GOMES DA CUNHA José

**Professeurs associés de médecine générale**

BINDER Philippe  
VALETTE Thierry

**Maîtres de Conférences associés de médecine générale**

BIRAULT François  
BOUSSAGEON Rémy  
FRECHE Bernard  
GIRARDEAU Stéphane  
GRANDCOLIN Stéphanie  
PARTHENAY Pascal  
VICTOR-CHAPLET Valérie

**Enseignants d'Anglais**

DEBAIL Didier, professeur certifié  
PERKINS Marguerite, maître de langue étrangère

**Professeurs émérites**

1. DORE Bertrand, urologie (08/2016)
2. FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie – virologie (08/2015)
3. GIL Roger, neurologie (08/2017)
4. MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (08/2016)
5. MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
6. MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)

**Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires**

1. ALCALAY Michel, rhumatologie
2. BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
3. BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
4. BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
5. BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
6. BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
7. BEGON François, biophysique, Médecine nucléaire
8. BOINOT Catherine, hématologie - transfusion
9. BONToux Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
10. BURIN Pierre, histologie
11. CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
12. CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
13. CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
14. CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
15. DABAN Alain, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)
16. DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
17. DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
18. DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
19. FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
20. GOMBERT Jacques, biochimie
21. GRIGNON Bernadette, bactériologie
22. GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
23. JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
24. KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
25. KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
26. LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
27. LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
28. MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
29. MARILLAUD Albert, physiologie
30. MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
31. POINTREAU Philippe, biochimie
32. REISS Daniel, biochimie
33. RIDEAU Yves, anatomie
34. SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
35. TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
36. TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
37. VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

# REMERCIEMENTS

**Au Président du jury,**

**Monsieur le Professeur François Seguin,**

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

**Au directeur de thèse,**

**Monsieur le Professeur Laurent Macchi,**

Je vous remercie de m'avoir accompagné au cours de ce travail. Merci également pour votre confiance et vos encouragements, et ce dès mon premier semestre en hématologie. Votre enseignement de l'hémostase m'a permis d'apprécier et de choisir cette discipline passionnante comme spécialité.

**A Monsieur le Professeur Thierry Hauet,**

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Vous m'accueillez également dans votre laboratoire où je réalise ma thèse d'université. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

**A Monsieur le Professeur Fabrice Prunier,**

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci également de m'avoir accueillie dans votre laboratoire depuis le début de ce travail et d'avoir contribué à mon choix de poursuivre une activité de recherche en parallèle de mon internat.

**A Monsieur le Professeur Christophe Jayle,**

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Veuillez trouver ici le témoignage de ma vive reconnaissance.

**A mes parents,**

Pour votre soutien sans faille et pouvoir avoir contribué à me faire aimer la pharmacie  
puis la biologie médicale

**A mon frère et ma sœur, Vincent et Hélène,**

Pour avoir suivi mon parcours pendant toutes ces années

**A mes grands-parents maternels et paternels, ainsi qu'au reste de ma famille,**

Pour votre présence et votre bienveillance

**A mes amies de pharmacie, Mathilde, Emilande, Florence et Clémentine,**

Pour cette belle amitié qui dure depuis dix ans, des bancs de la fac en première année  
jusqu'aux quatre coins du monde aujourd'hui

**Aux angevins des premiers jours, Louise-Marie, Julien et Arnaud,**

Pour tous les bons souvenirs des moments passés ensemble au cours de cet internat et  
pour votre confiance en moi

**Et à ceux rencontrés un peu plus tard,**

**Elise et Maïlys**, pour les litres de thé bus ensemble

**Arthur**, pour la bande-son

**Aux membres de l'EA 3860 à Angers,**

**Sophie**, pour ton aide précieuse tout au long de ce travail

**Laura, Pierre et Hussein**, pour les pauses café et le soutien technique avec les rats récalcitrants

# LISTE DES ABREVIATIONS

AAR : aire à risque

AN : aire de nécrose

ASIS : activated site inhibited factor VIIa

ATP : adenosine triphosphate

CK-MB : fraction MB de la créatine kinase

DAMP : danger-associated molecular pattern

ECG : électrocardiogramme

EPCR : endothelial protein c receptor

ERK 1/2 : extracellular signal regulated kinases 1/2

FDX : fondaparinux

FT : facteur tissulaire

GSK-3 $\beta$  : glycogène synthase kinase-3 beta

HAS : haute autorité de santé

HBPM : héparine de bas poids moléculaire

HE : hématoxyline-éosine

HMGB1 : high-mobility group box 1

HNF : héparine non fractionnée

HSP : heat shock protein

ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1

IL-1 : interleukine 1

IL-6 : interleukine 6

IL-8 : interleukine 8

IL-33 : interleukine 33

IP-10 : interferon-gamma inducible protein

IR : ischémie-reperfusion

JAK : Janus Kinase

JNK : c-Jun N-terminal kinases

MAPK : mitogen-activated protein kinases

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1

MEK 1/2 : mitogen-activated protein kinase kinase 1/2

mPTP : mitochondrial permeability transition pore

NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B  
NSTEMI : non ST-segment elevation myocardial infarction  
PAF : platelet activating factor  
PAR : protease activated receptor  
PBS : phosphate buffered saline  
PCa : protéine C activée  
PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase  
PKC- $\epsilon$  : protein kinase C epsilon  
RISK : reperfusion injury salvage kinase  
ROS : reactive oxygen species  
SAFE : survivor activating enhancement factor  
SCA : syndrome coronarien aigu  
SDF-1 : stroma-cell derived factor 1  
STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3  
STEMI : ST-segment elevation myocardial infarction  
TFPI : tissue factor pathway inhibitor  
TM : thrombomoduline  
TLR : Toll-like récepteur  
TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha  
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1

# TABLE DES MATIERES

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                                                                  | <b>11</b> |
| <b>GENERALITES.....</b>                                                                                    | <b>12</b> |
| I- L'infarctus du myocarde.....                                                                            | 12        |
| 1. Définition.....                                                                                         | 12        |
| 2. Physiopathologie .....                                                                                  | 13        |
| 3. Epidémiologie .....                                                                                     | 16        |
| 4. Diagnostic.....                                                                                         | 17        |
| 5. Prise en charge.....                                                                                    | 18        |
| II- Les lésions de reperfusion myocardique .....                                                           | 20        |
| 1. Mécanismes impliqués .....                                                                              | 21        |
| 2. Stratégies de cardioprotection.....                                                                     | 29        |
| III- Anticoagulants et ischémie-reperfusion .....                                                          | 33        |
| 1. L'antithrombine.....                                                                                    | 33        |
| 2. La protéine C activée.....                                                                              | 34        |
| 3. Le TFPI.....                                                                                            | 35        |
| 4. Les inhibiteurs de la thrombine .....                                                                   | 35        |
| 5. Les inhibiteurs du complexe FT/facteur VIIa.....                                                        | 37        |
| 6. Les inhibiteurs du facteur Xa.....                                                                      | 37        |
| 7. Perspectives cliniques .....                                                                            | 39        |
| <b>OBJECTIFS .....</b>                                                                                     | <b>41</b> |
| <b>MATERIEL ET METHODES.....</b>                                                                           | <b>42</b> |
| I- Modèle expérimental .....                                                                               | 42        |
| II- Protocole expérimental .....                                                                           | 42        |
| 1. Projet 1 : Etude de l'effet du fondaparinux sur l'inflammation et l'endothélium .....                   | 42        |
| 2. Projet 2 : Etude du rôle de l'immunité innée dans la cardioprotection induite par le fondaparinux ..... | 43        |
| III- Prélèvements.....                                                                                     | 44        |
| IV- Extraction d'ARN.....                                                                                  | 45        |

|                                                                     |                                                                                                        |           |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| V-                                                                  | Reverse transcription.....                                                                             | 45        |
| VI-                                                                 | PCR quantitatives en temps réel .....                                                                  | 46        |
| VII-                                                                | Extraction et dosage des protéines .....                                                               | 47        |
| VIII-                                                               | Western Blot.....                                                                                      | 47        |
| IX-                                                                 | Histochimie : coloration à l'hématoxyline-éosine (HE).....                                             | 48        |
| X-                                                                  | Analyse statistique.....                                                                               | 49        |
| <b>RESULTATS .....</b>                                              |                                                                                                        | <b>50</b> |
| I-                                                                  | Projet 1 : Etude de l'effet du fondaparinux sur l'inflammation et l'endothélium ...                    | 50        |
| 1.                                                                  | Effets du fondaparinux sur l'inflammation et sur l'expression du facteur tissulaire et d'ICAM-1 .....  | 50        |
| 2.                                                                  | Analyse histologique .....                                                                             | 52        |
| 3.                                                                  | Effet du fondaparinux sur l'endothélium .....                                                          | 53        |
| II-                                                                 | Projet 2 : Etude du rôle de l'immunité innée dans la cardioprotection induite par le fondaparinux..... | 54        |
| 1.                                                                  | Etude de l'expression des voies de survie cellulaire RISK et SAFE à 30 minutes de reperfusion .....    | 54        |
| 2.                                                                  | Evaluation de la taille d'infarctus à deux heures de reperfusion.....                                  | 56        |
| <b>DISCUSSION.....</b>                                              |                                                                                                        | <b>57</b> |
| <b>PERSPECTIVES .....</b>                                           |                                                                                                        | <b>60</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>                            |                                                                                                        | <b>62</b> |
| <b>ANNEXE 1 : Tableau récapitulatif – Anticoagulants et IR.....</b> |                                                                                                        | <b>72</b> |
| <b>LISTE DES FIGURES .....</b>                                      |                                                                                                        | <b>73</b> |
| <b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>                                      |                                                                                                        | <b>74</b> |
| <b>RESUME.....</b>                                                  |                                                                                                        | <b>75</b> |
| <b>SERMENT DE GALIEN .....</b>                                      |                                                                                                        | <b>76</b> |

# INTRODUCTION

L'infarctus du myocarde est une des premières causes de décès dans le monde (1). L'ischémie myocardique est due à la rupture d'une plaque d'athérosclérose au niveau d'une artère coronaire ce qui entraîne la formation d'un thrombus. Une reperfusion immédiate du myocarde est bénéfique pour limiter la taille de l'infarctus et ainsi augmenter la survie (2). Paradoxalement, elle entraîne aussi la formation de lésions de reperfusion particulièrement délétères, pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire des cardiomyocytes (3).

Les stratégies de cardioprotection visent à limiter l'importance de ces lésions et représentent un véritable enjeu de santé publique. Une des stratégies thérapeutiques envisagée pour protéger le cœur au cours de la reperfusion est l'utilisation de certains anticoagulants. L'activation de la coagulation joue en effet un rôle important au cours de l'IR et semble être une cible pertinente pour limiter la formation des lésions de reperfusion.

# GENERALITES

## I- L'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde fait partie des cardiopathies ischémiques qui correspondent à l'ensemble des troubles engendrés par l'insuffisance des apports en oxygène au muscle cardiaque. Les cardiopathies ischémiques sont dues au développement et aux complications de l'athérosclérose au niveau d'une ou plusieurs artères coronaires. Elles représentent la première cause de décès dans le monde (1). En 2008, elles ont été à l'origine de 17 millions de décès parmi les 57 millions de décès mondiaux (4). Ces pathologies représentent donc un enjeu majeur de santé publique au niveau international. Elles regroupent différentes présentations cliniques allant de l'angor stable aux syndromes coronariens aigus (SCA). Lorsque l'occlusion des artères coronaires concernées aboutit à la nécrose d'une partie du tissu myocardique, on parle d'infarctus du myocarde. Bien que des progrès considérables aient été effectués dans la prise en charge de cette maladie, avec notamment la mise en évidence du rôle central d'une reperfusion rapide, l'infarctus du myocarde reste une cause majeure de morbi-mortalité avec un retentissement socio-économique important.

### 1. Définition

La définition la plus récente de l'infarctus du myocarde par l'*European Society of Cardiology*, l'*American College of Cardiology* et l'*American Heart Association* date de 2012 (5). Elle précise que le terme infarctus du myocarde ne doit être utilisé que s'il existe des preuves de nécrose myocardique dans un contexte clinique d'ischémie myocardique aiguë. On considérera donc comme un infarctus tout SCA associé à l'élévation des taux sériques des troponines I ou T ou de la fraction MB de la créatine kinase (CK-MB). Selon l'électrocardiogramme (ECG) initial, on distingue les infarctus du myocarde avec élévation persistante du segment ST, également appelés *ST-segment elevation myocardial infarction* (STEMI), des infarctus du myocarde sans élévation persistante du segment ST ou *non ST-segment elevation myocardial infarction* (NSTEMI).

## 2. Physiopathologie

L'infarctus du myocarde correspond à une occlusion coronaire aiguë responsable d'une ischémie puis d'une nécrose. La formation du thrombus à l'origine de cette occlusion est le plus souvent liée à l'existence d'une plaque d'athérome devenue instable. L'événement déclencheur est en général la fissuration ou la rupture de cette plaque d'athérome.

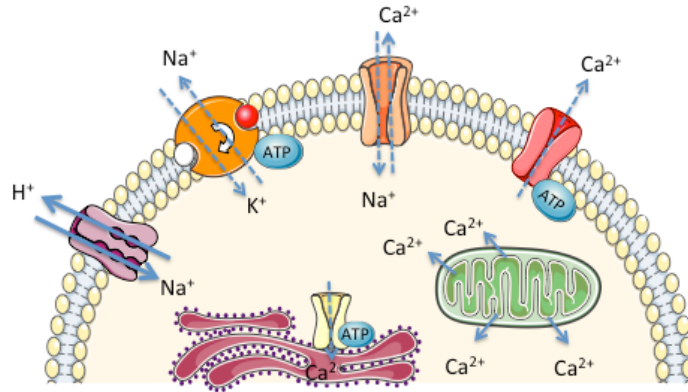
### ***L'athérosclérose***

L'athérosclérose est une pathologie évolutive ce qui a conduit à classer les lésions athéroscléreuses en six stades (6) (7). Les lésions de type I, II et III constituent les lésions dites précoces et sont asymptomatiques. Elles sont composées de cellules spumeuses macrophagiques pouvant s'accumuler dans la monocouche de cellules endothéliales formant l'intima des artères coronaires. Ces cellules chargées en lipides sont associées, selon le stade évolutif, à des cellules musculaires lisses et des cellules inflammatoires telles que les lymphocytes T. Les lésions de type IV, V et VI sont des lésions dites évoluées. A ces stades, il existe une réduction de la lumière artérielle du fait de l'épaississement intimal. Le stade V correspond à la lésion typique d'athérosclérose telle qu'elle est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé. Dans ces lésions, la plaque d'athérome est constituée d'un centre lipidique très riche en macrophages spumeux, et d'une chape fibreuse constituée de cellules musculaires lisses et de collagène. Une plaque est dite « non compliquée » lorsque son revêtement endothélial est continu. En revanche, lorsque la plaque perd une partie de son revêtement endothélial, elle devient à haut risque thrombotique. En effet, l'endothélium sain est thromborésistant du fait de la présence à sa surface de molécules inhibant l'activation plaquettaire telles que le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline ainsi que de molécules inhibitrices de la coagulation comme la thrombomoduline, les glycosaminoglycanes et le *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) (8). La rupture de l'intégrité endothéliale expose les constituants sous-endothéliaux tels que le collagène et la fibronectine aux plaquettes circulantes, déclenchant la formation d'un thrombus plaquettaire. Cette situation concerne particulièrement les plaques de stade VI qui regroupe les plaques dites « compliquées », présentant un risque de rupture. Différents facteurs modulent cette tendance à la rupture. Les plaques les plus à risque de rupture

sont celles qui possèdent un noyau lipidique de taille importante et dont la paroi artérielle est infiltrée de façon majeure par des cellules inflammatoires (9). De plus, le risque de rupture augmente lorsque la chape fibreuse s'amincit (10). De façon plus surprenante, le risque de rupture est plus important pour les plaques faiblement sténosantes que pour les plaques associées à des sténoses serrées, et ce du fait de forces de tension plus importantes subies par la plaques faiblement sténosantes (9). Une fois la plaque rompue, le sang circulant entre en contact avec le sous-endothélium et le contenu lipidique de la plaque hautement thrombogène, déclenchant la formation d'un thrombus plaquettaire qui sera ensuite renforcé par la constitution d'un réseau de fibrine.

### ***L'ischémie myocardique***

L'occlusion de la coronaire qui fait suite à la rupture d'une plaque d'athérosclérose entraîne un déficit de perfusion sanguine et donc un déséquilibre entre les besoins et les apports en oxygène et en nutriments du myocarde. Il s'agit de l'ischémie myocardique. Ce phénomène est réversible. Au cours de la phase d'ischémie, le myocarde subit des perturbations de son métabolisme cellulaire. Dans les conditions physiologiques, le métabolisme du myocarde est aérobie. L'ATP nécessaire pour assurer la fonction contractile est alors obtenu principalement par l'oxydation des acides gras libres. Lors de la phase d'ischémie, la glycolyse anaérobie s'accélère et devient la voie métabolique principale au niveau myocardique. Rapidement, la production d'ATP devient insuffisante et une acidose apparaît du fait des lactates et des protons générés par la glycolyse anaérobie (11). Le fonctionnement des pompes ioniques est perturbé par cette acidose et par la déplétion en ATP ce qui entraîne une accumulation de sodium et de calcium au niveau intracellulaire (Figure 1). L'excès de sodium et de calcium est responsable d'un œdème cellulaire d'une activation des systèmes protéolytiques lysosomiaux. La fonction contractile des cardiomyocytes en est très altérée. La membrane cellulaire des cardiomyocytes devient perméable, laissant passer des macromolécules et des enzymes cardiaques au niveau extracellulaire (12).



**Figure 1: Echanges ioniques lors de l'ischémie myocardique. Adapté d'après (11)**

L'acidose créée par l'ischémie entraîne l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pour faire sortir des cellules les ions  $\text{H}^+$  en excès. Ceci est à l'origine d'un excès d'ions  $\text{Na}^+$  ce qui ralentit le fonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Les différentes pompes et canaux ioniques dépendant de l'ATP sont également ralentis du fait de la déplétion en ATP ce qui majore l'excès de calcium dans les cellules.

### ***La nécrose myocardique***

Lorsque la phase d'ischémie dure plus de 30 minutes, la nécrose myocardique sous-endocardique de la zone ischémique débute. Elle est complète au bout de quatre heures. Les cardiomyocytes sont alors irréversiblement endommagés, contrairement à la phase d'ischémie. La perte d'intégrité de leur membrane cellulaire aboutit au relargage massif du contenu intra-cytoplasmique dont font partie les enzymes cardiaques. La nécrose se développe à partir du sous-endocarde, plus sensible à l'ischémie, vers le sous-épicaire (13). Lorsque la totalité de l'épaisseur du myocarde est nécrosée, il s'agit d'un infarctus transmural.

### 3. Epidémiologie

En raison de sa fréquence et de sa mortalité élevée, l'infarctus du myocarde tient une place importante parmi les maladies cardiovasculaires. En France, le registre *MONItoring of trends and determinants of Cardiovascular disease* (MONICA) recense 120 000 infarctus du myocarde par an. Il s'agit d'une pathologie avec un impact socio-économique important, puisqu'en en 2008, par exemple, 56 100 patients ont été hospitalisés en France pour ce motif (14). Ces quinze dernières années, l'amélioration du pronostic suite à un infarctus du myocarde a été considérable et est liée à la mise en place des stratégies de reperfusion précoce du myocarde. Ainsi, la mortalité à 30 jours des infarctus avec sus-décalage ST a diminué de 50% entre 1995 et 2005 en France (15). Cependant, les infarctus du myocarde restent des accidents graves avec une mortalité à un an d'environ 15% (15).

