

---

## **Exposition prolongée à de faibles concentrations de CO et sensibilité du myocarde à l'IR**

---

L'exposition prolongée à de faibles concentrations de CO, telles que retrouvées dans le cadre d'une pollution urbaine, est reconnue comme étant à l'origine d'un remodelage pathologique cardiomyocytaire (Bye et al., 2008 ; Andre et al., 2010) caractérisé notamment par une altération de la régulation des mouvements du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. L'hyperphosphorylation PKA-dépendante des RyR-2 associée à une diminution de l'expression des pompes SERCA-2a au niveau du RS semblent être à l'origine de ce phénomène avec pour conséquence une surcharge sarcoplasmique diastolique en  $Ca^{2+}$ . Ces altérations cellulaires, également retrouvées dans notre travail, sont discutées par Andre et al., (2010) comme pouvant résulter d'un stress oxydant exacerbé chez la population de rats CO. En effet, l'exposition prolongée au CO est à l'origine d'une baisse marquée des défenses enzymatiques antioxydantes associée à une modification du statut redox cardiomyocytaire (Andre et al., 2010 ; étude n°1). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les protéines régulant l'homéostasie calcique intracellulaire sont aujourd'hui largement décrites comme étant « rédox » sensibles (Zima et Blatter, 2006). Ainsi, une augmentation du stress oxydant cellulaire est rapporté comme étant à l'origine d'une hyperphosphorylation PKA-dépendante des canaux RyR-2, avec comme conséquence principale une fuite de  $Ca^{2+}$  du RS (Gyorke et Carnes, 2008 ; Sun et al., 2008) et une oxydation des pompes SERCA-2a, à l'origine d'un moindre recaptage du  $Ca^{2+}$  par le RS (Kobayashi et al., 2007 ; Kuster et al., 2010). Ainsi, en condition de stress oxydant, la fuite de  $Ca^{2+}$  (hyperphosphorylation des RyR-2) associée à l'altération du repompage calcique (oxydation des SERCA-2a), se traduit par une baisse de la charge calcique du RS et une augmentation de la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$ .

Un premier résultat majeur de ce travail de thèse (étude n°1) est que, le remodelage pathologique des myocytes cardiaques, résultant d'une exposition prolongée à une pollution de type environnementale urbaine au CO est à l'origine d'une plus grande vulnérabilité du cœur au stress d'IR. Celle-ci est caractérisée, dans notre travail, par une sévérité accrue des arythmies de reperfusion, une augmentation de la mort cellulaire au cours de la reperfusion et une moindre récupération de la fonction contractile cardiaque. L'aggravation des lésions d'IR chez la population de rats CO semble pouvoir être expliquée dans notre travail par i) une diminution des capacités de défenses enzymatiques antioxydantes, et ii) une surcharge calcique cellulaire, certainement à l'origine d'une instabilité membranaire, confirmant ainsi notre hypothèse impliquant le stress oxydant dans les désordres observés.

L'augmentation massive de la production de RLO au moment de la reperfusion post-ischémique, joue un rôle majeur dans le développement des lésions de reperfusion (Zweier, 1988 ; Vanden Hoek et al., 1996). Il est ainsi largement reconnu qu'une altération du statut enzymatique antioxydant est à l'origine d'une exacerbation des lésions liées au stress oxydant au cours de la reperfusion post-ischémique (Yoshida et al., 2000 ; Marczin et al., 2003 ; Van Remmen et al., 2004). Dans notre travail, l'incubation d'un antioxydant non spécifique (NAC) au cours du protocole d'A/R cellulaires, permet de limiter la sévérité des atteintes fonctionnelles cardiomyocytaires.

Les effets protecteurs de l'incubation d'un antioxydant non spécifique semblent pouvoir être expliqués, dans ce travail, par une normalisation de la surcharge cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de la reperfusion. En effet, à l'étage cellulaire, l'état pro-oxydant est associé chez les rats exposés au CO à une altération de la régulation des mouvements de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires, ayant comme conséquence majeure une surcharge cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$ . Le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique dans la sévérité des lésions de reperfusion est aujourd'hui largement décrit (Netticadan et al., 1999 ; Abdallah et al., 2006 ; Venetucci et al., 2008). Ainsi, cette

surcharge ionique, induite au cours du phénomène d'IR est reconnue comme pouvant être à l'origine de modifications électrophysiologiques favorisant l'apparition de troubles du rythmes (Marban et al., 1994 ; Antoons et Sipido 2008), d'altérations fonctionnelles contractiles (Valverde et al., 2010), mais également de l'initiation de processus conduisant à la mort de la cellule par nécrose ou apoptose, via différents mécanismes tels que l'ouverture du mPTP (Crompton, 1999), une hypercontracture myocytaire associée à une peroxydation des phospholipides membranaires (Ganote, 1983) ou encore l'activation de différentes protéases à activité  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes telles que les calpaines (Liu et al., 2004). Dès lors, il semble que chez la population de rats CO, l'exacerbation, stress oxydant-dépendante, de la surcharge cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de la reperfusion myocardique soit impliquée de manière majeure dans la sensibilité accrue du cœur au syndrome d'IR.

Un résultat original de ce travail de thèse est que l'exposition au CO, caractérisée à l'échelle cellulaire par un état pro-oxydant, mais aussi pro-inflammatoire (identifié ici par l'expression myocardique de  $\text{TNF-}\alpha$ ), est à l'origine d'une surexpression tissulaire de l'isoforme inductible de la NOS (iNOS) (étude n°2). Cette surexpression de iNOS a pour conséquence principale une surproduction de NO au niveau myocardique chez les rats CO. Le rôle de la iNOS au cours de l'IR myocardique est encore sujet à controverses. En effet, certaines études mettent en avant le rôle de la iNOS dans le préconditionnement myocardique à l'IR (Zhao et al., 1997 ; Imagawa et al., 1999), alors que dans un grand nombre de travaux l'expression tissulaire de cette enzyme est associée à une aggravation des lésions d'IR (Wildhirt et al., 1997 ; Wildhirt et al., 1999 ; Wang et al., 2007 ; Ji et al., 2010 ). La iNOS est une enzyme exprimée dans des conditions pathologiques sous l'influence de produits bactériens, de cytokines pro-inflammatoires ou encore du stress oxydant (Xie et al., 1994 ; Zhen et al., 2008). Contrairement aux isoformes constitutifs de la NOS, la synthèse de NO par la iNOS n'est pas régulée de façon post-traductionnelle et est  $\text{Ca}^{2+}$  indépendante (Cho et al.,

1992 ; Xia, 2007). Ainsi l'expression tissulaire de cet isoforme peut être à l'origine d'une synthèse de NO jusqu'à 100 fois supérieure à celle induite par les isoformes constitutifs (Pacher et al., 2007). Bien que le NO soit reconnu comme bénéfique et cardioprotecteur dans des conditions physiologiques, il peut s'avérer délétère lorsqu'il est produit en trop grande quantité (Shah et MacCarthy, 2000). En effet, il a été démontré que le NO libre, lorsque synthétisé en grande quantité par la iNOS, a tendance en condition pro-oxydante, à réagir avec l' $O_2^{\cdot-}$  pour former du  $ONOO^-$  (Mungrue et al., 2002 ; Billiar, 1995). Cette réaction se fait à une vitesse 5 fois supérieure à celle de la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$  par la SOD (Pacher et al., 2007). Le  $ONOO^-$  ainsi produit est un EROA hautement réactif, reconnu comme étant le principal responsable d'un grand nombre de réactions cytotoxiques impliquées dans les lésions du tissu myocardique lors de l'IR (Yasmin et al. 1997 ; Wang et al., 2007 ; Ji et al., 2010). Plusieurs études ont notamment rapporté un rôle délétère majeur du  $ONOO^-$  sur les protéines régulatrices des mouvements calciques intracellulaire telles que les SERCA-2a (Lokuta et al., 2005) et les RyR-2 (Stoyanovsky et al., 1997 ; Xu et al., 1998) contribuant ainsi à perturber l'homéostasie calcique au cours de l'IR. Par conséquent, la potentielle formation en excès de  $ONOO^-$  chez la population de rats CO, lié à la surproduction de NO par la iNOS, pourrait, également contribuer à l'exacerbation des lésions cellulaires au cours de l'IR. Cette hypothèse est en partie confirmée lors de la phase cellulaire de notre étude n°2, puisque l'inhibition des précurseurs de la formation de  $ONOO^-$ ,  $O_2^{\cdot-}$  et NO, par l'incubation respective de NAC et de SMT, a permis de normaliser la surcharge calcique cytosolique consécutive à l'A/R et ainsi de réduire la sensibilité des cardiomyocytes de rats CO au stress d'A/R. A l'échelle de l'organe isolé, il est d'ailleurs intéressant de noter que l'inhibition spécifique et exclusive de la iNOS au cours de l'IR permet de normaliser la sévérité des lésions de reperfusion post-ischémique chez les rats CO au niveau des rats Ctrl. Ce résultat

suggère donc un rôle majeur de la surproduction iNOS-dépendante de NO au cours de l'IR dans la physiopathologie d'une exposition de type citadine au CO.