L'épidémiologie de l'infarctus du myocarde à l'échelle mondiale montre une variabilité géographique importante en terme de fréquence et de mortalité avec un gradient nord-sud très net (16). En France, la mortalité due aux infarctus du myocarde suit également ce gradient. La létalité d'un infarctus du myocarde à 28 jours chez les hommes de 35 à 64 ans est en effet plus importante à Lille qu'à Toulouse (16). Hormis le facteur géographique, d'autres facteurs influencent la fréquence de survenue d'un infarctus du myocarde ainsi que sa mortalité. L'incidence des infarctus du myocarde augmente avec l'âge quelque soit le sexe. Dans la tranche d'âge 35-64 ans, l'incidence de l'infarctus du myocarde est nettement inférieure chez la femme par rapport à l'homme malgré une mortalité plus élevée (16). La différence d'incidence entre les deux sexes s'égale environ cinq à dix ans après la ménopause. Les facteurs de risque cardiovasculaires qui conditionnent l'apparition de lésions athéroscléreuses et donc le risque d'infarctus du myocarde sont le tabagisme, l'hypercholestérolémie, le diabète, l'hypertension artérielle, les antécédents familiaux de maladies cardiovasculaires, la surcharge pondérale et la sédentarité.

## **4. Diagnostic**

Compte-tenu de la mortalité élevée de l'infarctus du myocarde, sa prise en charge doit être la plus rapide possible, d'où l'importance d'un diagnostic rapide. Le délai de prise en charge influence considérablement le pronostic du patient.

### ***Manifestations cliniques***

Typiquement, l'infarctus du myocarde se manifeste par une douleur thoracique à début brutal, de localisation rétrosternale, constrictive, d'intensité importante, pouvant irradier vers les membres supérieurs et la mâchoire, et résistante à la trinitrine. Cette douleur peut être associée à une dyspnée, à des troubles digestifs à type de nausées et vomissements, à une chute de la pression artérielle et à une tachycardie. La fièvre est fréquemment associée à ce tableau, le plus souvent modérée et retardée de 24 à 48 heures par rapport à douleur. Les présentations atypiques (douleurs épigastriques, troubles digestifs, dyspnée...) sont loin d'être inhabituelles (17). On les retrouve le plus souvent chez les personnes âgées, les femmes et les diabétiques. L'examen physique est en général normal mais peut montrer des signes d'insuffisance cardiaque ou d'instabilité hémodynamique.

### ***Perturbations de l'ECG***

Seul l'ECG, comportant les 12 dérivations classiques, permet d'obtenir un diagnostic de certitude. Pour cette raison, il doit être réalisé le plus rapidement possible, idéalement dans les dix minutes qui suivent le premier contact médical. Le signe le plus précoce est l'apparition de grandes ondes T pointues dans la première heure suivant l'infarctus du myocarde. A partir de la première heure, apparaît le signe le plus caractéristique, le sus-décalage du segment ST, ou onde de Pardee, englobant généralement l'onde T. Il correspond à la lésion sous-épicaudique initiale. Elle apparaît rapidement et dure plusieurs heures. L'onde Q de nécrose transmurale large est d'apparition plus tardive, entre la quatrième et la sixième heure. Entre la sixième et la douzième heure qui suit un infarctus du myocarde, classiquement on observe le sus-décalage ST associé à une onde Q.

## ***Marqueurs biochimiques de nécrose myocardique***

Le dosage de marqueurs biochimiques de nécrose myocardique confirme le diagnostic d'infarctus du myocarde notamment dans le cas des infarctus du myocarde avec manifestations cliniques atypiques ou bien dans le cas des NSTEMI. En cas de STEMI, le résultat des dosages biologiques ne doit pas être attendu pour débiter la reperfusion coronaire par angioplastie ou thrombolyse. Différents marqueurs biochimiques témoignent de la nécrose myocardique. La valeur atteinte au pic maximal reflète l'importance de la masse tissulaire nécrosée. Les trois principaux marqueurs utilisés en pratique courante sont la myoglobine, la CK-MB et la troponine. La myoglobine subit une élévation précoce dès la première heure post-infarctus, atteint son taux maximum entre la neuvième et la douzième heure, et se normalise après la seizième heure. L'isoforme CK-MB augmente à partir de la quatrième heure, est maximum au bout de 24 heures et se normalise à partir de 48 heures. Les troponines T et I sont des filaments protéiques régulateurs de la contraction musculaire au niveau des muscles squelettiques et du myocarde. Elles possèdent chacune une isoforme cardiaque (cTnT et cTnI). Elles s'élèvent deux à quatre heures après l'infarctus, atteignent leur maximum à la quatorzième heure et restent élevées pendant 75 à 140 heures pour la cTnI et jusqu'à dix jours pour la cTnT. Ce sont les marqueurs biologiques de référence dans l'infarctus du myocarde.

## **5. Prise en charge**

La prise en charge des infarctus du myocarde distingue les STEMI des NSTEMI (Figure 2). Dans le cas des STEMI, la reperfusion myocardique est urgente. Il a été démontré qu'un délai raccourci avant reperfusion augmentait la survie des patients concernés (2). Une restauration complète du flux artériel peut être obtenue soit par des moyens pharmacologiques (fibrinolyse) soit par des moyens mécaniques (angioplastie coronaire). La fibrinolyse présente de nombreuses contre-indications et un risque élevé de saignements. De plus, elle présente une efficacité moindre par rapport à l'angioplastie coronaire avec un taux de succès de recanalisation de l'artère obstruée d'environ 60% contre 90% pour l'angioplastie coronaire (18). Elle reste plus facile à mettre en œuvre que l'angioplastie car réalisable en tous lieux. Son efficacité est optimale dans les trois heures qui suivent le début des symptômes. La Haute Autorité de Santé (HAS)

recommande l'utilisation de la ténectéplase en bolus intra veineux unique de 10 secondes. L'angioplastie est dite primaire lorsqu'elle est réalisée sans administration préalable d'un traitement fibrinolytique. Des méta analyses ont montré sa plus grande efficacité et un meilleur devenir clinique des patients bénéficiant d'une angioplastie coronaire comparée à la fibrinolyse (19). Les délais de prise en charge doivent être raccourcis au maximum afin de garantir une efficacité optimale de cette stratégie. Un algorithme proposé par l'HAS définit les modalités de choix entre les deux stratégies, en fonction du délai de prise en charge (Figure 2 et Figure 3).

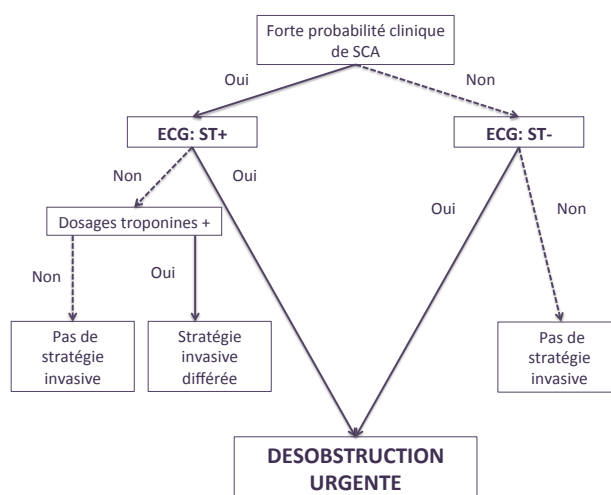
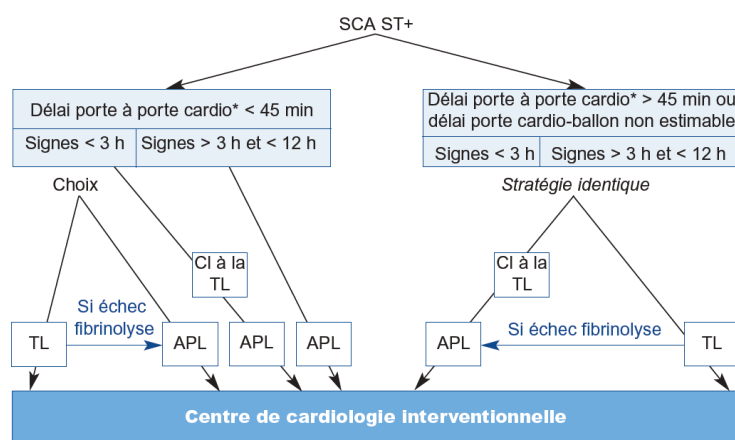


Figure 2: Prise en charge des SCA (adapté de l'HAS)



\* Le délai porte à porte cardio doit s'intégrer dans le délai global de prise en charge qui ne doit pas être supérieur à 90 minutes.  
TL : thrombolyse APL : angioplastie CI : contre-indication.

Figure 3: Prise en charge des SCA ST+ ou STEMI (HAS)

## II- Les lésions de reperfusion myocardique

Bien qu'indispensable dans la prise en charge de l'infarctus du myocarde, comme souligné précédemment, la reperfusion est elle-même à l'origine de lésions délétères, appelées lésions de reperfusion. Ce phénomène, pour le moins paradoxal, a été décrit pour la première fois en 1960 chez le chien (20). Ces lésions concernent des cardiomyocytes affectés de manière réversible par la phase d'ischémie. La restauration du flux sanguin entraîne la mort de ces cellules alors qu'à elle seule l'ischémie ne les avait pas détruites, majorant ainsi la taille finale d'infarctus. Cette notion a longtemps fait débat, il est en effet impossible de mettre en évidence quelles lésions sont dues à l'ischémie initiale et quelles lésions sont provoquées par la reperfusion. La seule preuve de l'existence des lésions de reperfusion est la diminution de la taille finale d'infarctus qu'on obtient lorsqu'on agit sur les conditions de reperfusion (3) (Figure 4). On parle alors de cardioprotection. La diminution de la taille d'infarctus atteinte grâce à ces stratégies de cardioprotection peut aller jusqu'à 50%, prouvant bien la contribution importante des lésions de reperfusion dans la taille finale d'infarctus (21).

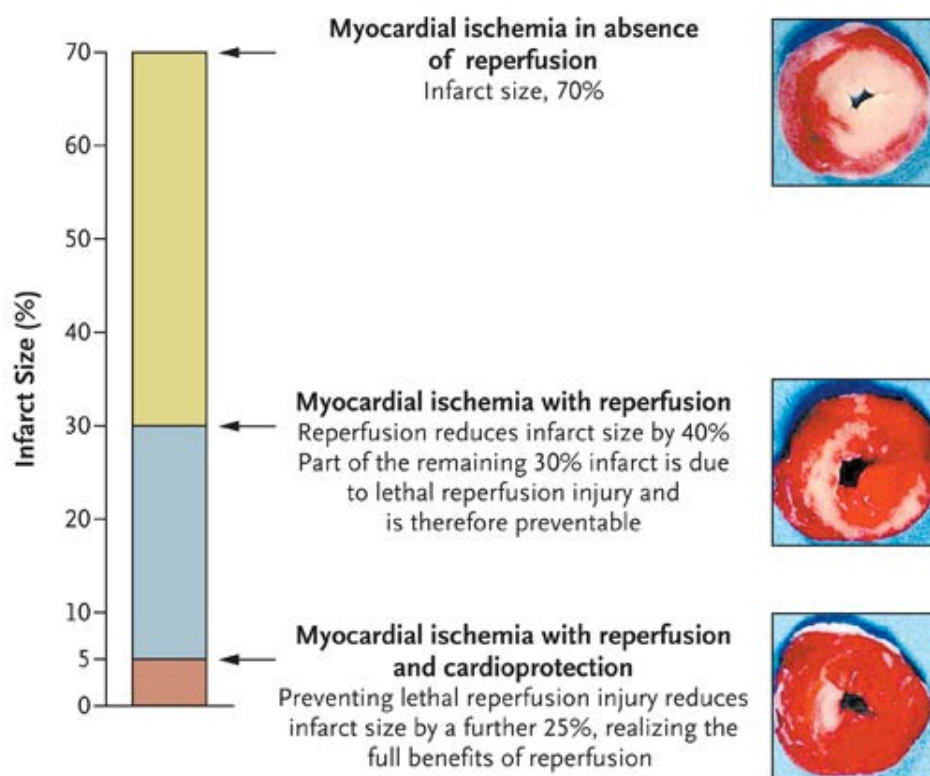


Figure 4: Impact de la reperfusion sur la diminution de la taille d'infarctus (21)

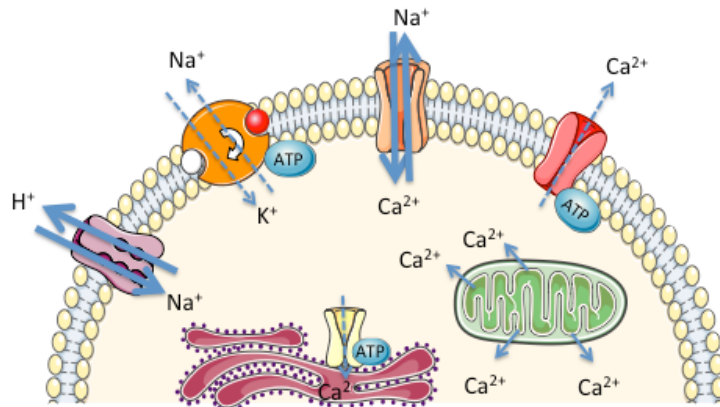
Au delà de la situation particulière de l'infarctus du myocarde, les lésions de reperfusion sont susceptibles de se former au cours de toutes les situations où un organe subit l'arrêt puis la reprise de sa circulation artério-veineuse, notamment au cours des accidents vasculaires cérébraux ou bien lors des transplantations d'organes.

## **1. Mécanismes impliqués**

La reperfusion permet un apport rapide en oxygène ainsi qu'en substrats nécessaires à la production d'ATP tels que le glucose ou les acides gras. De plus, elle permet la normalisation du pH extracellulaire. Bien que ces éléments soient indispensables pour restaurer l'homéostasie cellulaire, ils sont également à l'origine des lésions de reperfusion. Les mécanismes impliqués sont multiples et intriqués. La mitochondrie joue un rôle essentiel dans la formation de ces lésions, notamment via la pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). Le rôle de l'inflammation et l'immunité innée semble également majeur.

### ***Rôle du calcium***

La reperfusion majore la surcharge calcique déjà créée au cours de l'ischémie. La normalisation du pH extracellulaire accentue le gradient de pH entre milieux intra et extracellulaires, ce qui accélère le fonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Figure 5). L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  fonctionne alors en mode inversé afin de contrebalancer l'excès de sodium. L'accumulation de calcium qui en découle est à l'origine de l'hypercontracture des cardiomyocytes et de l'ouverture du mPTP (22). Les lésions du sarcolemme et l'altération du fonctionnement du réticulum sarcoplasmique due au stress oxydatif sont également responsables de l'augmentation du calcium intracellulaire (3).



**Figure 5: Echanges ioniques lors de la reperfusion myocardique. Adapté d'après (11)**

Le rétablissement du pH physiologique extracellulaire accélère le fonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  adopte un fonctionnement inversé afin d'éliminer l'excès d'ions  $\text{Na}^+$  ce qui entraîne un excès massif d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Rôle du pH intracellulaire**

L'acidose engendrée par l'ischémie maintient le mPTP fermé et atténue l'hypercontracture des cardiomyocytes (23). C'est ce qu'on appelle le paradoxe du pH. La correction du pH intracellulaire supprime ces effets protecteurs. Il a d'ailleurs été démontré *in vitro* sur des cardiomyocytes de rat que l'utilisation d'un soluté à pH acide pendant la phase de ré-oxygénation était cardioprotecteur (24).

### **Rôle du mPTP**

Le rôle du mPTP dans la formation des lésions de reperfusion myocardique a été mis en évidence pour la première fois en 1995 (25). Il s'agit d'un canal non sélectif situé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Il s'ouvre dès les premières minutes de la reperfusion en réponse à la surcharge calcique au niveau mitochondrial, au stress oxydatif et au rétablissement du pH physiologique (25). Son ouverture entraîne le gonflement de la mitochondrie et perturbe le potentiel de membrane mitochondrial, à l'origine du découplage de la phosphorylation oxydative puis de la rupture des membranes mitochondriales (26). Le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme active les voies de signalisation pro-apoptotique et la déplétion en ATP entraîne la mort des cardiomyocytes par nécrose (27).

### ***Rôle du stress oxydatif***

La reperfusion génère la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) (28). Le principal ROS produit au cours de la reperfusion est l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ). Tous les autres ROS sont produits à partir de  $O_2^-$  ( $H_2O_2$ ,  $HOO^\bullet$ ,  $^\bullet OH$ ,  $ONOO^-$ ,  $ONOOH$ ). Les principales sources de ROS sont la xanthine oxydase endothéliale et la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles. Le stress oxydatif est lui-même responsable de l'ouverture du mPTP. Il contribue à la dysfonction du réticulum sarcoplasmique et à la surcharge en calcium. Il exerce un effet néfaste sur les membranes cellulaires via la peroxydation lipidique, peut dénaturer les enzymes cellulaires et créer des lésions oxydatives sur l'ADN. Il réduit également la biodisponibilité du NO, molécule possédant des effets cardioprotecteurs par l'inhibition de l'accumulation de polynucléaires neutrophiles et l'amélioration du flux sanguin coronaire (29).

### ***Rôle de l'immunité innée***

Au cours de l'IR, l'immunité innée est activée par des signaux de danger endogènes, appelés *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) ou encore alarmines. La caractéristique principale de ces DAMPs est que ce sont des molécules initialement intracellulaires qui sont relarguées du fait de l'agression causée par l'ischémie. Parmi les DAMPs connus comme étant associés aux lésions de reperfusion myocardique, on retrouve les *heat shock proteins* (HSPs), notamment les HSP27 (30) et HSP72 (31), et la *high-mobility group box 1 protein* (HMGB1) (32). Les DAMPs sont reconnus par les *Toll-like receptors* (TLRs), de localisation ubiquitaire. Les TLRs les plus présents au niveau myocardique sont le TLR-4 et le TLR-2, par ordre d'importance (33). Leur activation par les DAMPs libérés suite à l'ischémie aboutit à une réaction de type inflammatoire par translocation de NF- $\kappa$ B du cytoplasme vers le noyau avec synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion cellulaire (Figure 6). De la même manière que les TLRs, le complément peut être activé par les DAMPs (34) ce qui contribue à l'inflammation et au chimiotactisme. La fraction C5a du complément notamment est capable de stimuler l'adhésion des polynucléaires neutrophiles et la production d'anion superoxyde (35).

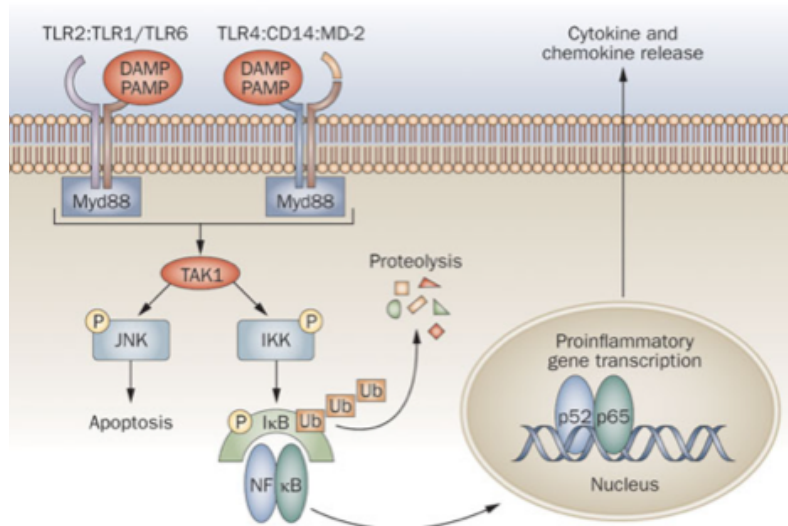


Figure 6: Signalisation cellulaire induite par l'activation des TLRs (36)

Tous les DAMPs n'ont pas un effet néfaste dans les situations d'ischémie-reperfusion (IR). En effet, l'IL-33, molécule appartenant à la famille de l'IL-1, a été décrite à la fois comme une cytokine et comme une alarmine et posséderait des effets cardioprotecteurs (37) (38) et hépatoprotecteurs (39). Une fois fixée à son récepteur ST2 elle serait capable d'activer des voies de signalisation anti-inflammatoires et antiapoptotiques (40). Elle serait également capable d'activer un facteur de transcription appelé *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) (41). HMGB1 citée précédemment posséderait aussi des effets contradictoires dans les situations d'IR. Un prétraitement par cette molécule chez des souris soumises à une séquence d'IR myocardique aurait un effet délétère en augmentant la taille finale de l'infarctus (42). Cependant, d'autres études ont démontré qu'un traitement local par HMGB1 permettrait d'atténuer les conséquences d'un infarctus du myocarde concernant le remodelage ventriculaire, suggérant un effet bénéfique de cette molécule (43) (44).