*La surproduction de NO par la iNOS myocardique, en condition pro-oxydante exacerbée (baisse de l'activité enzymatique antioxydante), semble jouer un rôle majeur dans les troubles de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire. Ce phénomène, à l'origine d'une surcharge calcique cytosolique est rapporté dans ce travail comme étant responsable de la plus grande vulnérabilité du cœur à un stress d'IR chez des rats exposés pendant 4 semaines à une pollution de type environnementale urbaine au CO, (Figure 1).*

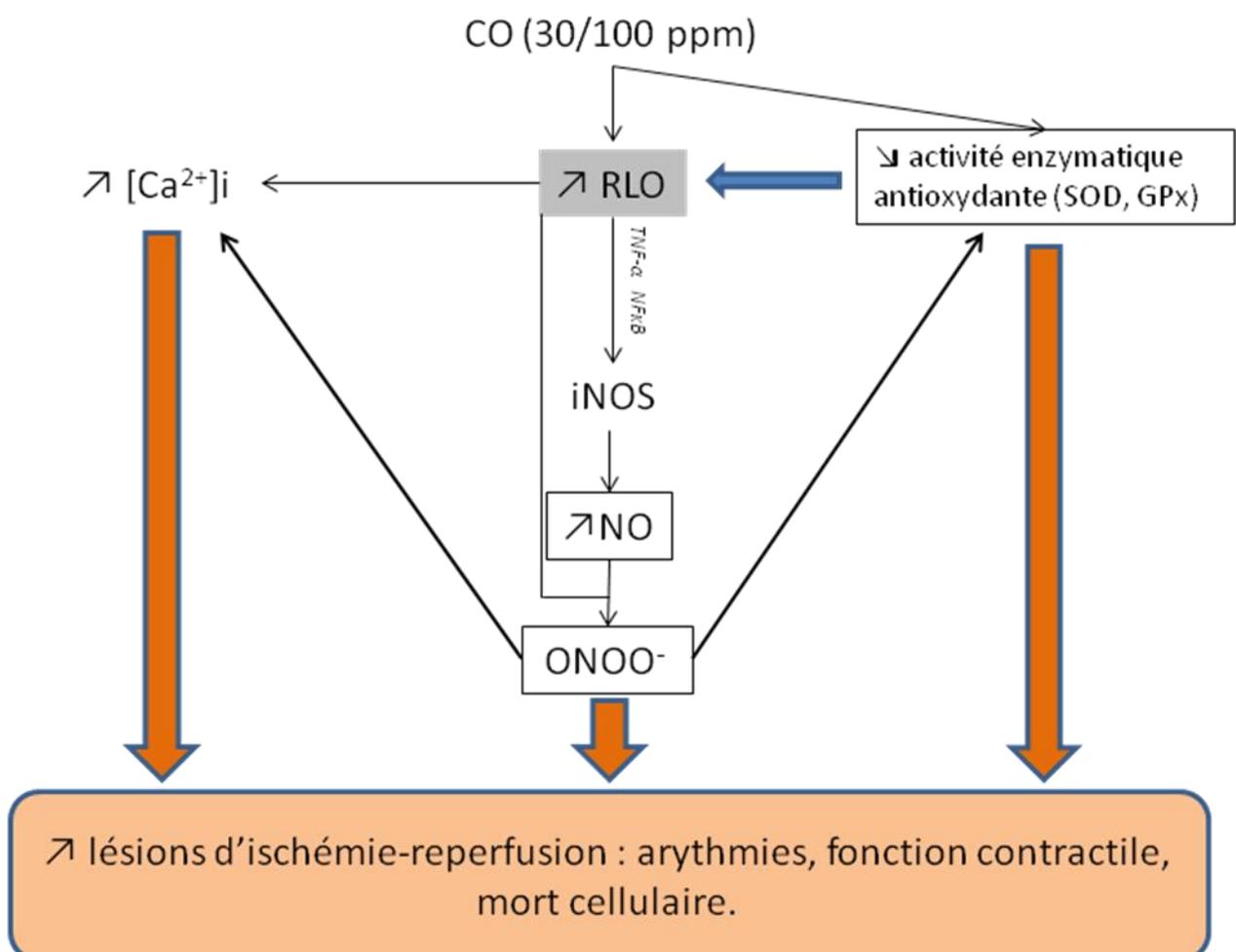


Figure 31 : Mécanismes délétères du CO entraînant le développement d'un phénotype cellulaire pathologique et à l'origine d'une plus grande sensibilité à l'IR.

## **II. Entraînement en endurance et cardioprotection**

Comme discuté préalablement dans ce travail, le stress environnemental lié à l'exposition au CO est à l'origine d'un remodelage pathologique cardiomyocytaire, caractérisé notamment par i) une hausse du stress oxydant cellulaire et ii) une altération de l'homéostasie calcique intracellulaire. Ce remodelage cellulaire consécutif à 4 semaines d'exposition au CO semble jouer un rôle majeur dans la plus grande sensibilité du myocarde au syndrome d'IR. Dès lors, un autre objectif de ce travail de thèse était d'évaluer les effets potentiellement cardioprotecteurs d'un exercice physique régulier sur le remodelage pathologique cardiomyocytaire et sur la sensibilité du myocarde de rats CO au syndrome d'IR. L'exercice est en effet classiquement reconnu comme étant responsable d'une amélioration du statut enzymatique antioxydant et d'une amélioration/restauration des mouvements intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  (Powers et al., 2008 ; Kemi et Wisloff, 2010). Dans notre travail, la pratique d'une activité physique régulière, préalablement à la période d'exposition environnementale, a permis de prévenir les effets délétères du CO sur la régulation de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire. En effet, alors que l'on observe au niveau des cardiomyocytes de rats exposés au CO une surcharge calcique cytosolique expliquée notamment par une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du RS et un moindre repompage de cet ion, conséquence d'une baisse d'expression des pompes SERCA-2a ; les rats CO entraînés en endurance, présentent un phénotype cellulaire sain, caractérisé notamment par une concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  normalisée. Ce résultat est expliqué dans ce travail par une restauration de l'expression des pompes SERCA-2a permettant ainsi une restauration de la séquestration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, puisque dans les différentes études centrées sur les effets bénéfiques de l'exercice chez des populations présentant des pathologies cardiaques, il est classiquement rapporté une

normalisation et/ou une amélioration des mouvements calciques intracellulaires à l'issue d'une période d'activité physique régulière (Wisloff et al., 2001 ; Kemi et al., 2008 ; Kemi et Wisloff, 2010). Dans ce travail, nous avons également rapporté une prévention des effets délétères du CO sur l'activité enzymatique antioxydante se traduisant par une normalisation de l'activité de la SOD et de la GPx chez les rats CO entraînés. Cette amélioration du statut enzymatique antioxydant suite à un entraînement en endurance pourrait être à l'origine de la prévention des altérations calciques (French et al., 2008). Toutefois, on ne peut écarter de potentiels effets bénéfiques directs de l'entraînement sur les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique (Wisloff et al., 2001 ; Kemi et al., 2005).

Les effets protecteurs de l'exercice sur le remodelage phénotypique des cardiomyocytes de rats exposés au CO sont associés à une normalisation de la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR, constituant un autre résultat majeur de ce travail de thèse. En effet nous avons pu observer, dans ce modèle, une diminution de la sévérité des arythmies de reperfusion et de la mort cellulaire chez les rats exposés au CO et préalablement entraînés en endurance. Comme discuté au chapitre précédent, la sévérité accrue des lésions de reperfusion semble être en grande partie liée aux troubles de l'homéostasie calcique cellulaire (Netticadan et al., 1999 ; Abdallah et al., 2006 ; Venetucci et al., 2008) et à l'altération du statut antioxydant myocardique (Dhalla et al., 1999 ; Dhalla et al., 2000). Dans la littérature, les effets protecteurs de l'exercice permettant de réduire la sévérité des lésions d'IR sont largement décrits (Yamashita et al., 1999 ; Powers et al., 2008). Ces effets sont liés à une amélioration des capacités de défenses enzymatiques antioxydantes, dont notamment la SOD (Powers et al., 2008 ; French et al., 2008) et la GPx (Lew et Quintanilha, 1991 ; Kavazis, 2009), résultats également retrouvés dans ce travail. Les effets cardioprotecteurs de cette normalisation des défenses enzymatiques antioxydantes pourraient donc être directs (Powers et al., 2007), via un meilleur piégeage des RLO au cours de la reperfusion post-ischémique et

donc une meilleure préservation de l'intégrité cellulaire ; mais également indirects via une préservation des effets délétères du stress oxydant sur les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique (French et al., 2008). En effet, il a été mis en évidence dans plusieurs études qu'un entraînement en endurance permettait de réduire la sévérité des lésions d'IR, via notamment une meilleure préservation des mouvements calciques au cours du cycle cardiaque pendant l'IR (French et al., 2006 ; French et al., 2008). Il semble donc, que la normalisation de la sévérité des lésions d'IR chez la population de rats CO préalablement entraînés puisse être expliquée par une préservation du statut enzymatique antioxydant permettant potentiellement une protection des protéines impliquées dans la régulation des mouvements de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, dont les pompes SERCA-2a.