### ***Rôle de l'inflammation***

La réponse inflammatoire suite à un infarctus du myocarde est indispensable car elle permet la réparation du tissu myocardique et sa cicatrisation. Cependant, elle contribue également aux effets néfastes de la reperfusion. Il s'agit d'une inflammation dite « stérile » comme décrit précédemment mais elle met en jeu le même type de

mécanismes que l'inflammation septique. Au cours des six premières heures de reperfusion, le relargage de chimiokines par les cellules endothéliales lésées et les cardiomyocytes active et recrute des leucocytes au niveau de la zone reperfusée. Les principales chimiokines impliquées dans l'IR sont l'interleukine-8 (IL-8), l'*interferon-gamma inducible protein* (IP-10), le *stroma-cell derived factor 1* (SDF-1) et le *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) (45). D'autres molécules aux propriétés chimioattractives telles que l'interleukine-6 (IL-6), la fraction C5a du complément et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) participent au recrutement leucocytaire. Ceci entraîne une dysfonction endothéliale due à la production de ROS, de protéases et de cytokines pro-inflammatoires. L'expression de molécules d'adhésion cellulaire au niveau des cellules endothéliales favorise le recrutement des leucocytes et des plaquettes. L'afflux de polynucléaires neutrophiles au cours de la reperfusion participe au phénomène de *no-reflow* qui correspond au ralentissement du flux sanguin coronaire sans mise en évidence d'une obstruction vasculaire mécanique (46). Une fois au niveau tissulaire, les polynucléaires neutrophiles sont capables de libérer une grande variété d'enzymes protéolytiques comme les hydrolases acides, l'élastase et les métalloprotéinases. Leur cible principale est la matrice extracellulaire. Les polynucléaires neutrophiles sont également une source importante de ROS. L'IR est également connue pour favoriser la perte du glycocalyx protecteur de l'endothélium (47). Le glycocalyx est composé de glycoprotéines, protéoglycanes et glycosaminoglycanes, formant un réseau chargé négativement à la surface de l'endothélium (48). Ses constituants majoritaires sont le syndecan-1 et l'héparane-sulfate. Son relargage au cours de l'IR entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, contribuant à l'infiltration leucocytaire.

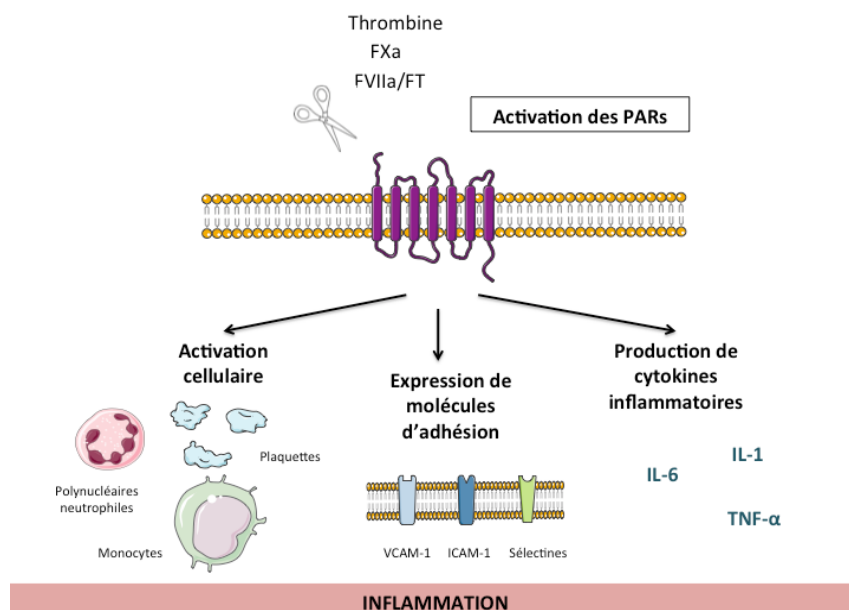
### ***Rôle de la coagulation***

La reperfusion entraîne un afflux de monocytes dans la zone ischémisée, portant à leur surface du facteur tissulaire, capable de déclencher l'activation de la cascade de la coagulation (49). Le facteur tissulaire est également fortement exprimé au niveau des cardiomyocytes (50), notamment au niveau du ventricule gauche (51). Il a été démontré que l'expression du facteur tissulaire au niveau du myocarde était augmentée suite à une séquence d'IR chez le lapin (52). Selon cette même étude, il s'agirait du facteur tissulaire présent au niveau des cardiomyocytes qui serait à l'origine des lésions de

reperfusion, plus que le facteur tissulaire monocyttaire. L'activation de la cascade de la coagulation est déclenchée par la présence de facteur tissulaire qui forme un complexe avec le facteur VII activé, et aboutit à la formation de thrombine puis du caillot de fibrine (53). La formation de microthrombi qui en résulte diminue l'efficacité de la reperfusion et contribue au phénomène de *no-reflow*, entraînant une ischémie secondaire.

De plus, l'activation de la coagulation contribue également à renforcer la réaction inflammatoire de l'IR. En effet, la thrombine et les autres protéases impliquées dans la cascade de coagulation ont un rôle pro-inflammatoire par l'intermédiaire des récepteurs activés par les protéases (Protease Activated Receptors ou PARs) (54). Les PARs sont des récepteurs couplés aux protéines G présents à la surface des cellules endothéliales, des cardiomyocytes et des cellules musculaires lisses. Il en existe 4 types (PAR-1 à PAR-4). Le clivage de l'extrémité N-terminale de ces récepteurs par des protéases entraîne leur activation. Parmi les protéases capables d'activer les PARs, on retrouve certaines sérines protéases de la coagulation. La thrombine est capable d'activer les PAR-1, -3 et -4 mais pas le PAR-2. Les PAR-1 et 2 peuvent être activés par le facteur Xa et par le complexe formé par le facteur VIIa et le FT. L'activation de ces récepteurs entraîne l'activation de polynucléaires neutrophiles, monocytes et plaquettes, l'expression de molécules d'adhésion cellulaire et la production de cytokines inflammatoires (55) (Figure 7), ce qui majore la réaction inflammatoire occasionnée par l'IR. En terme de signalisation cellulaire, les PARs peuvent être couplés à différentes protéines G dont les sous-types  $G_i$ ,  $G_q$  et  $G_{12/13}$  (56). Les voies de signalisation impactées par leur activation sont donc nombreuses et incluent notamment les MAP kinases, la phospholipase  $C\beta$  et les  $PI_3$  kinases.

Au niveau myocardique, on retrouve les récepteurs PAR-1, -2 et -4 dans différents types cellulaires (57). PAR-1 est exprimé par les cardiomyocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales. L'expression de PAR-2 concerne les mêmes types cellulaires myocardiques, excepté les fibroblastes pour lesquels l'expression de ce récepteur est encore incertaine. PAR-4 serait exprimé par les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses vasculaires mais pas les cellules endothéliales. La source majoritaire de ce récepteur reste les plaquettes.



**Figure 7: Activation des PARs par les sérines protéases de la coagulation**

Parmi les molécules d'adhésion dont l'expression est stimulée par l'activation des PARs, on retrouve *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) et les sélectines. Parmi les cytokines inflammatoires, on retrouve l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6) et le *tumor necrosis factor alpha* (TNF-α)

Le rôle des PARs dans la formation des lésions de reperfusion est confirmé par l'effet de leur inhibition dans des modèles d'IR. Cependant, les résultats obtenus pour les différents PARs montrent des résultats parfois contradictoires en fonction des modèles utilisés. Des souris déficientes en PAR-1 subissant une ischémie cérébrale ont présenté une taille d'infarctus diminuée (58). L'inhibition sélective de PAR-1 par le peptide SCH79797 a permis de diminuer la taille finale d'infarctus dans un modèle d'IR myocardique chez le rat (59). La même équipe a démontré plus récemment l'effet bénéfique de ce peptide sur le remodelage ventriculaire et sur l'activité pro-fibrotique des fibroblastes (60). Une autre équipe avait déjà démontré un effet bénéfique de la déplétion en PAR-1 sur le remodelage mais sans effet sur la taille d'infarctus dans un modèle d'IR myocardique chez des souris déficientes en PAR-1 (61). L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette différence serait une compensation de l'absence de PAR-1 par une surexpression de PAR-4 (62). Concernant l'effet de PAR-2 sur la formation des lésions de reperfusion myocardique, certains démontrent l'effet bénéfique de sa déplétion sur la taille d'infarctus (63) alors que d'autres décrivent son activation comme étant protectrice (64) (65). Enfin, l'inhibition de PAR-4 par un antagoniste permettait de diminuer la taille d'infarctus dans un modèle d'IR myocardique chez le rat (66).

L'inhibition des PARs paraît être une approche efficace pour limiter les effets néfastes de l'IR. Les discordances entre les résultats obtenus par les différentes études citées sont essentiellement liées au choix du modèle (animaux génétiquement modifiés déficients en un type de PAR ou bien inhibition pharmacologique plus ou moins spécifique d'un PAR).

## 2. Stratégies de cardioprotection

L'objectif de la cardioprotection est de limiter la formation des lésions de reperfusion et ainsi diminuer la taille finale de l'infarctus. Les stratégies de cardioprotection mettent en jeu l'activation des voies de survie cellulaire, représentées par la voie *reperfusion injury salvage kinase* (RISK) et la voie *survivor activating factor enhancement* (SAFE). La voie RISK est constituée de différentes kinases, parmi lesquelles se trouvent la *phosphatidylinositol-3kinase* (PI3K), les *extracellular signal regulated kinases 1/2* (ERK 1/2) et les *mitogen-activated protein kinase kinase 1/2* (MEK 1/2). ERK 1/2 et MEK 1/2 appartiennent à la famille des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). La voie RISK aboutit à la phosphorylation de la *glycogène synthase kinase-3 beta* (GSK-3 $\beta$ ) et à l'ouverture du mK<sub>ATP</sub> qui induit la production de ROS et l'activation de la protéine kinase C epsilon (PKC- $\epsilon$ ). La voie SAFE implique la Janus kinase (JAK) et le facteur de transcription STAT3. Ces deux voies doivent leur effet cardioprotecteur à un effet inhibiteur sur la même cible, le mPTP (Figure 8), acteur central de la formation des lésions de reperfusion comme vu précédemment. Des travaux ont montré que ces deux voies pouvaient interagir entre elles (67).

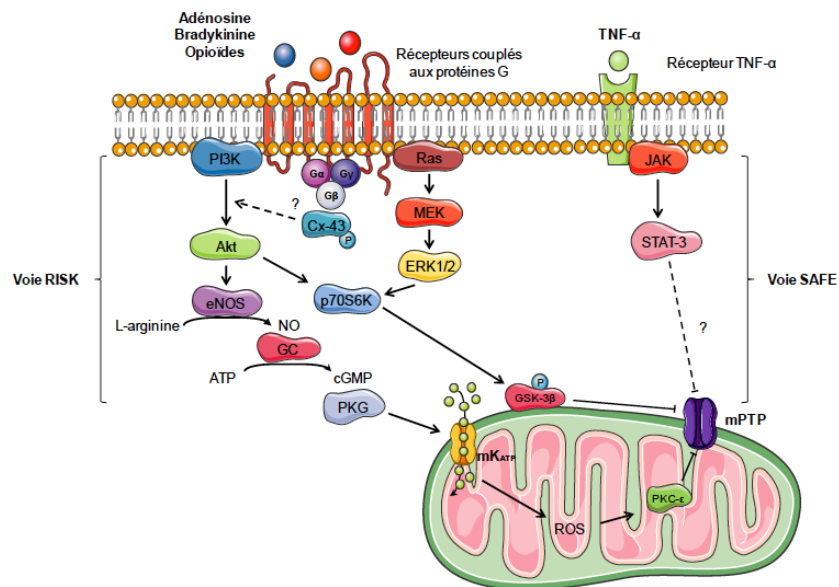


Figure 8: Représentation schématique des voies de survie cellulaire RISK et SAFE. Adapté d'après (68)

### ***Cardioprotection mécanique locale***

La notion de conditionnement mécanique est apparue en 1986 avec l'étude de Murry *et al* démontrant chez le chien que des occlusions brèves et répétées appliquées au niveau d'une artère coronaire juste avant une ischémie plus prolongée de cette même coronaire permettait de réduire la taille finale de l'infarctus (69). Il s'agit du préconditionnement ischémique. Ce phénomène a pu être reproduit chez de nombreuses espèces et appliquée à différents organes (70) (71). L'intérêt du préconditionnement n'est pas tellement son application clinique éventuelle, limitée du fait du caractère imprévisible d'un infarctus du myocarde, mais bien la meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans son effet protecteur. Le préconditionnement implique principalement la voie RISK avec notamment la libération de substances endogènes telles que la bradykinine et l'adénosine (72), capables de se fixer à leurs récepteurs spécifiques et d'activer les kinases de cette voie de survie cellulaire. Il faut toutefois noter que le préconditionnement local a pu être appliqué avec succès au cours de chirurgies coronaires programmées (73).

En 2003, l'équipe de Zhao *et al* a démontré l'intérêt de réaliser le même type de séquences répétées d'ischémie au niveau d'une coronaire mais cette fois juste après une ischémie prolongée de la même coronaire (74). Il s'agit du post-conditionnement ischémique. On obtient un effet comparable à celui du préconditionnement sur la taille finale d'infarctus. Il a été démontré que l'activation des voies RISK et SAFE était impliquée dans la cardioprotection induite par le post-conditionnement (75) (76). L'application clinique de cette stratégie est beaucoup plus intéressante que celle du préconditionnement et sa découverte a conduit à plusieurs essais cliniques démontrant son efficacité au cours de la prise en charge d'un infarctus du myocarde (77) (78) (79). Le post-conditionnement local reste cependant une stratégie très invasive et même si ses effets bénéfiques ont été largement démontrés, elle ne permet pas de réduire la morbi-mortalité (80) ce qui limite son application chez l'homme.

### ***Cardioprotection mécanique à distance***

Plus étonnamment, le conditionnement ischémique à distance a également montré un bénéfice sur la taille finale d'infarctus (81). Cette stratégie consiste à

appliquer des séquences d'ischémie répétées au niveau d'un organe autre que le cœur. Selon le moment où elles sont appliquées par rapport à la phase d'ischémie prolongée, on parlera de préconditionnement à distance (81), per-conditionnement à distance (82) ou post-conditionnement à distance (83). Différents organes peuvent être le siège de ce conditionnement, notamment les membres (84). Cette stratégie présente beaucoup d'avantages, le principal étant qu'elle ne nécessite pas d'avoir accès à l'artère obstruée ainsi que son caractère non invasif. Concernant son application chez l'homme, différentes études ont prouvé son effet bénéfique (85). Cependant, son impact sur la morbi-mortalité reste à confirmer (86).

### ***Cardioprotection pharmacologique***

La meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la formation des lésions de reperfusion ainsi que la découverte des voies de signalisation associées à la cardioprotection, ont conduit à la recherche et au développement d'agents pharmacologiques capables de mimer les effets du conditionnement ischémique. De nombreuses molécules ont été testées chez l'animal, mettant d'ailleurs en évidence des différences d'effet entre les espèces. La ciclosporine A par exemple ne serait pas cardioprotectrice chez le rat (87). Une partie de ces molécules ont été testées chez l'homme et ont fait la preuve de leur effet cardioprotecteur (Tableau 1).

**Tableau 1: Agents pharmacologiques cardioprotecteurs ayant démontré leur efficacité à la phase aigue de la reperfusion chez l'homme (88)**

|                                             | <b>Modalités<br/>d'administration</b>                          | <b>Nombre de<br/>patients</b> | <b>Mécanisme<br/>d'action</b>                                                                      | <b>Essai clinique</b>                                 |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Atrial<br/>Natriuretic<br/>Peptide</b>   | IV pendant 72h,<br>démarré <u>après</u> la<br>reperfusion      | 569                           | Activateur de la<br>voie RISK                                                                      | J-WIND-ANP<br>Kitakaze <i>et al</i><br>(89)           |
| <b>Ciclosporine<br/>A</b>                   | IV<br>10 minutes <u>avant</u><br>angioplastie primaire         | 58                            | Inhibition du<br>mPTP                                                                              | Piot <i>et al</i><br>(90)                             |
| <b>Exenatide</b>                            | IV pendant 6h<br>démarré 15 min <u>avant</u><br>la reperfusion | 107                           | Activateur de la<br>voie RISK                                                                      | Lonborg <i>et al</i><br>(91)                          |
| <b>Glucose-<br/>Insuline-<br/>Potassium</b> | IV pendant 12h<br>démarré <u>avant</u> la<br>reperfusion       | 357                           | Amélioration<br>du<br>métabolisme<br>du glucose                                                    | IMMEDIATE<br>Selker <i>et al</i><br>(92)              |
| <b>Métoprolol</b>                           | IV<br>démarré <u>avant</u> la<br>reperfusion                   | 220                           | Réduction de la<br>consommation<br>d'O <sub>2</sub> =><br>diminution de<br>la production<br>de ROS | METOCARD-<br>CNIC 2013<br>Ibanez <i>et al</i><br>(93) |

### **III- Anticoagulants et ischémie-reperfusion**

Les liens existant entre coagulation et inflammation et leur impact sur la formation des lésions de reperfusion suggèrent que les sérines protéases de la coagulation seraient une cible intéressante pour limiter la formation de ces lésions. L'effet des inhibiteurs physiologiques de la coagulation tels que l'antithrombine, la protéine C activée (PCa) ou le TFPI, ainsi que celui de certains anticoagulants de synthèse ont été étudiés dans ce contexte.

#### **1. L'antithrombine**

L'antithrombine est un inhibiteur de sérine protéases, appartenant à la famille des serpins. Son effet inhibiteur s'exerce sur la thrombine et le facteur Xa principalement, mais également sur le facteur IXa et le facteur XIa. Il s'agit de l'inhibiteur physiologique de la coagulation le plus étudié en ce qui concerne ses effets protecteurs dans l'IR. Chez des rats soumis à 60 minutes d'ischémie rénale puis 24 heures de reperfusion, l'administration d'antithrombine juste avant la reperfusion a permis de diminuer les lésions histologiques au niveau rénal ainsi que le taux de créatinine et l'infiltration de polynucléaires neutrophiles (94). Cet effet protecteur et anti-inflammatoire a été confirmé dans un modèle d'IR mésentérique chez le rat où l'antithrombine diminuait les lésions histologiques et les dépôts de fibrine, ainsi que le taux d'IL-6 plasmatique (95). Elle posséderait un effet cardioprotecteur chez la souris (96) lié à un effet anti-inflammatoire et à l'activation de voies de signalisation protectrices via les héparane-sulfates endothéliaux, avec implication de l'AMP kinase (97). L'antithrombine aurait également un rôle protecteur direct au niveau de l'endothélium, passant par la préservation du glycocalyx. Dans un modèle de cœur isolé reperfusé chez le cobaye, l'ajout d'antithrombine au soluté de reperfusion diminuait le relargage du glycocalyx endothélial (98). La même équipe a démontré que la préservation du glycocalyx par l'antithrombine dans ce modèle permettait de diminuer l'infiltration leucocytaire (99). L'effet anti-inflammatoire et protecteur de l'antithrombine dans l'IR myocardique ne serait donc pas uniquement lié à son effet inhibiteur de protéases mais aussi à un effet direct sur l'endothélium.

## 2. La protéine C activée

Suite à l'activation de la coagulation, la thrombine se lie à la thrombomoduline, devenant ainsi anticoagulante et permettant l'activation de la protéine C en PCa. Cette activation de la protéine C est considérablement augmentée en présence du récepteur endothélial de la protéine C (EPCR). La PCa est ensuite capable d'exercer son effet anticoagulant, avec son cofacteur la protéine S, *via* la dégradation protéolytique du facteur Va et du facteur VIIIa. Du fait de son activité protéolytique, la PCa est également capable d'activer le PAR-1. Contrairement à l'activation du même récepteur par la thrombine, l'activation de PAR-1 par la PCa aboutit à un effet cytoprotecteur et anti-inflammatoire (100). Cet effet peut paraître paradoxal, d'autant plus que la formation de PCa requiert la présence de thrombine. Comment expliquer que la PCa soit à l'origine d'une signalisation protectrice *via* PAR-1 dans un environnement comportant de la thrombine ? Ce phénomène est en partie expliqué par la localisation de l'EPCR, la thrombomoduline et PAR-1 à la surface des cellules endothéliales. Ils sont présents au niveau de surfaces membranaires particulières, les *caveolae*, qui correspondent à des microdomaines riches en caveoline-1, une protéine transmembranaire. Une fois lié à la PCa, l'EPCR se détacherait de la caveoline-1 et permettrait le déclenchement d'une signalisation protectrice médiée par l'activation de PAR-1 par la PCa (101). Une autre hypothèse serait l'existence d'un site de clivage différent au niveau de PAR-1 par la PCa (102), à l'origine d'une signalisation différentielle. Dans le cas de l'activation de PAR-1 par la PCa, la signalisation cellulaire n'est pas médiée par une protéine G mais par la  $\beta$ -arrestine (103). Ainsi, contrairement à l'utilisation d'autres anticoagulants, lors de l'utilisation de PCa, c'est l'activation d'un récepteur PAR qui est recherchée et non son inhibition.

La PCa a fait la preuve de son effet protecteur dans différents modèles d'IR et chez différentes espèces animales. Dans un modèle d'IR chez la souris, l'effet cardioprotecteur de la PCa était visible à partir de six heures de reperfusion, avec une diminution significative de la taille d'infarctus (104). Cet effet était clairement lié à l'activation de PAR-1 puisque l'ajout d'un inhibiteur sélectif de PAR-1 ou l'utilisation de souris PAR-1  $-/-$  supprimait le bénéfice apporté par la PCa. La protection induite par la PCa dans ce modèle serait médiée par un effet anti-inflammatoire et anti-apoptotique. La PCa serait également cardioprotectrice *via* l'activation de l'AMP kinase, entraînant un

effet anti-inflammatoire (105). Concernant l'effet protecteur de la PCa sur d'autres organes que le cœur, son effet bénéfique sur l'IR cérébrale a été bien décrit. Chez la souris (106) et chez le rat (107), l'administration de PCa était à l'origine d'un effet neuroprotecteur, associé à un effet anti-inflammatoire et anti-apoptotique. Enfin, la PCa aurait également des propriétés hépatoprotectrices chez le rat (108).

### **3. Le TFPI**

Le TFPI est un inhibiteur de protéase de type Kunitz capable d'inhiber le complexe TF/facteur VIIa. L'administration de TFPI dans un modèle d'IR de la moelle épinière chez le lapin juste avant la reperfusion permettait une meilleure récupération neurologique (109). Dans un modèle d'IR hépatique chez le rat, l'administration de TFPI permettait de diminuer l'atteinte hépatique évaluée par des dosages d'ALAT (110). De la même manière, la nécrose tissulaire rénale observée chez des rats ayant subi une séquence d'IR rénale était moins importante dans le groupe d'animaux ayant bénéficié d'une injection de TFPI au moment de la reperfusion (111).

### **4. Les inhibiteurs de la thrombine**

Le premier inhibiteur de la thrombine à avoir été testé dans un modèle d'IR est l'héparine non fractionnée (HNF). L'HNF est un inhibiteur indirect de la thrombine, qui agit en se liant à l'antithrombine. Elle possède également un effet inhibiteur sur le facteur Xa. Dans un modèle d'IR myocardique chez le chien, l'HNF administrée par trois injections intraveineuses (une pendant l'ischémie et deux au début de la reperfusion), diminuait la taille finale de l'infarctus (112). Les auteurs rapportent avoir injecté l'HNF à la dose de 2 mg/kg par injection, ce qui correspond à une dose totale de 1116 UI/kg par animal, dose supérieure aux doses utilisées en thérapeutique humaine (environ 500 UI/kg par jour). Les anticoagulants utilisés à des fins protecteurs dans l'IR chez l'animal le sont souvent à des doses supérieures à celles utilisées en thérapeutique humaine dans un objectif d'anticoagulation. Une autre étude ne retrouvait d'ailleurs pas l'effet cardioprotecteur chez le chien de l'HNF utilisée à des doses équivalentes à celles utilisées chez l'homme (113). La forme acétylée de l'héparine, incapable de se lier à l'antithrombine et donc dépourvue d'activité anticoagulante, posséderait le même effet bénéfique sur la taille d'infarctus chez le chien (112). L'effet cardioprotecteur de l'HNF

serait donc indépendant de son effet anticoagulant. *Ex vivo*, cet effet cardioprotecteur de l'HNF et de la N-acétyl-héparine a également été retrouvé dans un modèle de cœur isolé perfusé avec une amélioration de la fonction myocardique (114). Concernant le mécanisme à l'origine de l'effet protecteur de l'HNF, une étude plus récente a comparé l'effet de l'HNF à celui de l'hirudine, un inhibiteur direct de la thrombine, au niveau de l'adhésion leucocytaire dans un modèle d'IR musculaire (115). Ces deux molécules étaient capables de diminuer l'adhésion leucocytaire mais seulement l'hirudine atténuait la migration leucocytaire, soulignant l'intérêt d'utiliser des inhibiteurs directs de la thrombine dans la protection contre les lésions de reperfusion.

L'inhibition de la thrombine par l'hirudine a permis de diminuer les lésions de reperfusion myocardique chez le lapin (52). Cet effet était indépendant de la formation de fibrine déclenchée par la thrombine, puisque l'administration d'un agent déplaçant le fibrinogène dans le même modèle ne modifiait pas la taille finale d'infarctus. Toujours dans la même étude, l'effet protecteur de l'hirudine était en lien avec l'inhibition de l'expression de l'IL-8 et de MCP-1, ainsi qu'avec la diminution significative de l'infiltration leucocytaire dans l'aire à risque myocardique. L'effet bénéfique de l'inhibition de la thrombine sur les lésions de reperfusion myocardique mettrait donc en jeu un effet anti-inflammatoire. Les effets bénéfiques de l'hirudine dans l'IR ont été confirmés dans un modèle d'IR cérébrale chez le rat (116). Dans un modèle porcin de transplantation rénale, l'inhibition de la thrombine par le mélagatran a également permis d'améliorer la fonction rénale et diminuer la réponse inflammatoire et les lésions histologiques (117). Un autre inhibiteur direct de la thrombine, l'argatroban, a fait la preuve de son effet neuroprotecteur dans un modèle d'ischémie rétinienne transitoire chez le rat, *via* une diminution de l'interaction des leucocytes et des plaquettes avec les cellules endothéliales (118). Enfin, le dabigatran, dernier inhibiteur direct de la thrombine mis sur le marché, n'a pas montré d'effet cardioprotecteur dans un modèle d'IR myocardique chez le lapin (119). Dans cette dernière étude, il faut noter que la dose de dabigatran utilisée était relativement faible (environ 1 mg/kg par animal, contre environ 4 mg/kg utilisés en thérapeutique humaine). Cette dose avait été rapportée comme anticoagulante dans un modèle de thrombose veineuse chez le lapin (120) mais est probablement insuffisante pour obtenir un effet cardioprotecteur. Comme souligné précédemment, le choix de la dose dans l'étude de l'effet des anticoagulants dans l'IR est

un point crucial. Une étude récente s'est intéressée à l'effet du dabigatran dans un modèle d'IR rénale chez le rat, démontrant un effet antioxydant de cette molécule (121). La thrombine semble jouer un rôle central dans la formation des lésions de reperfusion, du fait de ses propriétés pro-inflammatoires *via* l'activation des PAR-1, -3 et -4. Son inhibition dans les situations d'IR paraît être une stratégie judicieuse.

## **5. Les inhibiteurs du complexe FT/facteur VIIa**

Hormis leur activation par la thrombine, les récepteurs PAR-1 et -2 peuvent également être activés par le complexe formé par le FT et le FVIIa. Un des moyens d'inhiber ce complexe est d'utiliser un inhibiteur compétitif du FVIIa, l'*active site inhibited factor VIIa* (ASIS) ou bien encore un anticorps monoclonal dirigé contre le FT. L'inhibition du facteur VII activé par la molécule ASIS a permis de diminuer les lésions de reperfusion myocardique chez la souris (122). Chez le lapin, dans un modèle d'IR myocardique, l'utilisation d'une molécule recombinante similaire a permis de diminuer non seulement la taille d'infarctus mais également le phénomène de *no-reflow* (123). Chez le rat, l'inhibition du facteur VIIa diminuait la perméabilité vasculaire (124). Dans un modèle d'IR myocardique chez le lapin, l'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur tissulaire avant le début de la reperfusion diminuait de façon importante la taille finale de l'infarctus ainsi que l'infiltration leucocytaire (52).

## **6. Les inhibiteurs du facteur Xa**

La dernière sérine protéase de la coagulation capable d'inhiber les PARs est le facteur Xa qui agit sur les PAR-1 et -2. L'inhibition du facteur Xa fait donc partie des stratégies à envisager pour inhiber la réaction inflammatoire liée à la coagulation et impliquée dans la formation des lésions de reperfusion.

Les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) présentent une activité anti-Xa bien supérieure à leur activité anti-IIa, contrairement à l'HNF. Elles agissent également en se liant à l'antithrombine. Elles possèdent l'avantage d'avoir une activité anticoagulante très prédictible et reproductible (125), sont administrées par voie sous-cutanée et ne nécessitent pas de surveillance biologique dans la grande majorité des cas. Elles ont donc supplanté l'HNF dans le traitement et la prévention de la maladie

thrombo-embolique veineuse. Concernant leur effet dans les situations d'IR, les HBPM ont fait l'objet de plusieurs études. Dans un modèle d'IR myocardique chez le chien, l'enoxaparine administrée à des doses thérapeutiques juste avant le début de la reperfusion permettait de diminuer la taille finale de l'infarctus ainsi que l'infiltration leucocytaire (113). Cette molécule s'est également avérée être bénéfique dans un modèle d'IR mésentérique chez le rat (126). L'effet protecteur de l'enoxaparine est cependant controversé puisque dans l'IR de membre chez la souris cette molécule n'a pas montré d'effet protecteur (127). Chez des rats soumis à une séquence d'IR hépatique, la daltéparine administrée avant le début de la procédure diminuait l'atteinte hépatique, évaluée par les taux de transaminases circulant, ainsi que la réponse inflammatoire *via* l'inhibition de la libération d'interleukine-12 (128).

Le fondaparinux (FDX), ou pentasaccharide synthétique, est un analogue des HBPM qui inhibe le facteur Xa de manière sélective et indirecte, en se liant à l'antithrombine. Cette molécule a fait la preuve de son effet protecteur vis-à-vis de l'IR, et ce dans différents modèles. Dans le cadre d'un modèle d'IR rénale chez la souris, il a été montré que le FDX diminuait la formation de fibrine, l'inflammation et l'accumulation de polynucléaires neutrophiles au niveau rénal (129). Toujours dans le même modèle, la même équipe a utilisé du FDX modifié ayant perdu son affinité pour l'antithrombine et donc son action anticoagulante. Ce pentasaccharide modifié s'est montré aussi efficace que le FDX en terme de cardioprotection ainsi que pour inhiber l'adhésion cellulaire à la P-Sélectine, mettant ainsi en évidence un effet cardioprotecteur et anti-inflammatoire indépendant de l'effet anticoagulant (130). Les propriétés anti-inflammatoires du FDX dans l'IR myocardique ont été étudiées sur un modèle de cœur isolé, montrant un effet bénéfique du FDX sur la fonction myocardique et une infiltration leucocytaire diminuée (131). Dans la même étude, il a été montré une augmentation de la phosphorylation des kinases ERK1/2 par le FDX, suggérant une implication de la voie RISK dans son mécanisme cardioprotecteur. Des travaux précédemment réalisés dans l'EA3860 à Angers ont démontré l'effet cardioprotecteur du FDX dans un modèle d'IR myocardique *in vivo* chez le rat, mais pas dans un modèle de cœur isolé perfusé sans sang circulant (132). Ainsi, le FDX nécessite la présence de sang circulant pour être cardioprotecteur. Il a été démontré que cet effet cardioprotecteur était en relation avec la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 et donc avec une activation de la

voie SAFE. Cet effet sur cette voie de signalisation cellulaire intervient précocement dans le phénomène d'IR puisque son activation a été mise en évidence après 30 minutes de reperfusion. Chez la souris, cet effet cardioprotecteur n'est pas retrouvé (96). Ceci peut s'expliquer par une réactivité inter-espèce différente ainsi qu'une séquence d'IR différente. Les auteurs de cette dernière étude suggèrent que le FDX supprimerait l'effet protecteur de l'antithrombine en se liant à cette dernière. Dans le contexte de la transplantation rénale, le FDX aurait un intérêt en terme de conservation d'organes puisque l'administration de cette molécule dans un modèle porcin d'autotransplantation rénale a permis une amélioration de la fonction rénale, et une diminution de la fibrose et de l'infiltration leucocytaire (133).

Les deux dernières molécules anti-Xa mises sur le marché sont le rivaroxaban et l'apixaban. Ce sont des inhibiteurs sélectifs directs du facteur Xa, administrés par voie orale. Il existe à ce jour encore peu de données concernant leur effet sur la formation des lésions de reperfusion. Dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, par ligature réversible de l'artère cérébrale moyenne, il a été démontré que ces deux molécules avaient un effet bénéfique sur le risque hémorragique lié à la thrombolyse et ce, par protection de l'unité neurovasculaire (134). Ces résultats suggèrent un effet bénéfique du rivaroxaban et de l'apixaban sur l'endothélium. Dans cette étude, la taille finale de l'infarctus n'a pas été évaluée de manière consensuelle. Cette donnée manque pour étayer l'hypothèse d'un effet protecteur de ces molécules. Chez des souris soumises à une ischémie périphérique par clampage de l'artère fémorale, le rivaroxaban a permis de diminuer les taux de malondialdéhyde, produit final de la peroxydation lipidique et marqueur des lésions induites par les ROS (135). Dans un modèle de thrombose de la veine mésentérique chez des souris diabétiques, le rivaroxaban entraînait une diminution de l'adhésion leucocytaire, suggérant un effet anti-inflammatoire (136). L'effet bénéfique de ces molécules au cours de l'IR reste encore à démontrer par l'utilisation de modèles plus couramment utilisés dans ce type d'études.

## **7. Perspectives cliniques**

Bien que de nombreuses études aient été conduites chez l'animal afin de démontrer les effets protecteurs des anticoagulants dans les situations d'IR, aucune des molécules étudiées n'a encore été testée chez l'homme. Une des limites à l'utilisation des

anticoagulants dans cette indication est le risque hémorragique encouru. Ce risque hémorragique n'a pas été rapporté dans les différentes études réalisées chez l'animal, malgré des doses utilisées souvent très élevées par rapport à celles employées chez l'homme. Dans le domaine du sepsis, les propriétés anti-inflammatoires des anticoagulants suscitent également beaucoup d'intérêt. La molécule la plus prometteuse dans cette situation semble être la PCa. Une forme recombinante de PCa, la drotrecogin alpha activée, a fait l'objet d'un essai clinique de phase trois qui a montré une réduction de la mortalité à 28 jours (137). Une méta-analyse récente conclut à l'absence d'effet de cette molécule sur la mortalité à 28 jours en soulignant le risque hémorragique augmenté (138). L'antithrombine et le TFPI ont également montré un bénéfice en terme de survie dans des essais cliniques mais avec un risque de saignement augmenté (139) (140). Cette difficulté sera probablement rencontrée avec l'utilisation des anticoagulants dans l'IR aussi. Malgré tout, ces molécules présentent un intérêt majeur dans cette indication au vu de l'importance du rôle de la coagulation et de l'inflammation dans la formation des lésions de reperfusion. Le développement de molécules dépourvues d'action anticoagulantes mais conservant leurs propriétés anti-inflammatoires apparaît comme la solution permettant leur utilisation en clinique.

## OBJECTIFS

L'objectif de ce travail était d'étudier les mécanismes à l'origine de l'effet cardioprotecteur du FDX dans un modèle d'IR myocardique chez le rat. Des travaux réalisés précédemment dans l'EA 3860 « Cardioprotection, Remodelage et Thrombose » de la faculté de médecine d'Angers avaient démontré le bénéfice d'une injection de FDX avant reperfusion sur la taille finale de l'infarctus, et ce en lien avec l'activation de la voie de survie cellulaire SAFE, connue pour être impliquée dans la cardioprotection (132). Au vu des propriétés anticoagulantes du FDX et des liens existant entre coagulation, inflammation et endothélium, nous avons souhaité déterminer si l'effet précoce cardioprotecteur du FDX était lié à un effet anti-inflammatoire et/ou protecteur de l'endothélium.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au lien potentiel existant entre l'effet du FDX et l'immunité innée, via l'interleukine-33 (IL-33). Cette molécule est reconnue comme un « signal de danger » par les cellules immunitaires et posséderait des effets protecteurs dans différents modèles d'IR (37) (38) (39). De plus, une étude portant sur les voies de signalisation activées par l'IL-33 dans les mastocytes a montré une augmentation de la phosphorylation de STAT3 sous l'effet de cette cytokine (41). Ce facteur de transcription appartenant à la voie SAFE, nous avons souhaité étudier l'existence d'un lien entre le FDX et l'IL-33. Ce projet a débuté par l'étude de l'effet de l'IL-33 dans notre modèle d'IR myocardique chez le rat, afin de confirmer l'effet protecteur décrit dans la littérature.

# MATERIEL ET METHODES

## I- Modèle expérimental

Tous les animaux ont été traités en accord avec « The guide for the care and the use of laboratory animals » publié par le « National Institutes of Health » (dernière révision en 1996). Le protocole a été approuvé par le Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale (CREEA) des Pays de la Loire (numéro d'autorisation: 2012.138). Des rats mâles Wistar âgés de 8-10 semaines (200-250g) ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (Céva Santé Animale, Libourne, France) à la dose de 60 mg/kg. L'intubation orotrachéale a été pratiquée à l'aide d'une canule de 16 gauges. La ventilation a été réalisée à l'aide d'un respirateur petit animal (SAR-830 A/P, CWE). La température corporelle a été surveillée pendant toute la procédure chirurgicale et maintenue entre 36 et 38°C à l'aide d'une couverture chauffante connectée à un thermomètre (HB101/2 RS, Bioseb, France). Une sternotomie était ensuite réalisée. Le péricarde était retiré afin de mieux exposer la face antérieure du coeur. Un fil de suture (Premio 7.0, Peters Surgical, non résorbable) était placé autour de la partie proximale de l'artère interventriculaire antérieure (IVA). Les deux extrémités du fil étaient ensuite passées dans un petit tube en plastique (PE50) appliqué et maintenu contre l'IVA grâce à un clip (DIEFFENBACK, Vessel Clips, 35mm) permettant ainsi l'occlusion complète de la coronaire. L'ischémie était confirmée par le blanchiment du myocarde en aval de la ligature et sa recoloration une fois le clip retiré.