*Un résultat majeur de ce travail est qu'une stratégie de cardioprotection par un exercice d'intensité modérée pratiqué de manière régulière, permet de prévenir le remodelage pathologique cardiomyocytaire, via notamment une prévention des effets délétères du CO sur les capacités de défenses enzymatiques antioxydantes myocardiques et une normalisation de la concentration de  $Ca^{2+}$  cytosolique basale. Cette normalisation du phénotype cellulaire myocardique a notamment permis de prévenir la plus grande vulnérabilité du myocarde au syndrome d'IR.*

### **III. Conclusion**

Ce travail de doctorat a permis de mettre en avant les effets aggravants d'une exposition de type environnementale urbaine au CO sur la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR. En effet, alors qu'il avait été clairement rapporté dans une étude préalable que

ce type de stress environnemental était à l'origine d'un remodelage pathologique cardiomyocytaire (Andre et al., 2010), les conséquences de ce phénotype cellulaire altéré sur la cohérence fonctionnelle myocardique ne semblait pas apparaître comme étant majeur. Dès lors, nos travaux mettant en évidence des effets potentiellement aggravants du CO sur le pronostic vital post-infarctus, permettent, au moins en partie, de mieux appréhender la relation mise en avant dans les enquêtes épidémiologiques, entre pollution citadine au CO et morbi-mortalité cardiovasculaire (Samoli et al., 2008 ; Stieb et al., 2009 ; Bell et al., 2009). Par ailleurs, ce travail de thèse a permis, via l'étude des différents mécanismes potentiellement impliqués dans ce phénomène, de mettre en avant des cibles cellulaires d'intérêts dans la mise en place de stratégies de prévention des effets cardiovasculaires néfastes d'une pollution de type urbaine au CO. Parmi ces cibles nous pouvons notamment retenir les protéines de l'homéostasie calcique, le statut enzymatique antioxydant et la iNOS. Ainsi, de nouvelles études pharmacologiques, permettant notamment de renforcer les défenses antioxydantes et/ou d'inhiber spécifiquement la iNOS au cours de la période d'exposition au CO, semble être nécessaires afin d'améliorer la compréhension des effets physiopathologiques cardiovasculaires d'une exposition de type environnementale urbaine au CO.

Enfin, un autre résultat majeur de ce travail est qu'une activité physique régulière même pratiquée à intensité modérée, telle que conseillée par l'OMS (OMS et FIMS, 1995), permet de prévenir le remodelage pathologique des cardiomyocytes de rats exposés au CO et ainsi d'améliorer le pronostic vital post-infarctus. Ces résultats méritent d'être confirmés, *in-vivo* sur un modèle de rongeur, puis chez l'homme, et doivent donc être pris avec beaucoup de précautions. Néanmoins, il semblerait que chez les sujets exposés de manière prolongée et régulière à une pollution atmosphérique urbaine, notamment au CO, la pratique régulière d'un exercice physique à intensité modérée en environnement sain non pollué soit particulièrement

pertinente afin de lutter contre le développement d'un phénotype cardiaque à risque, voire pathologique.

# Perspectives

Les résultats présentés dans ce travail suggèrent une potentielle implication de la formation de ONOO<sup>-</sup> consécutive à la surproduction de NO par la iNOS, dans les effets délétères du CO. Ainsi, une première perspective de ce travail de thèse serait de tenter de mieux comprendre l'implication, dans notre modèle, de la formation de ONOO<sup>-</sup> dans la sévérité accrue des lésions d'IR. Ainsi il serait intéressant de pouvoir comparer la production de ONOO<sup>-</sup> entre les cœurs de rats CO et de rats Ctrl au cours de l'IR. Pour cela une évaluation de la formation de dityrosine comme le préconise Yasmin et al., (1996), permettrait d'évaluer de façon indirecte la synthèse de ONOO<sup>-</sup> dans le myocarde. De plus, nous avons rapporté dans notre travail que la surproduction iNOS-dépendante de NO, certainement à l'origine de la formation de ONOO<sup>-</sup>, était certainement responsable de la surcharge calcique exacerbée au cours de l'IR chez la population de rats CO. Ainsi, il semblerait particulièrement pertinent, dans ce modèle, d'évaluer l'état de nitrosylation des protéines régulatrices de l'homéostasie calcique en condition basale mais aussi au cours de l'IR. Enfin, afin d'évaluer l'implication du ONOO<sup>-</sup> dans l'aggravation des lésions de reperfusion chez notre modèle de rats exposés au CO, il apparaît essentiel de pouvoir inhiber les effets du peroxy-nitrite au cours de l'IR. L'acide urique était à ce jour décrit comme un des seuls inhibiteurs du ONOO<sup>-</sup>, néanmoins son action est rapporté comme étant peu efficace (Kuzkaya et al., 2005). Récemment, depuis les travaux de Jiao et al., (2009), l'INO-4885 apparaît comme un catalyseur efficace de la décomposition du ONOO<sup>-</sup>, notamment au cours de l'IR. Afin d'évaluer l'implication de la formation de ONOO<sup>-</sup> dans la sensibilité accrue du myocarde au syndrome d'IR chez la population de rats CO, il semblerait intéressant de pouvoir réaliser ce même protocole d'IR en présence ou non d'INO-4885.

Dans ce travail de thèse nous avons également mis en évidence qu'un entraînement en endurance, préalable à la période d'exposition au CO, permettait de prévenir le

développement des altérations du statut enzymatique antioxydant et de la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, nous n'avons pas pu évaluer, dans ce travail de thèse, les effets de l'exercice sur l'expression myocardique de la iNOS. Etant donné l'impact de la surproduction iNOS-dépendante de NO sur la régulation de l'homéostasie calcique, une des hypothèses de ce travail serait que les effets cardioprotecteurs de l'exercice, dans notre modèle de rats exposés au CO, puissent être liés à une régulation/prévention de l'expression de la iNOS dans le tissu cardiaque. Il semblerait donc intéressant d'évaluer, chez la population de rats exposés au CO et préalablement entraînés, la production de NO par le tissu cardiaque et l'expression induite de cet isoforme de la NOS.

Enfin, dans notre 3<sup>ème</sup> étude, les bénéfices d'un entraînement en endurance, conduit en environnement sain ont été mis en évidence. La pratique d'une activité physique régulière en environnement non pollué a permis de prévenir le développement du phénotype cellulaire pathologique et ainsi de prévenir l'exacerbation des lésions d'IR chez les rats exposés au CO. Cette étude semble donc favorable à la pratique sportive régulière dans un but de cardioprotection. Cependant, de nombreuses personnes pratiquent une activité physique en milieu pollué, notamment au CO. Il semblerait donc intéressant par la suite de conduire une étude s'intéressant aux effets d'une activité physique régulière, en milieu pollué au CO, sur le remodelage phénotypique cellulaire et la sensibilité du myocarde à l'IR.

# Bibliographie

**Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schluter KD, Schafer M, Piper HM and Schafer C.** Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca<sup>2+</sup> storage. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 346-353.

**Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.

**Amrani M, Chester AH, Jayakumar J, Schyns CJ and Yacoub MH.** L-arginine reverses low coronary reflow and enhances postischaemic recovery of cardiac mechanical function. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 200-204.

**Andre L, Boissiere J, Reboul C, Perrier R, Zalvidea S, Meyer G, Thireau J, Tanguy S, Bideaux P, Hayot M, Boucher F, Obert P, Cazorla O and Richard S.** Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 587-595.

**Antoons G and Sipido KR.** Targeting calcium handling in arrhythmias. *Europace* 2008; 10: 1364-1369.

**Arner ES, Zhong L and Holmgren A.** Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1999; 300: 226-239.

**Ascensao A, Magalhaes J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Oliveira PJ and Duarte JA.** Endurance training limits the functional alterations of rat heart mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation. *Int J Cardiol* 2006; 109: 169-178.

**Atalay M and Sen CK.** Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 874: 169-177.

**Avkiran M.** Protection of the ischaemic myocardium by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors: potential mechanisms of action. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 306-311.

**Bagchi M, Prasad MR, Engelman RM and Das DK.** Effects of free radicals on the fluidity of myocardial membranes. *Free Radic Res Commun* 1989; 7: 375-380.

**Bak I, Papp G, Turoczi T, Varga E, Szendrei L, Vecsernyes M, Joo F and Tosaki A.** The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 639-648.

**Bak I, Szendrei L, Turoczi T, Papp G, Joo F, Das DK, de Leiris J, Der P, Juhasz B, Varga E, Bacskay I, Balla J, Kovacs P and Tosaki A.** Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J* 2003; 17: 2133-2135.

**Bak I, Varadi J, Nagy N, Vecsernyes M and Tosaki A.** The role of exogenous carbon monoxide in the recovery of post-ischemic cardiac function in buffer perfused isolated rat hearts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2005; 51: 453-459.

**Balligand JL, Feron O and Dessy C.** eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* 2009; 89: 481-534.

**Balzan MV, Cacciottolo JM and Mifsud S.** Unstable angina and exposure to carbon monoxide. *Postgrad Med J* 1994; 70: 699-702.

**Barbe C, Rochetaing A and Kreher P.** Ischemic tolerance of the heart by adaptation to chronic hypoxia is suppressed by high subchronic carbon monoxide exposure. *Inhal Toxicol* 2001; 13: 219-232.

**Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA and Bernardi P.** Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 2005; 280: 18558-18561.

**Becker LC and Ambrosio G.** Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis* 1987; 30: 23-44.

**Beckman JS and Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-1437.

**Beers RF, Jr. and Sizer IW.** A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952; 195: 133-140.

**Bell ML, Peng RD, Dominici F and Samet JM.** Emergency Hospital Admissions for Cardiovascular Diseases and Ambient Levels of Carbon Monoxide. Results for 126 United States Urban Counties, 1999-2005. *Circulation* 2009.

**Benjamin IJ and McMillan DR.** Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998; 83: 117-132.

**Berger A, Zareba W, Schneider A, Ruckerl R, Ibald-Mulli A, Cyrus J, Wichmann HE and Peters A.** Runs of ventricular and supraventricular tachycardia triggered by air pollution in patients with coronary heart disease. *J Occup Environ Med* 2006; 48: 1149-1158.

**Berges A, Van Nassauw L, Bosmans J, Timmermans JP and Vrints C.** Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning. *Acta Cardiol* 2003; 58: 119-132.

**Bernardi P.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem* 1992; 267: 8834-8839.

**Bernardi P.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999; 79: 1127-1155.

**Bernier M, Hearse DJ and Manning AS.** Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res* 1986; 58: 331-340.

**Berridge MJ, Bootman MD and Roderick HL.** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 517-529.

**Bers DM.** Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Front Biosci* 2002; 7: d1697-1711.

**Bers DM and Weber CR.** Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 976: 500-512.

**Bevan MA, Proctor, C. J., Baker-Rogers, J., and Warren, N. D.** Exposure to carbon monoxide, respirable suspended particulates, and volatile organic compounds while commuting by bicycle. *Environ Sci Technol* 1991; 25: 788-779.

**Billiar TR.** Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 1995; 221: 339-349.

**Bindoli A, Callegaro MT, Barzon E, Benetti M and Rigobello MP.** Influence of the redox state of pyridine nucleotides on mitochondrial sulfhydryl groups and permeability transition. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 22-28.

**Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS and Al-Mulla F.** Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 2005; 511: 53-64.

**Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK and McCay PB.** Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest* 1988; 82: 476-485.

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

**Bolli R and Marban E.** Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 609-634.

**Borchi E, Parri M, Papucci L, Becatti M, Nassi N, Nassi P and Nediani C.** Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischaemia-reperfusion. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2724-2735.

**Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R and Brown GC.** Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 357-366.

**Boveris A.** Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977; 78: 67-82.

**Braunwald E and Kloner RA.** The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146-1149.

**Brigelius-Flohe R.** Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951-965.

**Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Jr. and Tager I.** Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 2004; 109: 2655-2671.

**Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA and Moore RL.** Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol* 2005; 569: 913-924.

**Brown MD.** Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp Physiol* 2003; 88: 645-658.

**Brown SD and Piantadosi CA.** In vivo binding of carbon monoxide to cytochrome c oxidase in rat brain. *J Appl Physiol* 1990; 68: 604-610.

**Burnett RT, Cakmak S, Brook JR and Krewski D.** The role of particulate size and chemistry in the association between summertime ambient air pollution and hospitalization for cardiorespiratory diseases. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 614-620.

**Bye A, Sorhaug S, Ceci M, Hoydal MA, Stolen T, Heinrich G, Tjonna AE, Najjar SM, Nilsen OG, Catalucci D, Grimaldi S, Contu R, Steinshamn S, Condorelli G, Smith GL, Ellingsen O, Waldum H and Wisloff U.** Carbon monoxide levels experienced by heavy smokers impair aerobic capacity and cardiac contractility and induce pathological hypertrophy. *Inhal Toxicol* 2008; 20: 635-646.

**Carafoli E, Santella L, Branca D and Brini M.** Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2001; 36: 107-260.

**Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF and Downey JM.** Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 145-152.

**Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC and Gottlieb RA.** Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 2001; 276: 30724-30728.

**Chen W, Druhan LJ, Chen CA, Hemann C, Chen YR, Berka V, Tsai AL and Zweier JL.** Peroxynitrite induces destruction of the tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric

oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition. *Biochemistry* 2010; 49: 3129-3137.

**Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD and Nathan C.** Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992; 176: 599-604.

**Coassin M, Ursini F and Bindoli A.** Antioxidant effect of manganese. *Arch Biochem Biophys* 1992; 299: 330-333.

**Cobb N and Etzel RA.** Unintentional carbon monoxide-related deaths in the United States, 1979 through 1988. *JAMA* 1991; 266: 659-663.

**Cochrane CG.** Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 91: 23S-30S.

**Cour M and Argaud L.** Ischémie-reperfusion et protection cellulaire. *Réanimation* 2010; 19: 185-190.

**Crompton M and Costi A.** Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca<sup>2+</sup>, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca<sup>2+</sup> overload. *Eur J Biochem* 1988; 178: 489-501.

**Crompton M.** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341 ( Pt 2): 233-249.

**Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N and Ward JM.** The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp* 1999; 66: 167-179.

**D'Amico G, Lam F, Hagen T and Moncada S.** Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *J Cell Sci* 2006; 119: 2291-2298.

**Darblade B, Privat C, Caillaud D, Rami J and Arnal JF.** [Clinical and biological investigation of NO]. *J Soc Biol* 2000; 194: 151-157.

**de Leiris J and Opie LH.** Effect of substrates and of coronary artery ligation on mechanical performance and on release of lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 1978; 12: 585-596.

**de Waard MC, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, Dekkers DH, Schoonderwoerd K, Schuurbiers HC, de Crom R, Stienen GJ, Sipido KR, Lamers JM and Duncker DJ.** Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res* 2007; 100: 1079-1088.

**Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J and Naito H.** Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol* 2001; 91: 2205-2212.

**Dhalla NS, Golfman L, Takeda S, Takeda N and Nagano M.** Evidence for the role of oxidative stress in acute ischemic heart disease: a brief review. *Can J Cardiol* 1999; 15: 587-593.

**Dhalla NS, Temsah RM and Netticadan T.** Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000; 18: 655-673.

**Diffie GM, Seversen EA and Titus MM.** Exercise training increases the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of tension in rat cardiac myocytes. *J Appl Physiol* 2001; 91: 309-315.

**Diltoer MW, Colle IO, Hubloue I, Ramet J, Spapen HD, Nguyen N and Huyghens LP.** Reversible cardiac failure in an adolescent after prolonged exposure to carbon monoxide. *Eur J Emerg Med* 1995; 2: 231-235.

**Dizon J, Burkhoff D, Tauskela J, Whang J, Cannon P and Katz J.** Metabolic inhibition in the perfused rat heart: evidence for glycolytic requirement for normal sodium homeostasis. *Am J Physiol* 1998; 274: H1082-1089.

**Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM and Venkatachalam MA.** Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 405-434.

**Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G and Zweier JL.** Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH<sub>4</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15081-15086.

**Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ and Doevendans PA.** Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 414-426.

**Fabiato A.** Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 245: C1-14.

**Falk JA, Aune SE, Kutala VK, Kuppusamy P and Angelos MG.** Inhibition of peroxynitrite precursors, NO and O<sub>2</sub>, at the onset of reperfusion improves myocardial recovery. *Resuscitation* 2007; 74: 508-515.

**Favory R, Lancel S, Tissier S, Mathieu D, Decoster B and Neviere R.** Myocardial dysfunction and potential cardiac hypoxia in rats induced by carbon monoxide inhalation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 320-325.

**Ferdinandy P, Schulz R and Baxter GF.** Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007; 59: 418-458.

**Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, Ceconi C, Curello S and Visioli O.** Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J* 1998; 19 Suppl B: B2-11.

**Finkelstein MM, Jerrett M and Sears MR.** Environmental inequality and circulatory disease mortality gradients. *J Epidemiol Community Health* 2005; 59: 481-487.

**Flohe L and Gunzler WA.** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121.

**Freeman BA and Crapo JD.** Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.

**French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK and Powers SK.** Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H128-136.

**French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA and Powers SK.** Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *Faseb J* 2008; 22: 2862-2871.

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

**Furchgott RF and Jothianandan D.** Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 1991; 28: 52-61.

**Gandini C, Castoldi AF, Candura SM, Locatelli C, Butera R, Priori S and Manzo L.** Carbon monoxide cardiotoxicity. *J Toxicol Clin Toxicol* 2001; 39: 35-44.