## II- Protocole expérimental

### 1. Projet 1 : Etude de l'effet du fondaparinux sur l'inflammation et l'endothélium

Les rats ont été randomisés en 4 groupes (Figure 9):

- Groupe 1 : contrôle « 30 minutes » (n=7) subissant une ischémie myocardique de 40 minutes suivie de 30 minutes de reperfusion
- Groupe 2 : FDX « 30 minutes » (n=7) subissant une ischémie myocardique de 40 minutes puis 30 minutes de reperfusion et recevant une injection de FDX

- Groupe 3 : contrôle « 2 heures » (n=7) subissant une ischémie myocardique de 40 minutes suivie de 2 heures de reperfusion
- Groupe 4 : FDX « 2 heures » (n=7) subissant une ischémie myocardique de 40 minutes puis 2 heures de reperfusion et recevant une injection de FDX

Dans les groupes avec injection de FDX, cet anticoagulant était injecté à la dose de 10mg/kg en intrapéritonéal, dix minutes avant le début de la reperfusion. Les groupes contrôle ne recevaient pas d'injection.

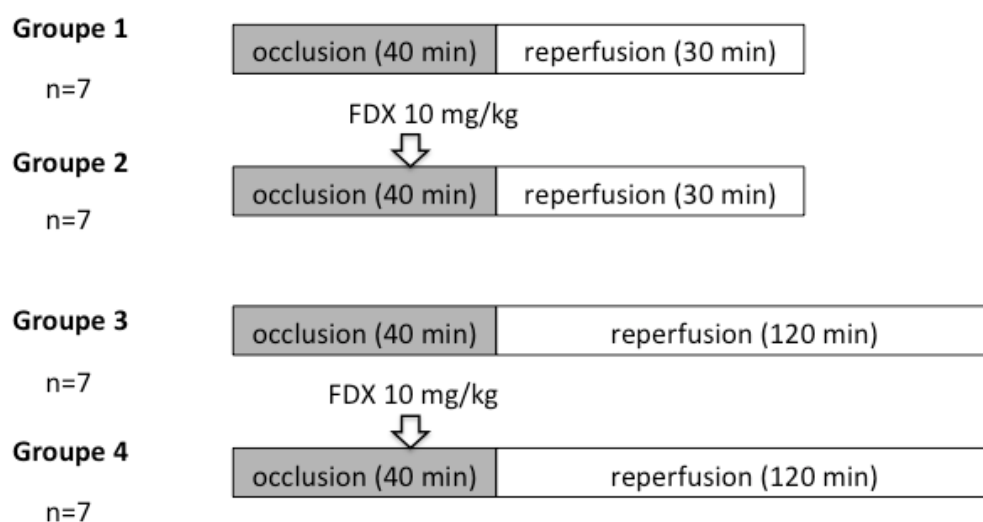


Figure 9: Protocole expérimental Projet 1

## 2. Projet 2 : Etude du rôle de l'immunité innée dans la cardioprotection induite par le fondaparinux

Les rats ont été randomisés en 4 groupes

- Groupe 5 : contrôle « 30 minutes » (n=6) subissant une ischémie myocardique de 40 minutes suivie de 30 minutes de reperfusion
- Groupe 6 : IL-33 « 30 minutes » (n=6) subissant une ischémie myocardique de 40 minutes puis 30 minutes de reperfusion et recevant une injection d'IL-33
- Groupe 7 : contrôle « 2 heures » (n=5) subissant une ischémie myocardique de 40 minutes suivie de 2 heures de reperfusion
- Groupe 8 : IL-33 « 2 heures » (n=5) subissant une ischémie myocardique de 40 minutes puis 2 heures de reperfusion et recevant une injection d'IL-33

Dans le groupe avec injection d'IL-33, la molécule était injectée à la dose de 0,08 mg/kg en intrapéritonéal, dix minutes avant le début de la reperfusion. Les groupes contrôle recevaient une injection d'un volume équivalent de PBS, également dix minutes avant le début de la reperfusion.

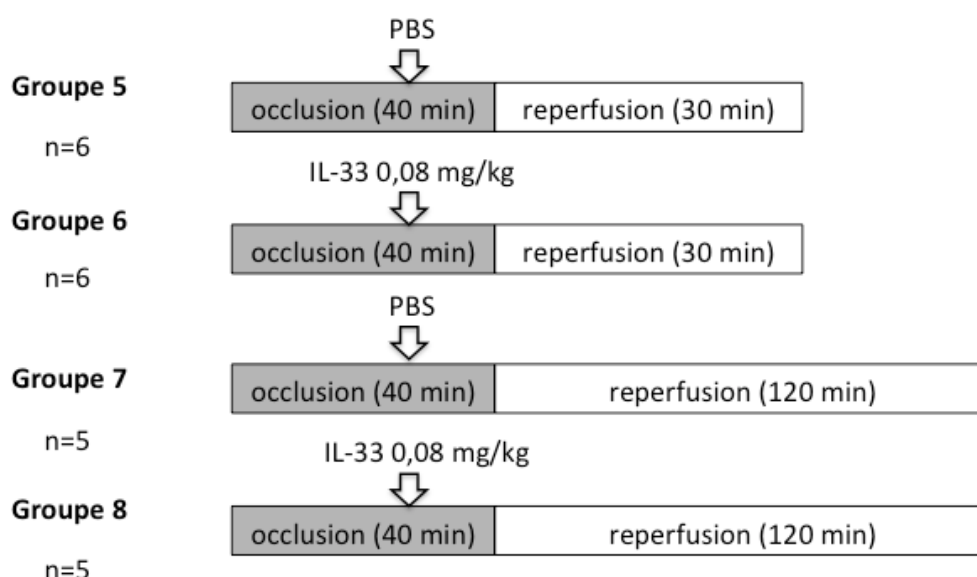


Figure 10: Protocole expérimental Projet 2

### III- Prélèvements

A la fin de la reperfusion (30 minutes ou 2 heures), les cœurs des groupes 1 à 6 étaient rapidement prélevés. La zone infarctée du ventricule gauche était séparée du reste du cœur. Un prélèvement de 1 mm<sup>3</sup> de cette zone a été conservé pour l'étude histochimique et congelé (OCT, freezing gel). Le reste a été réduit en poudre dans l'azote liquide dans un mortier, aliquoté dans trois tubes différents (un destiné à l'extraction d'ARN et deux autres pour l'extraction des protéines) et conservé à -80°C.

Concernant les groupes 7 et 8, la taille d'infarctus a été déterminée à l'issue de la reperfusion. Le cœur battant a été prélevé. Le fil de suture laissé en place a été renoué autour de l'IVA et le cœur perfusé de façon rétrograde par l'aorte avec une solution de bleu d'Evans à 1% (Sigma) jusqu'à obtention d'un bon contraste visuel entre l'aire à

risque (AAR) de couleur rouge et le reste du myocarde coloré en bleu. Le cœur était ensuite rincé avec du sérum physiologique puis le ventricule gauche était séparé des oreillettes et du ventricule droit. Des coupes du ventricule gauche d'environ 1 mm d'épaisseur ont été réalisées de l'apex à la base permettant d'obtenir 5 à 6 coupes par ventricule gauche. Chaque coupe a été pesée et incubée pendant 10 minutes à 37°C dans une solution de 2,3,5-Triphényltétrazolium chloride (TTC) (T7788 ; Sigma) dilué à 1% dans de l'eau distillée. Une fois la fixation rouge vive du myocarde viable de l'aire à risque obtenue (par contraste avec le tissu infarcté blanc), les faces apicales et basales de chacune des coupes ont été photographiées à l'aide d'une caméra avec un agrandissement de 8 fois (Leica DMS) puis numérisées. La taille d'infarctus a été mesurée avec un logiciel de planimétrie (ImageJ) permettant de délimiter l'aire à risque (AAR), non bleue, et l'aire de nécrose (AN) blanche. L'aire de nécrose a été exprimée en pourcentage de l'aire à risque ( $AN/AAR \times 100$ ).

#### **IV- Extraction d'ARN**

L'extraction d'ARN a été réalisée avec le RNeasy Mini kit de chez QIAGEN. Avant l'extraction d'ARN, les prélèvements réduits en poudre ont été homogénéisés au Polytron® dans du Trizol, afin de maintenir intact l'ARN et de lyser les cellules du prélèvement. Pour chaque échantillon, 30 mg de poudre étaient ainsi homogénéisés dans 1 ml de Trizol. L'extraction a été réalisée sur ces 30 mg de broyat de cœur selon les recommandations du fabricant. L'ARN a ensuite été quantifié par spectrophotométrie à 260 nm (Nanodrop™) avec évaluation des ratios d'absorbance 260/280 nm (aux alentours de 2,0) et 260/230 nm (entre 2,0 et 2,2) donnant une indication sur la qualité de l'ARN extrait. Les ARN étaient ensuite conservés à -80°C.

#### **V- Reverse transcription**

L'étape de reverse transcription (RT) a été réalisée à partir de réactifs fournis par Thermo Scientific: reverse transcriptase (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, Thermo Scientific), mélange d'hexanucléotides (Random Hexamer Primer, Thermo Scientific), désoxynucléotides (dNTP mix 10 mM, Thermo Scientific), tampon adapté (5X Reaction Buffer: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3 à 25°C), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM

DTT, Thermo Scientific) et inhibiteur de RNase (RiboLock RNase Inhibitor). A partir des concentrations en ARN obtenues grâce au dosage au Nanodrop™, la quantité souhaitée d'ARN a été prélevée et le volume a été ajusté avec de l'eau RNase-free, afin d'avoir toujours 1 µg d'ARN pour 11,5 µL d'eau. Le mix de RT pour 1 µg d'ARN représente un volume de 8,5 µL (4 µL de tampon 5X, 1 µL de désoxynucléotides, 1 µL de reverse transcriptase, 2 µL d'hexanucléotides et 0,5 µL d'inhibiteur de RNase). Chaque RT de 1µg d'ARN a été effectuée dans un volume final de 20 µL.

Avant ajout du mélange de RT, les échantillons d'ARN ont été placés 10 minutes à 70°C. Les échantillons ont ensuite été placés dans la glace et le mélange de RT était rajouté. Les échantillons étaient maintenus 10 minutes à température ambiante avant d'être placés une heure à 42°C puis à nouveau 10 minutes à 70°C. Les produits de RT ont ensuite été dilués (30 µL d'eau ajoutés par µg d'ARN) et conservés à -20°C.

## VI- PCR quantitatives en temps réel

Les PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées avec le SYBR® Green Master Mix (Life Technologies), prêt à l'emploi. Les amorces (Eurogentec) correspondant au gène d'intérêt ont été rajoutées, diluées à 10 nM, ainsi que la matrice d'ADN complémentaire. La réaction s'effectue dans un volume final de 25 µL (12,5 µL du SYBR® Green Master Mix, 0,9 µL de chaque amorce et 5,7 µL d'eau). Le programme utilisé est le suivant : 10 minutes à 95°C puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C suivies d'une minute à 60°C. L'amplification a été réalisée sur l'automate Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Les séquences des amorces proviennent de travaux précédemment réalisés dans notre équipe (Tableau 2).

Tableau 2: Séquences des amorces utilisées avec taille du fragment amplifié

| Gène                      | Séquence 5' -> 3'     | Taille de l'amplicon (nombre de paires de bases) |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|
| <b>HPRT</b>               | gaccggttctgtcatgtcg   | 1260                                             |
| <b>Thrombomoduline</b>    | agcgttttctcgtagcttgc  | 3680                                             |
| <b>EPCR</b>               | cctggtgcagttgatctatcg | 1400                                             |
| <b>Facteur Tissulaire</b> | gagcaatggaagagtgtcctg | 1798                                             |

La méthode des « Cycle threshold » (Ct) a été utilisée pour la quantification, avec la normalisation de l'expression des gènes cibles par utilisation d'un gène de référence (HPRT), selon la formule suivante :  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Dans cette formule,  $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ gène référence})_x - (Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ gène référence})_{cal}$  avec x=échantillon analysé et cal=calibrateur.

## VII- Extraction et dosage des protéines

Pour chaque échantillon, 100 mg de la poudre obtenue ont été homogénéisés dans 400 µl d'un tampon d'extraction composé de 1 mM de sodium orthovanadate, 4 mM de sodium pyrophosphate, 40 mM de sodium fluoride, 2.5 mM d'EDTA, 2.5 mM d'EGTA, 20 mM de KCl, 30 mM d'HEPES, 10% de glycérol, 0.1% de Nonidet P40, d'un inhibiteur de protéase (Complete Mini ; Roche, 1 pastille pour 10 ml de tampon), d'un inhibiteur de phosphatase (Phosphatase inhibitor Cocktail 3 ; Sigma-Aldrich, 100 µl pour 10 ml de tampon). L'homogénéisation a été suivie d'une centrifugation des échantillons à 4°C et 13000 tours/min pendant une heure. Le surnageant a été recueilli pour le dosage protéique qui a été effectué selon les recommandations du fabricant avec le Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

## VIII- Western Blot

Pour chaque échantillon, 50 µg de protéines ont été dénaturés par chauffage à 100°C pendant 5 minutes en présence d'un tampon dénaturant. La séparation des protéines a été effectuée par électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 12%, pendant 30 minutes à 200V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Bio-Science). La phase suivante consiste en la saturation des membranes dans une solution de lait écrémé à 5% dans du Tris Buffer Saline 0,1%-Tween 20 (TBST 0,1%) pendant 2 à 3 heures. Les membranes sont ensuite mises à incuber la nuit à 4°C en présence d'une solution d'anticorps primaire diluée dans du TBST 0,1%. Les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont des anticorps de lapin dirigés contre : <sup>536</sup>Ser-phospho-NFκB p65 Ser 536 (1/1000 ; Cell Signaling), NFκB p65 total (1/2000 ; Cell Signaling), <sup>32</sup>Ser-phospho-IκBα (1/1000 ; Cell Signaling), IκBα total (1/1000 ; Cell Signaling), <sup>183-185</sup>Thr-phospho-SAPK-JNK (1/1000 ; Cell Signaling), SAPK-

JNK total (1/1000 ; Cell Signaling), facteur tissulaire (1/1000 ; Abcam), <sup>705</sup>Tyr-phospho-STAT3 (1/1000 ; Cell Signaling), STAT3 total (1/1000 ; Cell Signaling), <sup>473</sup>Ser-phospho-AKT (1/1000 ; Cell Signaling), AKT total (1/1000 ; Cell Signaling), phospho-ERK1/2 (1/1000 ; Cell Signaling), ERK1/2 total (1/1000 ; Cell Signaling), <sup>9</sup>Ser-phospho-GSK-3 $\beta$  (1/1000 ; Cell Signaling), GSK-3 $\beta$  total (1/1000 ; Cell Signaling). Des anticorps de souris ont également été utilisés pour la détection des protéines suivantes : GAPDH (1/20000 ; Sigma-Aldrich), ICAM-1 (1/2000 ; Santa-Cruz Biotechnology). Après une étape de lavages successifs des membranes dans du TBST 0,1%, les membranes ont été mises à incuber en présence de l'anticorps secondaire (anti-souris ou anti-lapin selon anticorps primaire, Santa-Cruz Biotechnology) pendant 1 heure à température ambiante. Une dernière étape de lavages successifs est nécessaire avant la révélation. La révélation est effectuée à l'aide d'une caméra CDD (LAS3000 ; Fujifilm Tokyo, Japon) après incubation au luminol (Western Blotting Luminol Reagent ; Santa-Cruz Biotechnology). Les bandes correspondant aux protéines étudiées sont identifiées grâce à leur poids moléculaire. L'intensité des bandes obtenues est quantifiée à l'aide d'un logiciel (ImageJ) et rapportée à celle des bandes correspondant à la GAPDH.

Le Western Blot du facteur tissulaire a été réalisé sur les extraits protéiques obtenus dans notre laboratoire par l'EA3801 de la faculté de médecine de Reims, IFR 53 « Interactions Cellules MicroEnvironnement », dirigée par le Pr Philippe Nguyen.

## **IX- Histochimie : coloration à l'hématoxyline-éosine (HE)**

La coloration HE a été effectuée sur coupes congelées. Des coupes de 14  $\mu$ m ont été réalisées au cryotome à partir des prélèvements de ventricule gauche congelés dans l'OCT et déposées sur lames. Les coupes sont ensuite conservées à -80°C après une étape de séchage (1h30 à 2h). La coloration HES consiste en différents bains successifs : 10 minutes dans l'hématoxyline, rinçage, 10 minutes dans l'éosine, rinçage, deux minutes dans une solution d'alcool à 75°, deux minutes dans une solution d'alcool à 95°, deux minutes dans une solution d'alcool à 100°, cinq minutes dans une solution d'alcool à 100°, 2 minutes dans une solution de xylène, cinq minutes dans une solution de xylène. L'hématoxyline était réalisée au laboratoire par dissolution d'1g d'hématoxyline

cristallisée dans 1L d'eau distillée puis ajout de 0,2g d'iodate de sodium et de 50g d'alun de potassium. La solution d'éosine était réalisée par dissolution d'1g d'éosine Yellow.

Une fois la coloration réalisée, le nombre de leucocytes par champ a été compté sur 8 champs pour chaque échantillon. Une moyenne a été calculée par échantillon puis par groupe (contrôle et FDX).

## **X- Analyse statistique**

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 17.0. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes +/- erreurs standards à la moyenne. Pour la comparaison des moyennes des différents paramètres étudiés à 30 minutes de reperfusion et à deux heures des reperfusion, le test de Mann-Whitney a été utilisé. La différence entre les groupes est considérée comme significative pour  $p < 0,05$ .

# RESULTATS

## I- Projet 1 : Etude de l'effet du fondaparinux sur l'inflammation et l'endothélium

### 1. Effets du fondaparinux sur l'inflammation et sur l'expression du facteur tissulaire et d'ICAM-1

Deux voies de signalisation pro-inflammatoire ont été étudiées par Western Blot à deux heures de reperfusion dans les groupes 3 et 4 (n=4). Il s'agit de la voie du NF- $\kappa$ B et la voie des c-Jun N-terminal Kinases (JNK). L'étude de l'expression protéique de la voie du NF- $\kappa$ B porte sur la phosphorylation de la sous-unité p65 du NF- $\kappa$ B et sur la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ , témoins de l'activation de NF- $\kappa$ B et de son passage au niveau nucléaire. Pour aucune des protéines étudiées il n'a été mis en évidence de différence d'expression entre les groupes contrôles et FDX.

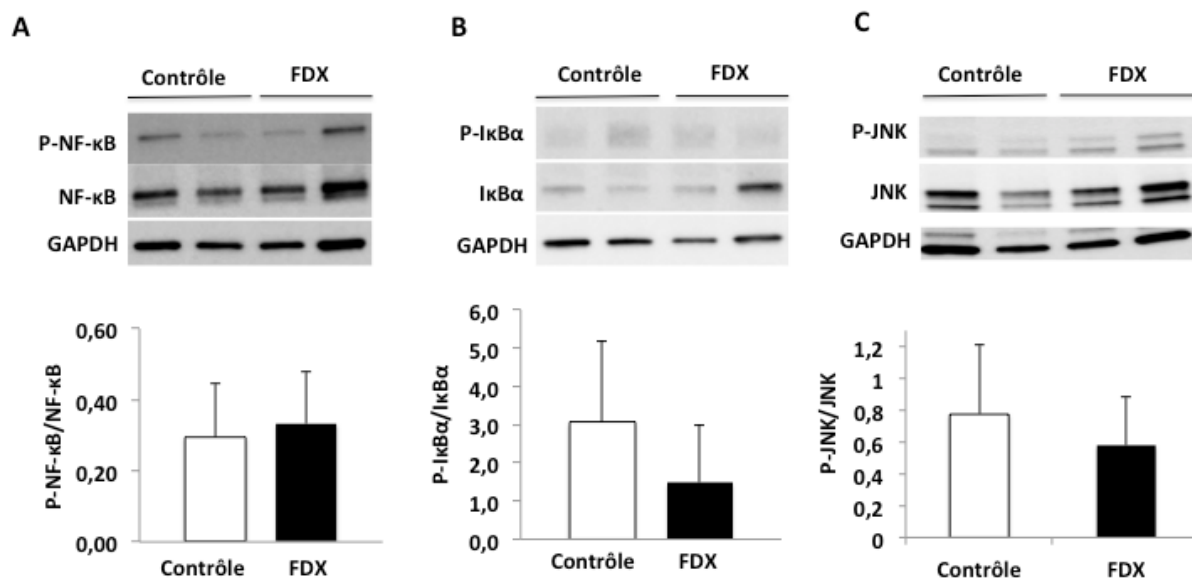


Figure 11 : Expression protéique des voies de signalisation pro-inflammatoire à deux heures de reperfusion (n=4)

L'étude de l'expression protéique du facteur tissulaire et d'ICAM-1 a été réalisée à deux heures de reperfusion sur les groupes contrôle et FDX par Western Blot (n=4). Comme présenté dans la figure 12, il n'existe pas de différence significative concernant l'expression protéique du facteur tissulaire ni d'ICAM-1 dans le groupe FDX par rapport au groupe contrôle.

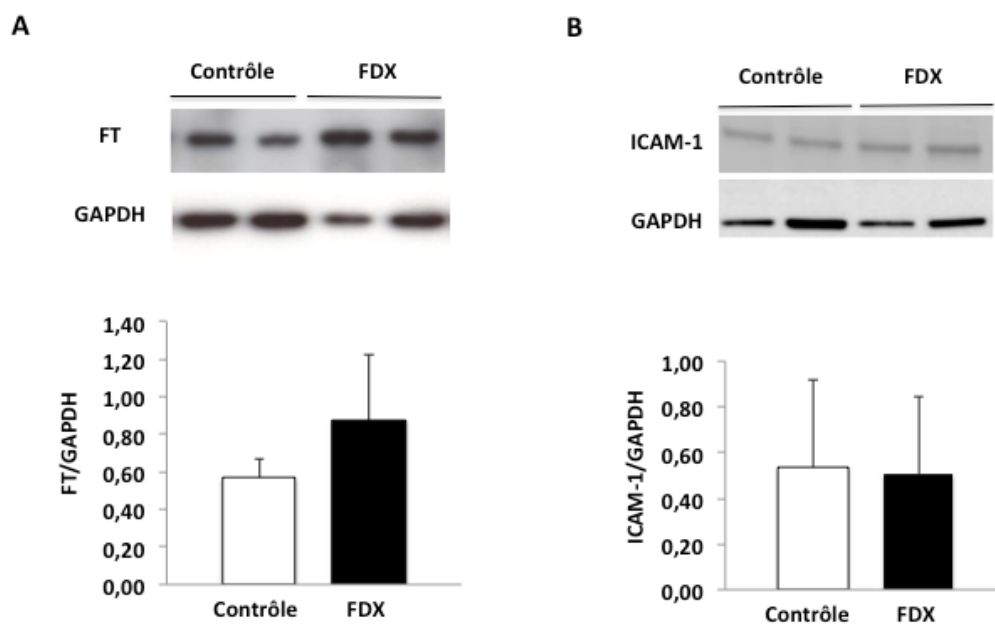
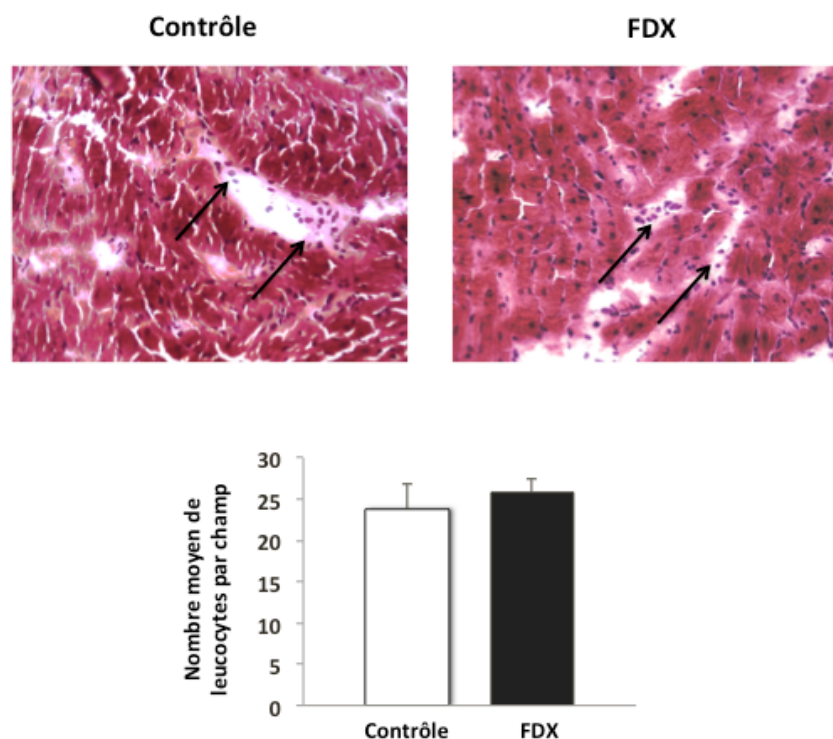


Figure 12 : Expression protéique du facteur tissulaire et de ICAM-1 à deux heures de reperfusion (n=4)

## 2. Analyse histologique

La coloration à l'HE a été réalisée sur des coupes myocardiques de la zone infarctée chez des rats appartenant aux groupes 3 et 4 (n=4 dans chaque groupe), après deux heures de reperfusion. Elle met en évidence la désorganisation du tissu myocardique due à la nécrose provoquée par l'ischémie et des infiltrats cellulaires de type leucocytaires. Il n'y a pas de différence significative concernant l'importance de ces infiltrats dans le groupe contrôle par rapport au groupe FDX.



**Figure 13 : Evaluation de l'infiltration leucocytaire après coloration à l'HE (n=4)**  
Les flèches noires indiquent des infiltrats de leucocytes.

### 3. Effet du fondaparinux sur l'endothélium

A 30 minutes de reperfusion, l'étude de l'expression des marqueurs endothéliaux (et thrombomoduline) et du facteur tissulaire a été réalisée par PCR quantitative sur les groupes 1 et 2 (n=7 dans chaque groupe). Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de l'expression de l'EPCR suite à l'injection de FDX (expression relative de 210,73  $\pm$  46,91 dans le groupe FDX vs 112,92  $\pm$  50,36 dans le groupe contrôle ; p=0,017). Le FDX augmente également l'expression de la thrombomoduline (expression relative de 142,91  $\pm$  19,01 dans le groupe FDX vs 83,46  $\pm$  21,76 dans le groupe contrôle ; p=0,004). Concernant le facteur tissulaire, il n'existe pas de différence significative d'expression entre les deux groupes (expression relative de 124,55  $\pm$  34,40 dans le groupe FDX vs 169,86  $\pm$  20,77 dans le groupe contrôle; p=0,053).

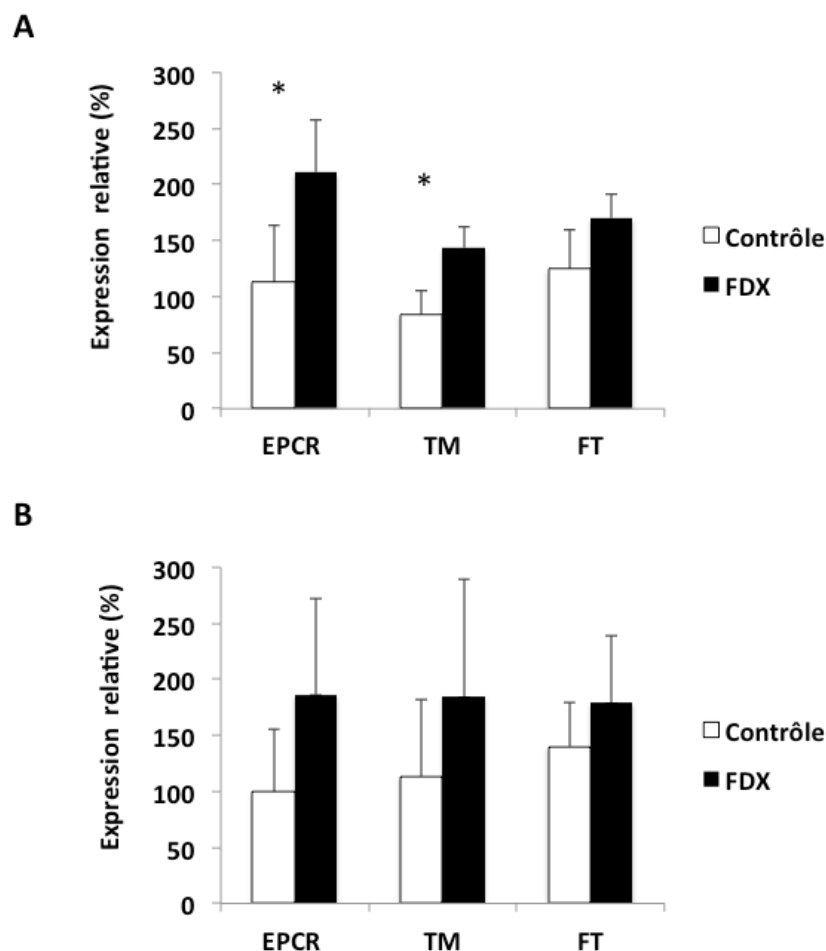


Figure 14 : Expression relative de l'ARNm de l'EPCR, la TM et le FT à 30 minutes de reperfusion (A) et à deux heures de reperfusion (B) (n=7)

## II- Projet 2 : Etude du rôle de l'immunité innée dans la cardioprotection induite par le fondaparinux

Ce deuxième projet visait à étudier l'effet d'une injection d'IL-33 dans notre modèle d'IR myocardique chez le rat. Dans cet objectif, un schéma d'administration similaire à celui du FDX dans la première partie de ce travail a été repris, soit une injection d'IL-33 dix minutes avant le début de la reperfusion.

### 1. Etude de l'expression des voies de survie cellulaire RISK et SAFE à 30 minutes de reperfusion

L'étude de l'expression des voies de survie cellulaire RISK et SAFE a été étudiée après 30 minutes de reperfusion dans les groupes 5 et 6 (n=6) (Figure 15 et Figure 16). La phosphorylation des kinases AKT, ERK1/2 et GSK-3 $\beta$  (voie RISK) ainsi que du facteur de transcription STAT3 (voie SAFE) a été évaluée. Les résultats obtenus ne montrent pas d'activation de ces voies après 30 minutes de reperfusion dans le groupe ayant bénéficié d'une injection d'IL-33 à la dose de 0,08 mg/kg.

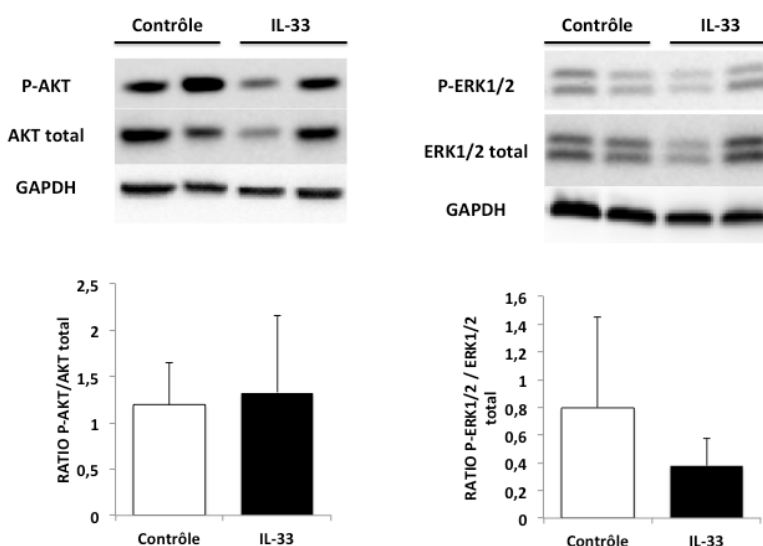


Figure 15 : Expression protéiques des voies de survie cellulaire à deux heures de reperfusion : AKT et ERK1/2 (n=6)

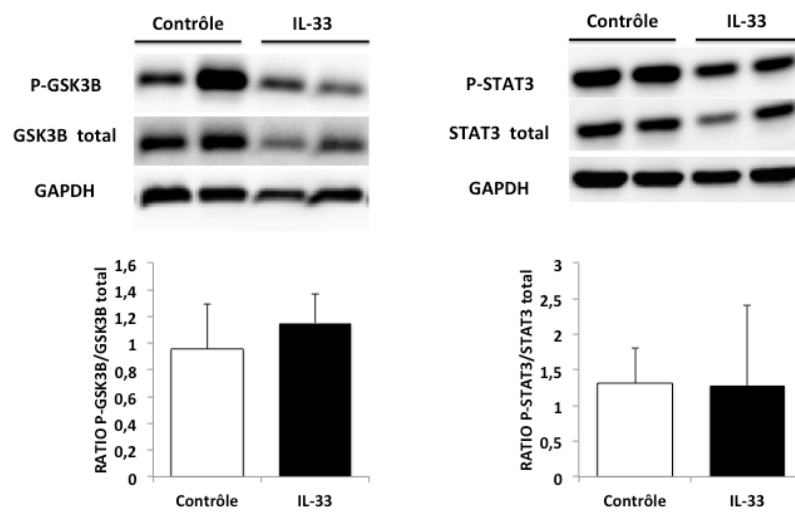


Figure 16 : Expression protéique des voies de survie cellulaire à deux heures de reperfusion : GSK-3 $\beta$  et STAT3 (n=6)

## 2. Evaluation de la taille d'infarctus à deux heures de reperfusion

L'effet de cette même dose d'IL-33 sur la taille d'infarctus évaluée après deux heures de reperfusion a été étudié dans les groupes 7 et 8. Il n'a pas été mis en évidence d'effet de l'injection d'IL-33 à la dose de 0,08 mg/kg sur la taille finale d'infarctus (Figure 17).

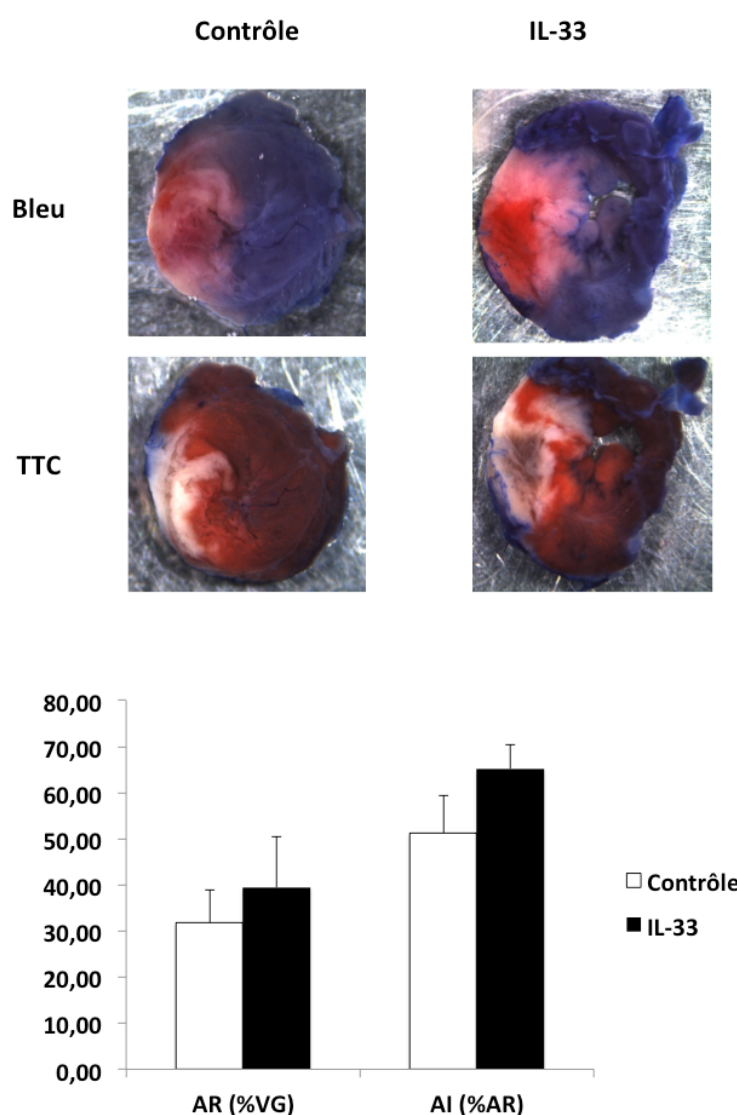


Figure 17 : Evaluation de la taille d'infarctus à deux heures de reperfusion (n =5)

## DISCUSSION

Les mécanismes à l'origine de l'effet bénéfique du FDX dans l'IR myocardique sont à ce jour encore assez mal connus. L'implication des voies de survie cellulaire a été démontrée dans deux études (131) (132), et ce de façon précoce, dès 30 minutes de reperfusion. De manière plus tardive, le FDX posséderait également un effet anti-inflammatoire (129) (130). Aucun lien n'a été mis en évidence pour l'instant entre l'activation des voies de survie RISK et SAFE et l'effet anti-inflammatoire du FDX.

Dans notre modèle, le FDX n'a pas fait la preuve d'un effet anti-inflammatoire à la phase précoce de la reperfusion. En effet, l'injection de FDX avant le début de la reperfusion n'entraînait aucune modification de l'expression des protéines de signalisation pro-inflammatoire étudiées, ni de l'infiltration leucocytaire. L'expression du FT et d'ICAM-1 n'était pas non plus modifiée par le FDX. Bien que l'effet cardioprotecteur du FDX dès deux heures de reperfusion ait été clairement mis en évidence (132), cet effet ne semble pas être en lien avec un effet anti-inflammatoire à la phase précoce de la reperfusion. Il faut souligner que les effets anti-inflammatoires rapportés pour le FDX dans l'IR myocardique l'étaient après un délai de reperfusion de 24 heures (129) délai bien plus tardif que celui auquel nous nous sommes intéressés. D'un point de vue physiopathologique, même si la réaction inflammatoire déclenchée par l'IR débute dès les premières minutes de la reperfusion, les phénomènes inflammatoires et notamment l'infiltration leucocytaire sont surtout visibles à la phase tardive de la reperfusion, au delà de six heures (45). Concernant l'infiltration leucocytaire, il a été montré chez le chien, dans un modèle d'IR myocardique, que les polynucléaires neutrophiles accumulés restaient essentiellement intravasculaires pendant les six premières heures de reperfusion (141). Leur migration transendothéliale n'intervient qu'au bout de 24 heures de reperfusion. Un modèle d'IR myocardique avec un délai de reperfusion prolongé semble donc être indispensable dans l'étude des effets anti-inflammatoires du FDX, les résultats obtenus dans notre étude n'excluant pas un effet anti-inflammatoire plus tardif.

De façon intéressante, nos résultats suggèrent que le FDX posséderait un effet précoce et transitoire sur l'endothélium. Après 30 minutes de reperfusion, on constate en effet que le FDX entraîne une augmentation de la synthèse d'ARNm de la thrombomoduline et de l'EPCR. Cet effet n'est plus visible après deux heures de reperfusion. La thrombomoduline et l'EPCR sont deux protéines localisées au niveau endothélial qui possèdent des propriétés anticoagulantes via le système de la protéine C activée (142). Elles possèdent également des propriétés anti-inflammatoires et participent au maintien de l'intégrité endothéliale dont le rôle est primordial afin de limiter l'impact de la reperfusion sur les tissus concernés (143) (144). La thrombomoduline posséderait un rôle protecteur vis-à-vis de l'athérosclérose selon le même mécanisme (145). Les propriétés protectrices de ces deux molécules pourraient expliquer l'effet cardioprotecteur du FDX. L'EPCR permet l'activation des récepteurs PAR-1 par la PCa. Comme mentionné précédemment, l'activation de PAR-1 dans cette configuration aboutit à un effet protecteur à l'inverse de l'activation par la thrombine (100). La présence d'EPCR étant nécessaire au déclenchement de cette signalisation protectrice (101), l'augmentation de son expression jouerait donc un rôle bénéfique sur l'endothélium et par conséquent sur la formation des lésions de reperfusion. La liaison de la thrombomoduline à la thrombine empêche cette dernière d'exercer son effet activateur sur les PARs. Ainsi la thrombomoduline possède un effet inhibiteur indirect sur les PARs. De plus, il a été démontré que le domaine lectin-like de la thrombomoduline possédait un effet anti-inflammatoire indépendant de l'effet anticoagulant de la thrombomoduline, à l'origine d'une diminution de l'infiltration leucocytaire (146). Dans un modèle d'IR myocardique, ce domaine lectin-like permettait même de diminuer la taille finale de l'infarctus (147). Le mécanisme à l'origine de cet effet protecteur serait la liaison à HMGB1. L'effet protecteur de la thrombomoduline a également été démontré dans des modèles d'IR hépatique (148) et rénale (149).

Le rôle du système d'activation de la PC formé par la thrombomoduline et l'EPCR semble capital dans la préservation des organes des lésions d'IR. Ceci est confirmé par l'effet bénéfique de l'administration de PC activée dans des modèles d'IR, qu'ils concernent le myocarde (150) (104) ou d'autres organes (106) (107) (108).

En conclusion, à la phase précoce de la reperfusion, le FDX ne posséderait pas d'effet anti-inflammatoire permettant d'expliquer son effet cardioprotecteur. En revanche, nos résultats suggèrent un effet du FDX bénéfique sur l'endothélium, via l'augmentation de l'expression de deux marqueurs protecteurs, l'EPCR et la thrombomoduline.

## PERSPECTIVES

L'activation précoce du système de la PC activée suite à une injection de FDX au cours de l'IR myocardique devra être confirmée par l'étude de l'expression protéique de l'EPCR et de la thrombomoduline dans notre modèle.

Nous nous intéressons également à l'effet d'autres anticoagulants dans l'IR myocardique. Le FDX est un anti-Xa agissant de façon indirecte par liaison à l'antithrombine. Afin de préciser les mécanismes à l'origine de son effet cardioprotecteur, il serait judicieux d'étudier l'effet de molécules anti-Xa directes telles que le rivaroxaban ou l'apixaban. L'étude de ces molécules permettrait de déterminer la part éventuelle de la liaison à l'antithrombine dans l'effet protecteur du FDX. Selon l'équipe de Wang, c'est l'antithrombine et non le FDX qui serait à l'origine d'un effet cardioprotecteur (96). En effet, leur étude ne retrouve pas d'effet bénéfique du FDX administré seul dans leur modèle d'IR myocardique chez la souris. Selon eux, le pentasaccharide synthétique administré en présence d'antithrombine supprimerait l'action protectrice de celle-ci médiée les héparanes sulfates endothéliaux. Les voies impliquées dans l'effet protecteur mis en évidence sont donc différentes des voies de survie auxquelles nous nous sommes intéressés. Le modèle utilisé est également différent. Le rôle de la liaison à l'antithrombine dans l'effet bénéfique du FDX mérite en tout cas d'être précisé et ce, grâce aux molécules anti-Xa directes. L'étude de l'effet de molécules anti-IIa directes telles que le dabigatran présente également un intérêt du fait de l'action directe et locale sur la thrombine. La seule étude réalisée avec cette molécule dans l'IR myocardique ne retrouvait pas d'effet protecteur, mais la dose utilisée était probablement trop faible (119).

En parallèle de ces travaux réalisés *in vivo*, il serait intéressant d'étudier l'effet des anticoagulants sur des cultures de cellules endothéliales ainsi que sur des cardiomyocytes isolés. En effet, nos différents résultats obtenus pour l'instant portent sur l'analyse du tissu myocardique constituant le ventricule gauche en entier. Les prélèvements réalisés comportent donc différents types cellulaires, majoritairement des cardiomyocytes mais aussi des cellules endothéliales et des fibroblastes, sans moyen de

les distinguer. Grâce à l'étude *in vitro* sur cultures cellulaires, nous pourrions ainsi préciser la cible du FDX au sein du myocarde et donc son mécanisme d'action. L'étude *in vitro* pourrait être étendue à l'étude des anticoagulants directs. S'agissant de la comparaison des effets anti-inflammatoires du FDX et du rivaroxaban, une étude récente réalisée *in vitro* sur des cellules macrophagiques stimulées par du LPS a mis en évidence un effet différent de ces deux molécules sur la sécrétion de certaines cytokines, notamment l'IL-10, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  (151). Ces résultats laissent penser que les mécanismes impliqués dans l'effet anti-inflammatoire de ces deux anticoagulants pourraient être différents.

Enfin, le rôle de l'immunité innée et de l'IL-33 dans l'effet du FDX est encore incertain. Après une injection unique réalisée au même moment que l'injection de FDX, soit dix minutes avant le début de la reperfusion, nous n'avons pas mis en évidence d'effet cardioprotecteur. La dose utilisée était une très faible dose (0,08 mg/kg). Des doses plus importantes doivent être testées avant de conclure à l'absence d'effet cardioprotecteur de l'IL-33. Du fait des voies de signalisation activées par l'IL-33 (41) et de son effet cardioprotecteur connu (38) (37), l'étude d'un lien entre cette cytokine et l'effet bénéfique du FDX semble être une piste intéressante. Dans cet objectif, nous souhaitons également évaluer l'expression d'IL-33 en présence de FDX.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006 Nov;3(11):e442.
2. Kennedy JW. Limiting the size of myocardial infarction by early coronary artery reperfusion. *Heart Dis Stroke J Prim Care Physicians*. 1993 Apr;2(2):93-7.
3. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1998 May 1;38(2):291-300.
4. Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles 2010. OMS, Genève; 2011.
5. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Oct 16;60(16):1581-98.
6. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1994 May 1;14(5):840-56.
7. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74.
8. Pearson JD. Normal endothelial cell function. *Lupus*. 2000;9(3):183-8.
9. Shah PK. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Feb 19;41(4 Suppl S):15S-22S.
10. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons From Sudden Coronary Death A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May 1;20(5):1262-75.
11. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317.
12. Akoudad H, Benamer H. Physiopathologie et étiopathogénie de l'infarctus du myocarde. *EMC - Cardiol-Angéiologie*. 2004 Feb;1(1):49-67.
13. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977 Nov;56(5):786-94.
14. De Peretti C, Chin F, Tuppin P, Danchin N. Personnes hospitalisées pour infarctus du myocarde en France: tendances 2002-2008. *Bull Epidemiol Hebd*. 2012 Nov 6;(41):459-65.
15. Cambou J-P, Simon T, Mulak G, Bataille V, Danchin N. The French registry of Acute ST elevation or non-ST-elevation Myocardial Infarction (FAST-MI): study design and baseline characteristics. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2007 Jul;100(6-7):524-34.
16. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation*. 1994 Jul;90(1):583-612.
17. Achar SA, Kundu S, Norcross WA. Diagnosis of acute coronary syndrome. *Am Fam Physician*. 2005 Jul 1;72(1):119-26.
18. Medkour F, Pellerin D, Fournier C, Assayag P. Traitements à la phase aiguë de

l'infarctus du myocarde. *Réanimation*. 2001 Mar;10(2):196–204.

19. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*. 2003 Jan 4;361(9351):13–20.
20. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960 Jul;70:68–78.
21. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121–35.
22. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Nov;301(5):H1723–1741.
23. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS*. 1996;76:99–114.
24. Bond JM, Herman B, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Sep 16;179(2):798–803.
25. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995 Apr 1;307 ( Pt 1):93–8.
26. Miura T, Tanno M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. *Cardiovasc Res*. 2012 May 1;94(2):181–9.
27. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Apr;35(4):339–41.
28. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*. 1988 Jan 25;263(3):1353–7.
29. Zweier JL, Talukder MAH. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2006 May 1;70(2):181–90.
30. Jin C, Cleveland JC, Ao L, Li J, Zeng Q, Fullerton DA, et al. Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: the proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *Mol Med Camb Mass*. 2014;20:280–9.
31. Kim BS, Lim SW, Li C, Kim JS, Sun BK, Ahn KO, et al. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation*. 2005 May 27;79(10):1370–7.
32. Kohno T, Anzai T, Naito K, Miyasho T, Okamoto M, Yokota H, et al. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodelling. *Cardiovasc Res*. 2009 Feb 15;81(3):565–73.
33. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull*. 2005 May;28(5):886–92.
34. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001;15(5):293–306.
35. De Hoog VC, Timmers L, Van Duijvenvoorde A, De Jager SCA, Van Middelaar BJ, Smeets MB, et al. Leucocyte expression of complement C5a receptors exacerbates infarct size after myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2014 Sep 1;103(4):521–9.
36. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol*. 2011 May;8(5):292–300.

37. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J, et al. Interleukin-33 Prevents Apoptosis and Improves Survival After Experimental Myocardial Infarction Through ST2 Signaling. *Circ Heart Fail*. 2009 Nov 1;2(6):684–91.
38. Rui T, Zhang J, Xu X, Yao Y, Kao R, Martin CM. Reduction in IL-33 expression exaggerates ischaemia/reperfusion-induced myocardial injury in mice with diabetes mellitus. *Cardiovasc Res*. 2012 May 1;94(2):370–8.
39. Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, et al. Interleukin-33 Is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology*. 2012 Oct;56(4):1468–78.
40. Miller AM, Liew FY. The IL-33/ST2 pathway — A new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2011 Aug;131(2):179–86.
41. Drube S, Heink S, Walter S, Lohn T, Grusser M, Gerbaulet A, et al. The receptor tyrosine kinase c-Kit controls IL-33 receptor signaling in mast cells. *Blood*. 2010 May 13;115(19):3899–906.
42. Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, Funke B, Eichberger SN, Kaya Z, et al. High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation*. 2008 Jun 24;117(25):3216–26.
43. Takahashi K, Fukushima S, Yamahara K, Yashiro K, Shintani Y, Coppen SR, et al. Modulated inflammation by injection of high-mobility group box 1 recovers post-infarction chronically failing heart. *Circulation*. 2008 Sep 30;118(14 Suppl):S106–114.
44. Kitahara T, Takeishi Y, Harada M, Niizeki T, Suzuki S, Sasaki T, et al. High-mobility group box 1 restores cardiac function after myocardial infarction in transgenic mice. *Cardiovasc Res*. 2008 Oct 1;80(1):40–6.
45. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost*. 2007 May;97(5):738–47.
46. Vrints CJM. Pathophysiology of the no-reflow phenomenon. *Acute Card Care*. 2009 Jan 1;11(2):69–76.
47. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, et al. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology*. 2007 Nov;107(5):776–84.
48. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 2000 Sep;440(5):653–66.
49. Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, et al. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation*. 1997 Feb 4;95(3):684–92.
50. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol*. 1989 May;134(5):1087–97.
51. Luther T, Dittert DD, Kotzsch M, Erlich J, Albrecht S, Mackman N, et al. Functional implications of tissue factor localization to cell-cell contacts in myocardium. *J Pathol*. 2000 Sep;192(1):121–30.
52. Erlich JH, Boyle EM, Labriola J, Kovacich JC, Santucci RA, Fearn C, et al. Inhibition of the tissue factor-thrombin pathway limits infarct size after myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation. *Am J Pathol*. 2000 Dec;157(6):1849–62.
53. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Aug 1;27(8):1687–93.
54. Siller-Matula JM, Schwameis M, Blann A, Mannhalter C, Jilma B. Thrombin as a

- multi-functional enzyme. *Thromb Haemost*. 2011;106(4):705–11.
55. Chu AJ. Tissue factor mediates inflammation. *Arch Biochem Biophys*. 2005 Aug 15;440(2):123–32.
  56. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):258–64.
  57. Antoniak S, Pawlinski R, Mackman N. Protease-activated receptors and myocardial infarction. *IUBMB Life*. 2011 Jun;63(6):383–9.
  58. Junge CE, Sugawara T, Mannaioni G, Alagarsamy S, Conn PJ, Brat DJ, et al. The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 28;100(22):13019–24.
  59. Strande JL, Hsu A, Su J, Fu X, Gross GJ, Baker JE. SCH 79797, a selective PAR1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol*. 2007 Jul;102(4):350–8.
  60. Sonin DL, Wakatsuki T, Routhu KV, Harmann LM, Petersen M, Meyer J, et al. Protease-activated receptor 1 inhibition by SCH79797 attenuates left ventricular remodeling and profibrotic activities of cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2013 Sep;18(5):460–75.
  61. Pawlinski R, Tencati M, Hampton CR, Shishido T, Bullard TA, Casey LM, et al. Protease-activated receptor-1 contributes to cardiac remodeling and hypertrophy. *Circulation*. 2007 Nov 13;116(20):2298–306.
  62. Strande JL. Letter by Strande Regarding Article “Protease-Activated Receptor-1 Contributes to Cardiac Remodeling and Hypertrophy.” *Circulation*. 2008 Jun 17;117(24):e495–e495.
  63. Antoniak S, Rojas M, Spring D, Bullard TA, Verrier ED, Blaxall BC, et al. Protease-Activated Receptor 2 Deficiency Reduces Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Nov;30(11):2136–42.
  64. Napoli C, Cicala C, Wallace JL, de Nigris F, Santagada V, Caliendo G, et al. Protease-activated receptor-2 modulates myocardial ischemia-reperfusion injury in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3678–83.
  65. Napoli C, De Nigris F, Cicala C, Wallace JL, Caliendo G, Condorelli M, et al. Protease-activated receptor-2 activation improves efficiency of experimental ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jun;282(6):H2004–2010.
  66. Strande JL, Hsu A, Su J, Fu X, Gross GJ, Baker JE. Inhibiting protease-activated receptor 4 limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts by unmasking adenosine signaling. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Mar;324(3):1045–54.
  67. Tamareille S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croué A, Henrion D, et al. RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2011 Nov;106(6):1329–39.
  68. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*. 2010 Aug 1;87(3):406–23.
  69. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124–36.
  70. Liu H, Wu R, Jia R-P, Zhong B, Zhu J-G, Yu P, et al. Ischemic preconditioning increases endothelial progenitor cell number to attenuate partial nephrectomy-induced ischemia/reperfusion injury. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e55389.
  71. Jin L-M, Liu Y-X, Zhou L, Xie H-Y, Feng X-W, Li H, et al. Ischemic preconditioning

- attenuates morphological and biochemical changes in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol*. 2010;77(3):136–46.
72. Peart J, Headrick JP. Adenosine-mediated early preconditioning in mouse: protective signaling and concentration dependent effects. *Cardiovasc Res*. 2003 Jun 1;58(3):589–601.
  73. Walsh SR, Tang TY, Kullar P, Jenkins DP, Dutka DP, Gaunt ME. Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2008 Nov;34(5):985–94.
  74. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Aug;285(2):H579–588.
  75. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med*. 2005 Feb;15(2):69–75.
  76. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic Postconditioning Protects Against Reperfusion Injury Via the SAFE Pathway. *Cardiovasc Res*. 2009 Nov 1;84(2):201–8.
  77. Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. 2005 Jul;65(3):361–7.
  78. Ma X, Zhang X, Li C, Luo M. Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction. *J Intervent Cardiol*. 2006 Oct;19(5):367–75.
  79. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L’Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005 Oct 4;112(14):2143–8.
  80. Thibault H, Piot C, Ovize M. Postconditioning in man. *Heart Fail Rev*. 2007 Dec;12(3-4):245–8.
  81. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993 Mar;87(3):893–9.
  82. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M, et al. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Apr;292(4):H1883–1890.
  83. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao Z-Q, et al. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol*. 2005 Sep;100(5):404–12.
  84. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, Kharbanda RK, et al. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation*. 2005 Jun 27;79(12):1691–5.
  85. Bøtker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bøttcher M, Kaltoft AK, Terkelsen CJ, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet*. 2010 Feb 27;375(9716):727–34.

86. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2013 Aug 17;382(9892):597–604.
87. De Paulis D, Chiari P, Teixeira G, Couture-Lepetit E, Abrial M, Argaud L, et al. Cyclosporine A at reperfusion fails to reduce infarct size in the in vivo rat heart. *Basic Res Cardiol*. 2013 Sep;108(5):379.
88. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev*. 2014 Oct;66(4):1142–74.
89. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet*. 2007 Oct 27;370(9597):1483–93.
90. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008 Jul 31;359(5):473–81.
91. Lønborg J, Vejstrup N, Kelbæk H, Bøtker HE, Kim WY, Mathiasen AB, et al. Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2012 Jun;33(12):1491–9.
92. Selker HP, Beshansky JR, Griffith JL, D'Agostino RB, Massaro JM, Udelson JE, et al. Study design for the Immediate Myocardial Metabolic Enhancement During Initial Assessment and Treatment in Emergency Care (IMMEDIATE) Trial: A double-blind randomized controlled trial of intravenous glucose, insulin, and potassium for acute coronary syndromes in emergency medical services. *Am Heart J*. 2012 Mar;163(3):315–22.
93. Ibanez B, Macaya C, Sánchez-Brunete V, Pizarro G, Fernández-Friera L, Mateos A, et al. Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial. *Circulation*. 2013 Oct 1;128(14):1495–503.
94. Ozden A, Sarioglu A, Demirkan NC, Bilgihan A, Düzcan E. Antithrombin III reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Res Exp Med Z Für Gesamte Exp Med Einschl Exp Chir*. 2001 Mar;200(3):195–203.
95. Schoots IG, Levi M, van Vliet AK, Maas AM, Roossink EHP, van Gulik TM. Inhibition of coagulation and inflammation by activated protein C or antithrombin reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med*. 2004 Jun;32(6):1375–83.
96. Wang J, Wang Y, Wang J, Gao J, Tong C, Manithody C, et al. Antithrombin is protective against myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Thromb Haemost*. 2013 Apr;n/a–n/a.
97. Ma Y, Wang J, Gao J, Yang H, Wang Y, Manithody C, et al. Antithrombin up-regulates AMP-activated protein kinase signalling during myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost*. 2014 Sep 18;113(1).
98. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Rehm M, Welsch U, Conzen P, et al. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2009 Jul 15;83(2):388–96.
99. Chappell D, Dörfler N, Jacob M, Rehm M, Welsch U, Conzen P, et al. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock* Augusta Ga.

2010 Aug;34(2):133–9.

100. Bouwens EAM, Stavenuiter F, Mosnier LO. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost JTH*. 2013 Jun;11(01):242–53.

101. Bae J-S, Yang L, Rezaie AR. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Feb 20;104(8):2867–72.

102. Mosnier LO, Sinha RK, Burnier L, Bouwens EA, Griffin JH. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5237–46.

103. Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ. Emerging paradigms of  $\beta$ -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci*. 2011 Sep;36(9):457–69.

104. Loubele STBG, Spek CA, Leenders P, van Oerle R, Aberson HL, Hamulyak K, et al. Activated Protein C Protects Against Myocardial Ischemia/ Reperfusion Injury via Inhibition of Apoptosis and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jul 1;29(7):1087–92.

105. Wang J, Yang L, Rezaie AR, Li J. Activated protein C protects against myocardial ischemic/reperfusion injury through AMP-activated protein kinase signaling. *J Thromb Haemost JTH*. 2011 Jul;9(7):1308–17.

106. Shibata M, Kumar SR, Amar A, Fernandez JA, Hofman F, Griffin JH, et al. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation*. 2001 Apr 3;103(13):1799–805.

107. Zlokovic BV, Zhang C, Liu D, Fernandez J, Griffin JH, Chopp M. Functional recovery after embolic stroke in rodents by activated protein C. *Ann Neurol*. 2005 Sep;58(3):474–7.

108. Kuriyama N, Isaji S, Hamada T, Kishiwada M, Ohsawa I, Usui M, et al. Activated protein C prevents hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2009 Feb;29(2):299–307.

109. Koudsi B, Yu CD, Ferguson EW, Miller GA, Merkel KD, Wun TC, et al. Prevention of spinal cord injury after transient aortic clamping with tissue factor pathway inhibitor. *Surgery*. 1996 Mar;119(3):269–74.

110. Yoshimura N, Kobayashi Y, Nakamura K, Yamagishi H, Oka T. The effect of tissue factor pathway inhibitor on hepatic ischemic reperfusion injury of the rat. *Transplantation*. 1999 Jan 15;67(1):45–53.

111. Ushigome H, Sano H, Okamoto M, Kadotani Y, Nakamura K, Akioka K, et al. The role of tissue factor in renal ischemic reperfusion injury of the rat. *J Surg Res*. 2002 Feb;102(2):102–9.

112. Black SC, Gralinski MR, Friedrichs GS, Kilgore KS, Driscoll EM, Lucchesi BR. Cardioprotective effects of heparin or N-acetylheparin in an in vivo model of myocardial ischaemic and reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1995 May 1;29(5):629–36.

113. Libersan D, Khalil A, Dagenais P, Quan E, Delorme F, Uzan A, et al. The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res*. 1998 Mar 1;37(3):656–66.

114. Friedrichs GS, Kilgore KS, Manley PJ, Gralinski MR, Lucchesi BR. Effects of heparin and N-acetyl heparin on ischemia/reperfusion-induced alterations in myocardial function in the rabbit isolated heart. *Circ Res*. 1994 Oct;75(4):701–10.

115. Habazettl H, Lindert J, Baeter S, Neumann K, Kuppe H, Kuebler WM, et al. Effects of unfractionated heparin, low molecular weight heparin and r-hirudin on leukocyte adhesion in ischemia/reperfusion. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*.

2004 Jul;15(5):375–81.

116. Karabiyikoglu M, Hua Y, Keep RF, Ennis SR, Xi G. Intracerebral hirudin injection attenuates ischemic damage and neurologic deficits without altering local cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Feb;24(2):159–66.

117. Thuillier R, Favreau F, Celhay O, Macchi L, Milin S, Hauet T. Thrombin inhibition during kidney ischemia-reperfusion reduces chronic graft inflammation and tubular atrophy. *Transplantation*. 2010 Sep 27;90(6):612–21.

118. Miyahara S, Kiryu J, Tsujikawa A, Katsuta H, Nishijima K, Miyamoto K, et al. Argatroban attenuates leukocyte- and platelet-endothelial cell interactions after transient retinal ischemia. *Stroke J Cereb Circ*. 2003 Aug;34(8):2043–9.

119. Hale SL, Kloner RA. Dabigatran treatment: effects on infarct size and the no-reflow phenomenon in a model of acute myocardial ischemia/reperfusion. *J Thromb Thrombolysis*. 2014 Jul 14;

120. Wienen W, Stassen J-M, Priepke H, Ries UJ, Huel N. Antithrombotic and anticoagulant effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran, and its oral prodrug, dabigatran etexilate, in a rabbit model of venous thrombosis. *J Thromb Haemost JTH*. 2007 Jun;5(6):1237–42.

121. Yazici S, Karahan O, Oral MK, Bayramoğlu Z, Unal M, Caynak B, et al. Comparison of Renoprotective Effect of Dabigatran With Low-Molecular-Weight Heparin. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. 2015 Feb 13;

122. Loubele S, Spek CA, Leenders P, Van Oerle R, Aberson HL, Van Der Voort D, et al. Active site inhibited factor VIIa attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Thromb Haemost*. 2009;7(2):290–8.

123. Golino P, Ragni M, Cirillo P, Scognamiglio A, Ravera A, Buono C, et al. Recombinant human, active site-blocked factor VIIa reduces infarct size and no-reflow phenomenon in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 May;278(5):H1507–1516.

124. Olanders K, Börjesson A, Zhao X, Andersson R. Effects of anticoagulant treatment on intestinal ischaemia and reperfusion injury in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005 Apr;49(4):517–24.

125. Weitz JI. New anticoagulants for treatment of venous thromboembolism. *Circulation*. 2004 Aug 31;110(9 Suppl 1):I19–26.

126. Walensi M, de Groot H, Schulz R, Hartmann M, Petrat F. Mesenteric ischemia-reperfusion injury: Clearly improved hemodynamics but only minor protection of the rat small intestine by (sub)therapeutic heparin sodium and enoxaparin doses. *J Surg Res*. 2013 Jan;179(1):e57–e69.

127. Abbruzzese TA, Albadawi H, Kang J, Patel VI, Yoo J-H, Lamuraglia GM, et al. Enoxaparin does not ameliorate limb ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2008 Jun 15;147(2):260–6.

128. Harada N, Okajima K, Uchiba M. Dalteparin, a low molecular weight heparin, attenuates inflammatory responses and reduces ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *Crit Care Med*. 2006 Jul;34(7):1883–91.

129. Frank RD, Schabbauer G, Holscher T, Sato Y, Tencati M, Pawlinski R, et al. The synthetic pentasaccharide fondaparinux reduces coagulation, inflammation and neutrophil accumulation in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Thromb Haemost JTH*. 2005 Mar;3(3):531–40.

130. Frank RD, Holscher T, Schabbauer G, Tencati M, Pawlinski R, Weitz JI, et al. A non-anticoagulant synthetic pentasaccharide reduces inflammation in a murine model of kidney ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost*. 2006 Dec;96(6):802–6.

131. Montaigne D, Marechal X, Lancel S, Decoster B, Asseman P, Neviere R. The synthetic pentasaccharide fondaparinux prevents coronary microvascular injury and myocardial dysfunction in the ischemic heart. *Thromb Haemost.* 2008 Nov;100(5):912–9.
132. Macchi L, Moussa WB, Guillou S, Tamareille S, Lamon D, Prunier D, et al. The synthetic pentasaccharide fondaparinux attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via STAT-3. *Shock* Augusta Ga. 2014 Feb;41(2):166–71.
133. Tillet S, Giraud S, Delpech PO, Thuillier R, Ameteau V, Goujon JM, et al. Kidney graft outcome using an anti-Xa therapeutic strategy in an experimental model of severe ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 2015 Jan;102(1):132–42.
134. Kono S, Yamashita T, Deguchi K, Omote Y, Yunoki T, Sato K, et al. Rivaroxaban and Apixaban Reduce Hemorrhagic Transformation After Thrombolysis by Protection of Neurovascular Unit in Rat. *Stroke.* 2014 Aug 1;45(8):2404–10.
135. Caliskan A, Yavuz C, Karahan O, Yazici S, Guclu O, Demirtas S, et al. Factor-Xa inhibitors protect against systemic oxidant damage induced by peripheral-ischemia reperfusion. *J Thromb Thrombolysis.* 2014 May;37(4):464–8.
136. Iba T, Aihara K, Yamada A, Nagayama M, Tabe Y, Ohsaka A. Rivaroxaban attenuates leukocyte adhesion in the microvasculature and thrombus formation in an experimental mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res.* 2014 Feb;133(2):276–80.
137. Dhainaut J-F, Laterre P-F, Janes JM, Bernard GR, Artigas A, Bakker J, et al. Drotrecogin alfa (activated) in the treatment of severe sepsis patients with multiple-organ dysfunction: data from the PROWESS trial. *Intensive Care Med.* 2003 Jun;29(6):894–903.
138. Lai PS, Matteau A, Iddriss A, Hawes JCL, Ranieri VM, Thompson BT. An updated meta-analysis to understand the variable efficacy of drotrecogin alfa (activated) in severe sepsis and septic shock. *Minerva Anesthesiol.* 2013 Jan;79(1):33–43.
139. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001 Oct 17;286(15):1869–78.
140. Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003 Jul 9;290(2):238–47.
141. Zhao Z-Q, Nakamura M, Wang N-P, Velez DA, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, et al. Dynamic Progression of Contractile and Endothelial Dysfunction and Infarct Extension in the Late Phase of Reperfusion. *J Surg Res.* 2000 Dec;94(2):133–44.
142. Van Hinsbergh VWM. Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012 Jan;34(1):93–106.
143. Von Drygalski A, Furlan-Freguia C, Ruf W, Griffin JH, Mosnier LO. Organ-specific protection against LPS-induced vascular leak is dependent on the endothelial protein C receptor (EPCR). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Apr;33(4):769–76.
144. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, et al. The Lectin-like Domain of Thrombomodulin Confers Protection from Neutrophil-mediated Tissue Damage by Suppressing Adhesion Molecule Expression via Nuclear Factor  $\kappa$ B and Mitogen-activated Protein Kinase Pathways. *J Exp Med.* 2002 Sep 2;196(5):565–77.
145. Wei H-J, Li Y-H, Shi G-Y, Liu S-L, Chang P-C, Kuo C-H, et al. Thrombomodulin domains attenuate atherosclerosis by inhibiting thrombin-induced endothelial cell activation. *Cardiovasc Res.* 2011 Nov 1;92(2):317–27.

146. Li Y-H, Kuo C-H, Shi G-Y, Wu H-L. The role of thrombomodulin lectin-like domain in inflammation. *J Biomed Sci.* 2012 Mar 27;19(1):34.
147. Herzog C, Lorenz A, Gillmann H-J, Chowdhury A, Larmann J, Harendza T, et al. Thrombomodulin's lectin-like domain reduces myocardial damage by interfering with HMGB1-mediated TLR2 signalling. *Cardiovasc Res.* 2014 Mar 1;101(3):400–10.
148. Kaneko H, Joubara N, Yoshino M, Yamazaki K, Mitumaru A, Miki Y, et al. Protective effect of human urinary thrombomodulin on ischemia- reperfusion injury in the canine liver. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur.* 2000;32(2):87–93.
149. Sharfuddin AA, Sandoval RM, Berg DT, McDougal GE, Campos SB, Phillips CL, et al. Soluble Thrombomodulin Protects Ischemic Kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Mar 1;20(3):524–34.
150. Wildhagen KCAA, Schrijver R, Beckers L, ten Cate H, Reutelingsperger CPM, Lutgens E, et al. Effects of exogenous recombinant APC in mouse models of ischemia reperfusion injury and of atherosclerosis. *PLoS ONE.* 2014;9(7):e101446.
151. Laurent M, Joimel U, Varin R, Cazin L, Gest C, Le-Cam-Duchez V, et al. Comparative study of the effect of rivaroxaban and fondaparinux on monocyte's coagulant activity and cytokine release. *Exp Hematol Oncol.* 2014;3(1):30.

## ANNEXE 1 : Tableau récapitulatif – Anticoagulants et IR

| Anticoagulants |           |                          |             | Espèce       | Modèle                 | Résultat                            | Référence                         |       |
|----------------|-----------|--------------------------|-------------|--------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------|
| Anti-IIa       | Indirects | Héparine non fractionnée |             | Lapin        | Cœur isolé             | Cardioprotection                    | (114)                             |       |
|                |           |                          |             | Chien        | IR myocardique         | Cardioprotection                    | (112)                             |       |
|                |           |                          |             |              |                        | Pas de cardioprotection             | (113)                             |       |
|                |           |                          |             | Rat          | IR musculaire          | Diminution adhésion leucocytaire    | (115)                             |       |
|                | Directs   | Hirudine                 |             | Lapin        | IR myocardique         | Cardioprotection                    | (52)                              |       |
|                |           |                          |             | Rat          | IR cérébrale           | Neuroprotection                     | (116)                             |       |
|                |           | Mélagatran               |             | Porc         | Transplantation rénale | Néphroprotection                    | (117)                             |       |
|                |           | Argatroban               |             | Rat          | Ischémie rétinienne    | Neuroprotection                     | (118)                             |       |
|                |           | Dabigatran               |             | Lapin        | IR myocardique         | Pas de cardioprotection             | (119)                             |       |
|                |           |                          |             | Rat          | IR rénale              | Diminution peroxydation lipidique   | (121)                             |       |
| Anti-Xa        | Indirects | HBPM                     | Enoxaparine | Chien        | IR myocardique         | Cardioprotection                    | (113)                             |       |
|                |           |                          |             | Rat          | IR mésentérique        | Amélioration de l'hémodynamique     | (126)                             |       |
|                |           |                          |             | Souris       | IR membre              | Pas de protection                   | (127)                             |       |
|                |           |                          |             | Daltéparine  | Rat                    | IR hépatique                        | Hépatoprotection                  | (128) |
|                |           | FDX                      |             | Souris       | IR rénale              | Néphroprotection                    | (129) (130)                       |       |
|                |           |                          |             |              | IR myocardique         | Pas de cardioprotection             | (96)                              |       |
|                |           |                          |             | Rat          | IR mésentérique        | Diminution MIP-2 plasmatique        | (124)                             |       |
|                |           |                          |             |              | Cœur isolé             | Cardioprotection                    | (131)                             |       |
|                |           |                          |             |              | IR myocardique         | Cardioprotection                    | (132)                             |       |
|                |           |                          |             | Porc         | Transplantation rénale | Néphroprotection                    | (133)                             |       |
|                |           | Directs                  | Rivaroxaban |              | Rat                    | IR cérébrale                        | Neuroprotection                   | (134) |
|                |           |                          |             |              | Souris                 | Ischémie périphérique               | Diminution peroxydation lipidique | (135) |
|                |           |                          |             |              |                        | Thrombose veine mésentérique        | Diminution adhésion leucocytaire  | (136) |
|                | Apixaban  |                          | Rat         | IR cérébrale | Neuroprotection        | (134)                               |                                   |       |
| Anti-VIIa      |           | FVIIai                   |             | Lapin        | IR myocardique         | Cardioprotection                    | (123)                             |       |
|                |           |                          |             | Rat          | IR mésentérique        | Diminution perméablilité vasculaire | (124)                             |       |
|                |           | ASIS                     |             | Souris       | IR myocardique         | Cardioprotection                    | (122)                             |       |
| Anti-FT        |           | Anticorps monoclonal     |             | Lapin        | IR myocardique         | Cardioprotection                    | (52)                              |       |

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1: Echanges ioniques lors de l'ischémie myocardique. Adapté d'après (11).....                                                               | 15 |
| Figure 2: Prise en charge des SCA (adapté de l'HAS).....                                                                                           | 19 |
| Figure 3: Prise en charge des SCA ST+ ou STEMI (HAS) .....                                                                                         | 19 |
| Figure 4: Impact de la reperfusion sur la diminution de la taille d'infarctus (21).....                                                            | 20 |
| Figure 5: Echanges ioniques lors de la reperfusion myocardique. Adapté d'après (11) .....                                                          | 22 |
| Figure 6: Signalisation cellulaire induite par l'activation des TLRs (36).....                                                                     | 24 |
| Figure 7: Activation des PARs par les sérines protéases de la coagulation .....                                                                    | 27 |
| Figure 8: Représentation schématique des voies de survie cellulaire RISK et SAFE. Adapté d'après (68) .....                                        | 29 |
| Figure 9: Protocole expérimental Projet 1 .....                                                                                                    | 43 |
| Figure 10: Protocole expérimental Projet 2.....                                                                                                    | 44 |
| Figure 11 : Expression protéique des voies de signalisation pro-inflammatoire à deux heures de reperfusion (n=4).....                              | 50 |
| Figure 12 : Expression protéique du facteur tissulaire et de ICAM-1 à deux heures de reperfusion (n=4) .....                                       | 51 |
| Figure 13 : Evaluation de l'infiltration leucocytaire après coloration à l'HE (n=4).....                                                           | 52 |
| Figure 14 : Expression relative de l'ARNm de l'EPCR, la TM et le FT à 30 minutes de reperfusion (A) et à deux heures de reperfusion (B) (n=7)..... | 53 |
| Figure 15 : Expression protéiques des voies de survie cellulaire à deux heures de reperfusion : AKT et ERK1/2 (n=6).....                           | 54 |
| Figure 16 : Expression protéique des voies de survie cellulaire à deux heures de reperfusion : GSK-3 $\beta$ et STAT3 (n=6) .....                  | 55 |
| Figure 17 : Evaluation de la taille d'infarctus à deux heures de reperfusion (n =5).....                                                           | 56 |

## **LISTE DES TABLEAUX**

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1: Agents pharmacologiques cardioprotecteurs ayant démontré leur efficacité à la phase aigue de la reperfusion chez l'homme (88) ..... | 32 |
| Tableau 2: Séquences des amorces utilisées avec taille du fragment amplifié .....                                                              | 46 |

## RESUME

**Introduction :** Le fondaparinux (FDX) est un anticoagulant agissant par inhibition indirecte du facteur Xa. Cette molécule possède un effet cardioprotecteur *in vivo* dans un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique chez le rat, entraînant une diminution significative de la taille d'infarctus à deux heures de reperfusion. Cet effet est lié à l'activation précoce de la voie de survie cellulaire SAFE. Notre objectif est d'étudier si la cardioprotection du FDX est en lien avec un effet anti-inflammatoire et protecteur de l'endothélium à la phase aigue de la reperfusion, ainsi qu'avec l'immunité innée via l'interleukine-33.

**Méthodes :** Des rats Wistar mâles ont été soumis à 40 minutes d'ischémie myocardique suivies de 30 minutes ou deux heures de reperfusion. Dans un premier temps, les rats ont été randomisés entre quatre groupes en fonction du délai de reperfusion et de l'administration ou non de FDX. Les cœurs étaient prélevés à la fin de la reperfusion dans chacun des groupes. Nous avons étudié au niveau myocardique l'expression de l'ARNm de marqueurs endothéliaux (thrombomoduline, Récepteur endothélial à la protéine C (EPCR), facteur tissulaire) à 30 minutes de reperfusion ainsi que l'expression protéique d'ICAM-1, du facteur tissulaire (FT) et des voies de signalisation cellulaire pro-inflammatoire (NFκB et JNK) à deux heures de reperfusion. L'infiltration leucocytaire a été évaluée par histochimie (coloration à l'hématoxyline-éosine) à deux heures de reperfusion. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'interleukine-33 (IL-33) dans le même modèle. Les rats ont également été randomisés en quatre groupes en fonction du délai de reperfusion et de l'injection d'IL-33 ou non. Après 30 minutes de reperfusion, l'expression protéique myocardique des voies de survie cellulaire était étudiée. Après deux heures de reperfusion, la taille finale d'infarctus était évaluée.

**Résultats :** Aucune différence n'a été mise en évidence concernant l'expression des voies de signalisation pro-inflammatoire, d'ICAM-1 et du FT à deux heures de reperfusion. Il n'y a pas d'effet du fondaparinux sur l'infiltration leucocytaire à deux heures de reperfusion. A 30 minutes de reperfusion, on observe une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de la thrombomoduline et de l'EPCR dans le groupe fondaparinux, sans augmentation de l'expression de l'ARNm du facteur tissulaire. A deux heures de reperfusion, cette augmentation n'est plus retrouvée. Concernant l'effet de l'IL-33, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet cardioprotecteur de cette molécule à la dose utilisée ni d'activation des voies de survie cellulaire.

**Discussion :** A deux heures de reperfusion, le FDX ne posséderait pas d'effet anti-inflammatoire pouvant expliquer son effet cardioprotecteur. Nos résultats suggèrent que le fondaparinux posséderait un effet protecteur de l'endothélium à 30 minutes de reperfusion, par l'augmentation transitoire de l'expression de l'ARNm de la thrombomoduline et l'EPCR. Le lien avec l'immunité innée via l'IL-33 reste encore à préciser.

**Mots-clés :** Fondaparinux – Ischémie-reperfusion myocardique – Inflammation – Endothélium – Interleukine-33 – Immunité innée

## SERMENT DE GALIEN

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

**D'**honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

**En** aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagements.