



**HAL**  
open science

# Effet combiné du diabète insulino-dépendant et de l'entraînement sur la fonction cardiaque : étude du système $\beta$ -adrénergique et du système de régulation du calcium intracellulaire

Solène Le Douairon Lahaye

## ► To cite this version:

Solène Le Douairon Lahaye. Effet combiné du diabète insulino-dépendant et de l'entraînement sur la fonction cardiaque : étude du système  $\beta$ -adrénergique et du système de régulation du calcium intracellulaire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Rennes 2; Université Européenne de Bretagne, 2009. Français. NNT: . tel-00472525

**HAL Id: tel-00472525**

**<https://theses.hal.science/tel-00472525>**

Submitted on 12 Apr 2010

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

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

N° d'ordre :

Thèse de doctorat

Sous le sceau de

L'Université Européenne de Bretagne

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Rennes 2  
Discipline STAPS

par

Solène Le Douairon Lahaye

Equipe d'accueil : Laboratoire Mouvement Sport Santé – EA 1274  
Ecole Doctorale : Vie Agro Santé (co-accréditée avec l'Université Rennes 1)

**Effet combiné du diabète insulino-dépendant et de  
l'entraînement sur la fonction cardiaque : étude du  
système  $\beta$ -adrénergique et du système de régulation du  
calcium intracellulaire**

Soutenue le 16 novembre 2009 devant la commission d'examen

Mr X. Bigard	Professeur agrégé du Val-de-Grâce	Rapporteur
Mr P. Obert	Professeur de l'Université d'Avignon	Rapporteur
Mr F. Carré	Professeur de l'Université de Rennes 1	Examineur
Mr J. Mansourati	Professeur de l'Université de Brest	Examineur
Mme F. Rannou Bekono	Professeur de l'Université de Rennes 2	Directrice

*Chaque progrès donne un nouvel espoir, suspendu à la solution d'une nouvelle  
difficulté. Le dossier n'est jamais clos.*

*Claude Lévi-Strauss*

## REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail : *Pr Xavier Bigard, Pr Philippe Obert, Pr François Carré, Pr Jacques Mansourati*. Je suis très honorée de votre présence à l'occasion de ma soutenance de thèse.

*Paul*, merci pour tout. Sans vous, je ne serais certainement pas là. En m'interpellant lors de ce fameux CM de licence, vous m'avez fait réfléchir sur mon avenir. Je vous suis sincèrement reconnaissante de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire, au sein duquel j'ai pu faire mes premiers pas, quelques fois un peu laborieux, dans le monde de la recherche. Je n'oublierai jamais vos qualités humaines. Votre soutien a été pour moi d'un grand secours. Promis vous ne me verrez plus pleurer...

*Françoise*, je voulais te remercier pour m'avoir entraîné dans un domaine de recherche si plaisant, si passionnant et si riche en rebondissement. Je te suis très reconnaissante pour la confiance que tu as pu m'accorder tout au long de cette thèse. Tes conseils techniques et scientifiques, ta rigueur scientifique et ton esprit de synthèse m'ont permis de progresser. Je te remercie pour ta gentillesse et ta zen attitude. J'espère que mon côté « pas de bol !!! » ne t'aura pas trop marqué et que nous pourrons continuer à collaborer dans l'avenir.

*Arlette*, un grand merci pour votre aide, vos précieux conseils et votre disponibilité qui m'ont permis d'avancer au niveau des articles. Vos connaissances, votre rigueur scientifique et votre esprit de synthèse m'impressionnent toujours. Je n'oublierai jamais votre gentillesse, votre optimisme et votre dynamisme qui font que travailler à vos côtés est un réel plaisir et un réel enrichissement.

*Monsieur le Pr François Carré*, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux tout au long de cette thèse.

*Christine* (Dutais) et *Catherine* (Le Meslif Salaun), merci pour votre aide. Nos petits rats ont apprécié le soin que vous leur avez apporté.

*Pascale* (Bellaud), merci pour ton aide, ta disponibilité et ta gentillesse.

Merci à *tous les membres du labo* pour leur sympathie et leur bonne humeur.

Un grand merci aux habitants et anciens habitants du blochkauss, *Maitel, Steven, Fred, Mélanie, Ludi et Amélie*. Dans les moments d'extrême désespoir vous avez su me soutenir, me comprendre, m'encourager et m'aider à aller au bout de cette thèse.

*Mélanie*, merci pour ta gentillesse, tes lectures attentionnées de mes écrits et tes précieux conseils techniques et linguistiques.

*Ludi*...Comment te dire? On pourrait résumer la situation à toi, moi et nos petits rats. Je ne trouve pas les mots alors tout simplement merci pour tout. Nos fous rires, nos coups de gueule contre le monde entier, nos déprimés, nos petits rats...je n'oublierai jamais. Je te souhaite bon courage pour ta fin de thèse et tout le bonheur du monde pour la suite...Enfin, j'espère que notre histoire ne s'arrête pas là !!!

*Amélie*, cela fait 2 ans que l'on se connaît mais j'ai l'impression que l'on s'est toujours connues. Tu es partie puis revenue, rien à changé. Là encore les mots me manquent. Ton aide, ton soutien, ta bonne humeur, tu es tout simplement géniale! Je te souhaite toute la réussite et tout le bonheur que tu mérites.

*Luz* ou le soleil du labo comme dirait Amélie, ton sourire « matin midi et soir » m'ont aidé à voir la vie en rose durant ces dernières semaines difficiles.

*Ma petite maman*, aucun discours ne sera à la hauteur de mes sentiments. Je ne sais comment te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi, pour nous. Tu as toujours cru en moi et tu m'as soutenue quelques soit les circonstances, quelques soit les expériences, dans les bons comme dans les mauvais moments. Je te dédie cette thèse qui en quelque sorte est la victoire de ton combat pour tes enfants. Merci ma petite maman que j'aime...

*Papa*, je te remercie pour m'avoir inculqué ce principe: toujours plus haut, toujours plus fort!

**Ma petite sœur chérie**, encore une fois les mots me manquent! Mes sentiments sont tellement forts que je ne trouve pas les mots...Je t'aime, je t'adore ma petite sœur. Je serai toujours là pour toi...Profites de la vie!

**Mon grand frère chéri**, je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour nous. Tu as toujours été là quand on a eu besoin de toi, et pour ça je te dois tout l'amour du monde. Attention à toi Lance, maintenant je vais pouvoir lâcher les chevaux, entraîne-toi sinon tu vas pleurer!

**Mon loulou**, chaque jour tu as cru en moi. Tu m'as soutenu, aidé, réconforté, tu as supporté toutes mes angoisses, tous mes coups de blues et surtout mon caractère de cochon (celui là, je ne compte pas le changer!). Sans tes encouragements, sans ton amour, sans tes mots tendres, sans toi tout simplement, je n'y serais jamais arrivé. Cette thèse, c'est notre thèse à tous les 2. On a dit oui pour le meilleur et pour le pire, alors maintenant place au meilleur! Toi aussi Alberto enfourches ta monture maintenant car sinon tu me regarderas de l'arrière...

**Michel, Jérôme, Sophie, Joshua et son futur petit frère, Mamie**, merci à vous. Les moments passés à vos côtés sont pour moi très importants.

Merci à **mes petits rats** qui m'en ont fait voir de toutes les couleurs, avec des remerciements tout particulier à notre petit Hannibal le cannibale qui nous a permis de mettre au point le protocole. Paix à son âme! Mais attention au prochain qui s'attaque à moi...

## VALORISATION DU TRAVAIL

### Ce travail fait l'objet des publications suivantes

S. Le Douairon Lahaye, A. Gratas-Delamarche, L. Malardé, S. Vincent, MS. Zguira, S. Lemoine Morel, P. Delamarche, F. Carré, F. Rannou Bekono. *In diabetic rats, high endurance training aggravates bradycardia and cardiac  $\beta$ -adrenergic desensitization despite enhancement in the calcium cycling protein expression*. En révisions majeures au J Physiol Pharmacol.

S. Le Douairon Lahaye, A. Gratas-Delamarche, L. Malardé, MS. Zguira, S. Vincent, S. Lemoine Morel, F. Carré, F. Rannou Bekono. *Exercise training during diabetes potentiates insulin effect on cardiac contractile function mediated by  $Ca^{2+}$ -cycling proteins*. Soumis dans Nutr Metab Cardiovasc Dis.

### Ce travail a fait l'objet des communications suivantes

S. Le Douairon Lahaye, L. Malardé, MS. Zguira, S. Vincent, S. Lemoine Morel, H. Zouhal, F. Carré, F. Rannou Bekono. *Effect of relatively high intensity exercise training on myocardial  $\beta$ -adrenergic responsiveness and calcium signalling in diabetic rats*. 30th Fims World Congress of Sports Medicine, 18-23 novembre 2008, Barcelone, Espagne. (Communication orale).

S. Le Douairon Lahaye, L. Malardé, A. Rebillard, S. Vincent, S. Lemoine Morel, C. Groussard, P. Delamarche, F. Carré, F. Rannou Bekono. *Effects of endurance training on both  $\beta_3$ -adrenoceptor and neuronal nitric oxide synthase (NOS 1) expression in streptozotocin-induced diabetic rat hearts*. 3ème symposium international Nutrition, Biologie de l'oxygène et Médecine, 8-10 avril 2009, Paris, France (Communication affichée, 1<sup>er</sup> prix).

S. Le Douairon Lahaye, L. Malardé, S. Zguira, S. Vincent, S. Lemoine Morel, H. Zouhal, B. Saïag, P. Delamarche, F. Carré, F. Rannou Bekono. *Effects of endurance training on calcium signalling proteins and beta-adrenoceptors expression of*

*streptozotocin-induced diabetic rat hearts: contractile myocardial adaptation.* 4ème congrès de physiologie, de pharmacologie et de thérapeutique, 15-17 avril 2009, Marseille, France (Communication affichée présentée oralement).

S. Le Douairon Lahaye, L. Malardé, MS. Zguira, S. Vincent, S. Lemoine Morel, H. Zouhal, P. Delamarche, F. Carré, F. Rannou Bekono. *Combined treatment with insulin and exercise training ameliorates expression of calcium signalling proteins in streptozotocin-induced diabetic rat hearts.* 14th Annual Congress of the European College of Sport Sciences, 24-27 juin 2009, Oslo, Norvège. (Communication affichée).

S. Le Douairon Lahaye, L. Malardé, MS. Zguira, A. Rebillard, S. Vincent, S. Lemoine Morel, P. Delamarche, F. Carré, F. Rannou Bekono. *Une down-regulation de la NO synthase neuronale (NOS 1) pourrait contrebalancer les effets positifs de l'entraînement dans la cardiomyopathie diabétique.* 13<sup>ème</sup> congrès international de l'ACAPS, 28-30 octobre 2009, Lyon, France (Communication orale, 1<sup>er</sup> prix)



## TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	12
LISTE DES ABREVIATIONS .....	13
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
<b>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>19</b>
1. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES, METABOLIQUES ET FONCTIONNELLES DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABETIQUE.....	20
1.1. Modifications structurales du myocarde au cours de la cardiomyopathie diabétique .....	
1.1.1. <i>Mort cellulaire des myocytes.....</i>	20
1.1.2. <i>Fibrose myocardique.....</i>	21
1.1.3. <i>Hypertrophie ventriculaire.....</i>	22
1.2. Désordres métaboliques du myocarde au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	23
1.3. Propriétés électriques du myocarde au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	25
1.3.1. <i>Caractéristiques du potentiel d'action au cours de la cardiomyopathie                 diabétique.....</i>	25
1.4. Propriétés fonctionnelles du myocarde au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	28
1.4.1. <i>Contrôle cardiovasculaire.....</i>	28
1.4.2. <i>Propriétés mécaniques : fonctions diastoliques et systoliques.....</i>	30
1.4.3. <i>La phase transitoire dans le développement de la cardiomyopathie                 diabétique.....</i>	33
2. LE SYSTEME B-ADRENERGIQUE AU COURS DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABETIQUE...34	

2.1.	Réponse cardiaque à la stimulation par des agonistes $\beta$ -adrénergiques au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	34
2.2.	Concentrations myocardiques en catécholamines au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	35
2.3.	Densité des récepteurs $\beta$ -adrénergiques cardiaques au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	39
2.4.	Système « récepteurs $\beta$ -AR / protéine G / adénylate cyclase » au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	43
3.	MOUVEMENTS DE CALCIUM DANS LA CARDIOMYOPATHIE DIABETIQUE.....	49
3.1.	Homéostasie calcique dans le cardiomyocyte normal.....	49
3.1.1.	<i>Couplage excitation-contraction</i> .....	49
3.1.2.	<i>Transitoire calcique</i> .....	51
3.1.3.	<i>Localisation du CICR : la diade</i> .....	53
3.1.4.	<i>Repompage du <math>Ca^{2+}</math> dans le RS et efflux calcique hors de la cellule</i> .....	54
3.2.	Mouvements intracellulaires de calcium au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	55
3.3.	Evolution des principales protéines membranaires impliquées dans la régulation des mouvements calciques intracellulaires au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	58
3.3.1.	<i>Canal calcique de type L du sarcolemme</i> .....	58
3.3.1.1	Caractéristiques du canal calcique de type L.....	58
3.3.1.2	Devenir du canal calcique de type L au cours de la cardiomyopathie diabétique..	59
3.3.2.	<i>Le canal calcique du RS ou récepteur à la ryanodine (RyR2)</i> .....	62
3.3.2.1	Caractéristiques du RyR2.....	62
3.3.2.2	Devenir du RyR2 au cours du diabète.....	64
3.3.3.	<i>La <math>Ca^{2+}</math>-ATPase du RS ou SERCA2</i> .....	71
3.3.3.1	Caractéristiques de la SERCA2.....	71
3.3.3.2	Devenir de la SERCA2 au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	72
3.3.3.3	Effet d'un traitement à l'insuline sur la protéine SERCA2 et le phospholamban..	77
3.3.4.	<i>L'échangeur <math>Na^+/Ca^{2+}</math> du sarcolemme ou NCX</i> .....	78
3.3.4.1	Caractéristiques du NCX.....	78
3.3.4.2	Devenir du NCX au cours de la cardiomyopathie diabétique.....	79
4.	EFFET D'UN ENTRAINEMENT PHYSIQUE SUR LE CŒUR DIABETIQUE.....	82

4.1.	Effet de l'entraînement sur l'aptitude aérobie.....	82
4.2.	Effet de l'entraînement sur les hormones et métabolites.....	83
4.3.	Effet de l'entraînement sur le transport et l'utilisation du glucose au niveau du cardiomyocyte diabétique.....	84
4.4.	Effet de l'entraînement sur la fonction cardiaque et sur les performances contractiles cardiaques.....	87
4.4.1.	<i>La fonction myocardique de base</i> .....	87
4.4.2.	<i>Les réponses myocardiques à la stimulation <math>\beta</math>-adrénergique</i> .....	89
4.5.	Effet de l'entraînement sur le système $\beta$ -adrénergique.....	90
4.5.1.	<i>Les concentrations myocardiques en catécholamines</i> .....	90
4.5.2.	<i>Le système récepteurs <math>\beta</math>-AR / protéine G / adénylate cyclase</i> .....	91
4.6.	Effets de l'entraînement sur les mouvements de calcium intracellulaire.....	93
5.	SYNTHESE ET OBJECTIFS.....	96

## **CONTRIBUTION PERSONNELLE.....99**

<i>Fiche technique n°1 : Identification de la population d'étude</i> .....	100
<i>Fiche technique n°2 : Induction du diabète</i> .....	101
<i>Fiche technique n°3 : Vérification du diabète</i> .....	102
<i>Fiche technique n°4 : Traitement à l'insuline</i> .....	103
<i>Fiche technique n°5 : Protocole d'entraînement physique</i> .....	104
<i>Fiche technique n°6 : Suivi des animaux au cours de l'étude Sacrifice</i> .....	105
<i>Fiche technique n°7: Mesure de l'activité de la citrate synthase</i> .....	106
<i>Fiche technique n°8 : Mesure non-invasive de pression systolique et fréquence cardiaque par la queue</i> .....	107
<i>Fiche technique n°9 : Préparation du réactif de Krebs</i> .....	108
<i>Fiche technique n°10 : Préparation des solutions contenant l'Isoprotérenol</i> .....	109
<i>Fiche technique n°12 : Dispositif du Langendorff pour cœur isolé perfusé</i> .....	110
<i>Fiche technique n°13 (1) : La technique du cœur isolé perfusé ex vivo</i> .....	111
<i>Fiche technique n°13 (2) : La technique du cœur isolé perfusé ex vivo</i> .....	112
<i>Fiche technique n°14 (1): Etude de l'expression des protéines par la technique du Western Blot</i> .....	113
<i>Fiche technique n°14 (2): Etude de l'expression des protéines par la technique du Western Blot</i> .....	114

<i>Fiche technique n°15: Préparation membranaire préalable au western blot .....</i>	115
<i>Fiche technique n°16 : Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....</i>	116
<i>Fiche technique n°17 (1): Electrophorèse – Préparation des gels.....</i>	117
<i>Fiche technique n° 17 (2) : Electrophorèse – Préparation des gels.....</i>	118
<i>Fiche technique n°18 : Electrophorèse – Préparation des échantillons et migration.....</i>	119
<i>Fiche technique n°19 (1) : Transfert .....</i>	120
<i>Fiche technique n° 19 (2) : Transfert .....</i>	121
<i>Fiche technique n°20 : Préparation des tampons de lavage .....</i>	122
<i>Fiche technique n°21 : Blocage ou Saturation des membranes .....</i>	123
<i>Fiche technique n° 22 (1): Hybridation des anticorps – Anticorps primaire .....</i>	124
<i>Fiche technique n° 22 (2): Hybridation des anticorps – Anticorps secondaire.....</i>	125
<i>Fiche technique n°23 (1) : Révélation par chimiluminescence .....</i>	126
<i>Fiche technique n°23 (2) : Révélation par chimiluminescence .....</i>	127
<i>Fiche technique n°24: Immunomarquage.....</i>	128
<i>Fiche technique n°25: Comarquage.....</i>	129

## **PRESENTATION DES RESULTATS.....131**

Etude 1 : Un entraînement intense en endurance aggrave la bradycardie ainsi que la désensibilisation  $\beta$ -adrénergique malgré une amélioration de l'expression des protéines régulatrices du calcium chez le rat diabétique.....133

Etude 2 : Un entraînement en endurance au cours du diabète potentialise les effets du traitement à l'insuline sur la fonction contractile cardiaque médiée par les protéines régulatrices du calcium..... 149

Etude 3 : Effets d'un entraînement en endurance au cours du diabète sur la NO synthase neuronale (NOs1) : implication pour le récepteur de la ryanodine (étude complémentaire)..... 163

## **CONCLUSION DES RESULTATS..... 171**

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....175**

1. EFFET DE LA CHARGE D'ENTRAÎNEMENT SUR LES ADAPTATIONS MYOCARDIQUES AU COURS DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABÉTIQUE.....176

2. LE SYSTÈME B-ADRENERGIQUE AU COURS DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABÉTIQUE : IMPACT DE L'ENTRAÎNEMENT.....180

3. NITROSYLATION ET PHOSPHORYLATION DE LA PROTEINE RYR2 AU COURS DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABETIQUE : IMPACT DE L'ENTRAINEMENT.....	183
<b>APPORTS AU DOMAINE.....</b>	<b>191</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>193</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Potentiel d'action ventriculaire et vitesse maximale de dépolarisation	25
Tableau 1 : Principaux courants ioniques transmembranaires impliqués dans les potentiels d'action membranaire	26
Figure 2 A : Schéma de la structure moléculaire d'un récepteur $\beta$ -adrénergique	44
Figure 2 B : Schématisation du fonctionnement du récepteur $\beta$ -adrénergique	44
Figure 3 : Voie de signalisation du système $\beta$ -adrénergique chez le rat	45
Figure 4: Voie de signalisation du système $\beta$ -adrénergique chez le rat diabétique	48
Figure 5 : Modèle du Calcium-Induced Calcium Release	50
Figure 6 : Etincelles calciques et tubules T	53
Figure 7 : Structure d'un canal calcique de type L	59
Figure 8 : Structure d'un RyR2	63
Figure 9 : Structure tri-dimensionnelle de la SERCA2	72
Figure 10 : Structure de l'échangeur NCX	79
Figure 11 : Rôle possible de FKBP12.6 sur l'organisation (A) et l'activité (B) du RyR2 dans le couplage excitation-contraction	187
Figure 12 : Modèle théorique hypothétique des mécanismes cellulaires et moléculaires susceptibles d'expliquer un effet anti-arythmogène de l'entraînement en endurance dans le cadre de la cardiomyopathie diabétique.	189

## LISTE DES ABREVIATIONS

- A : adrénaline
- AC : adénylate cyclase
- ACh : acétylcholine
- AG : acides gras
- AGEs : advanced glycation end products
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- ATP: adénosine triphosphate
- Bmax: nombre maximal de site de fixation du ligand
- $\beta$ -AR :  $\beta$ -adrénergique
- Ca<sup>2+</sup> : calcium
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> : concentration en calcium libre intracellulaire
- Ca<sup>2+</sup>-ATPase : pompe calcique ATP dépendante
- CaM: calmoduline
- CaMK: protéine kinase calmoduline dépendante
- CamKII : protéine kinase Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante
- Cav3 : Cavéoline 3
- CICR: “Calcium-Induced Calcium Release”
- CS: citrate synthase
- dP/dt: dérivée première négative de la pression en fonction du temps : relaxation
- +dP/dt: dérivée première positive de la pression en fonction du temps : contraction
- DHP : dihydropyridines
- EC : excitation-contraction
- EDV : vasorelaxation endothélium dépendante
- ERDO : espèces réactives dérivées de l’oxygène
- ERDA : espèces réactives dérivées de l’azote
- FC: fréquence cardiaque
- FKBP12.6: FK-506 Binding Protein 12.6
- GLUT : transporteurs du glucose
- Gs ou Gi : Protéine stimulatrice ou inhibitrice qui lie les guanyliques
- GppNHp : Analogue non hydrolysable du GTP
- GTP : guanosine triphosphate

HbA1c : hémoglobine glyquée  
IC<sub>50</sub> : concentration d'une substance qui induit 50% d'inhibition d'une réaction  
*i.v* : intraveineuse  
IP3R : inositol triphosphate  
K<sub>d</sub> : constante d'affinité  
NA : noradrénaline  
Na<sup>+</sup> : sodium  
NCX: échangeur sodium-calcium  
NO: monoxyde d'azote  
NOs1: monoxyde d'azote synthase neuronale  
NOs3: monoxyde d'azote synthase endothéliale  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde  
PA : potentiel d'action  
PKA: protéine Kinase A  
PKC: protéine Kinase C  
PKG: protéine Kinase G  
PLB: phospholamban  
PM: poids moléculaire  
PP : protéine phosphatase  
PVG : pression développée par le ventricule gauche  
PWC170 : Physical Working Capacity 170  
RAGEs : récepteurs aux AGEs  
RS : réticulum sarcoplasmique  
RyR2: récepteur de la ryanodine  
Ser : résidu sérine  
SERCA2: pompe calcique du réticulum sarcoplasmique ATP-dépendante  
SL : sarcolemme  
SO : stress oxydant  
STZ : streptozotocine  
VG : ventricule gauche  
V<sub>max</sub> : vitesse maximale  
VO<sub>2</sub> max : consommation maximale d'oxygène  
XOR: xanthine oxydo-reductase



# ***INTRODUCTION***

Pour des raisons non encore élucidées, la prévalence du diabète juvénile, dit de type 1 ou insulino-dépendant, est en constante augmentation. Au long terme, la plupart des patients diabétiques développent des complications cardiovasculaires sévères, plus connues sous le terme de « cardiomyopathie diabétique » (Rubler et coll. 1972). Cette cardiomyopathie diabétique est associée à une bradycardie et des performances myocardiques altérées, caractérisées dans les 1ers stades de la maladie par des dysfonctions diastoliques ventriculaires gauches, puis aux stades avancés, par des dysfonctions systoliques (Hamby et coll. 1974, Regan et coll. 1977, Mahgoub et coll. 1998). Etant donné que ces complications cardiovasculaires constituent la cause majeure de décès dans cette population, la lutte et la prévention de ces complications représentent un véritable problème de santé publique.

Si le traitement à l'insuline constitue la principale stratégie thérapeutique du diabète de type 1, il n'empêche pas, à long terme, le développement de cette cardiomyopathie diabétique. Ainsi, les communautés scientifiques et médicales s'accordent sur le fait que l'activité physique régulière doit trouver sa place au sein du projet thérapeutique du diabète. Une amélioration du profil lipidique, de la sensibilité à l'insuline ou encore du contrôle glycémique induisant une diminution des risques cardiovasculaires sont les adaptations bénéfiques les plus classiquement décrites d'un point de vue clinique (Heyman et coll. 2007). Des bénéfices sur la fonction myocardique ont également été mis en évidence expérimentalement (Loganathan et coll. 2007). Cependant, à l'heure actuelle, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans de telles adaptations restent encore peu connus. A court terme, il semblerait que les effets bénéfiques de l'entraînement physique sur la fonction myocardique puissent être liés, comme ceux attribués à un traitement à l'insuline (Netticadan et coll. 2001, Zhong et coll. 2001), à une atténuation des désordres occasionnés par le diabète au niveau de la fonction adrénergique et de l'homéostasie calcique, 2 systèmes essentiels pour le contrôle de cette fonction myocardique (Bidasee et coll. 2008, Shao et coll. 2009). Cependant, jusqu'à présent, si le traitement à l'insuline et l'entraînement physique paraissent efficaces au moins à court terme dans le traitement du diabète, les effets respectifs de l'un et de l'autre ainsi que leurs effets combinés à plus long terme sur la fonction cardiaque n'ont jamais été étudiés chez l'homme comme chez l'animal.

**L'objectif de mon travail est donc de déterminer sur le long terme, les effets respectifs et combinés d'un traitement à l'insuline et d'un programme d'entraînement en endurance sur la fonction myocardique et sur deux de ses principaux systèmes de contrôle, le système  $\beta$ -adrénergique et le système de régulation du calcium intracellulaire au cours de la cardiomyopathie diabétique.**

Ce manuscrit est introduit par une revue des données actuelles concernant d'une part les caractéristiques de la cardiomyopathie diabétique avec une attention particulière portée sur le système  $\beta$ -adrénergique et sur le système de régulation du calcium intracellulaire, et d'autre part, les effets d'un entraînement physique au cours du diabète.



## ***DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES***

*Pour voir loin, il faut y regarder de près.*

*Pierre Dac*

## **1. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES, METABOLIQUES ET FONCTIONNELLES DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABETIQUE**

Le développement de la cardiomyopathie diabétique est certainement multifactoriel. Dans cette 1<sup>ère</sup> partie, nous allons faire un état des lieux des modifications structurales, métaboliques et fonctionnelles responsables de cette maladie spécifique du myocarde.

### **1.1. Modifications structurales du myocarde au cours de la cardiomyopathie diabétique**

La cardiomyopathie diabétique est caractérisée par des altérations structurales telles que l'hypertrophie, la nécrose et la fibrose myocardique qui s'accroissent avec l'évolution de la maladie. En effet, un certain nombre d'études chez l'homme comme chez l'animal ont montré des changements structuraux en parallèle de changements fonctionnels cardiaques induits par le diabète. La fibrose et l'hypertrophie myocardiques sont des mécanismes fréquemment mis en avant pour expliquer les changements cardiaques observés dans la cardiomyopathie diabétique.

#### **1.1.1. Mort cellulaire des myocytes**

La mort cellulaire peut être causée par l'apoptose et/ou la nécrose. L'apoptose peut être définie comme une mort cellulaire programmée, ou suicide cellulaire. Il s'agit du processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Par ailleurs, la nécrose est la forme principale de mort cellulaire lors d'accidents traumatiques, suite à certaines pathologies ou lors de déficits métaboliques. Quoiqu'il en soit, l'apoptose et la nécrose ont été identifiées dans les cœurs diabétiques. Ces deux formes distinctes de mort cellulaire ont cependant des conséquences différentes. L'apoptose ne cause pas de cicatrices ou d'accumulation interstitielle de collagène importante (Haunstetter et Izumo 1998). En revanche, la nécrose des myocytes résulte en un élargissement des compartiments extracellulaires entre les myocytes et en une augmentation des dépôts de collagène d'une manière diffuse ou dispersée (Anversa et coll. 1998, Li et coll. 1999), résultant à la fois en une fibrose des myocytes en raison de la

nécrose ainsi qu'en une prolifération des cellules du tissu conjonctif (Weber et Brilla 1991).

Néanmoins, si expérimentalement, des lésions de nécrose et d'apoptose ont été décrites en présence d'une hyperglycémie chronique, seule la mort cellulaire causée par la nécrose va stimuler la fibrose myocardique observée dans la cardiomyopathie diabétique (Fang et coll. 2004).

### 1.1.2. Fibrose myocardique

La caractéristique histopathologique la plus importante retrouvée dans les cœurs diabétiques est la fibrose. Cette fibrose peut être perivasculaire et/ou interstitielle. Elle résulte en partie d'une inhibition de la dégradation du collagène, suite à une glycation des résidus de lysine, et d'une réaction tissulaire à la mort des cellules favorisées par le stress oxydatif.

L'étude conduite par Regan et coll. (1974) sur des chiens diabétiques met en évidence, 1 an après l'induction de la maladie, une augmentation du tissu conjonctif interstitiel, en l'absence de dommages au niveau des myocytes. Une augmentation de la fibrose interstitielle est également observée au niveau de cœurs de rats diabétiques (Fischer et coll. 1981, Jackson et coll. 1985, Fredersdorf et coll. 2004). De même, l'accumulation interstitielle de collagène et de glycoprotéines, et donc de fibrose dans le myocarde a été reporté par des biopsies et des études post-mortem de cœurs humains diabétiques (Regan et coll. 1977, Nunoda et coll. 1985, Van Hoesven et Factor 1990). Par ailleurs, la coexistence du diabète et de l'hypertension est considérée comme un facteur clé dans l'expression de ces anomalies structurelles dans le myocarde diabétique humain. Ce concept initialement suggéré suite à des études réalisées chez le rat diabétique (Jackson et coll. 1985) a ensuite été confirmé chez l'homme par Van Hoesven et Factor (1990). Ces auteurs ont démontré, dans des cœurs obtenus lors d'autopsie, que la fibrose interstitielle et perivasculaire ainsi que la nécrose myocytolitique sont plus importantes dans les cœurs diabétiques hypertendus que dans ceux des patients seulement diabétiques ou hypertendus.

Néanmoins, il semble que le mécanisme d'accumulation du collagène soit dû non pas à une augmentation de sa synthèse mais plutôt à une altération de sa dégradation (Vishwanath et coll. 1986), résultant de la glycation de ses résidus de lysine. De plus, l'hyperglycémie induite par le diabète entraîne également une production d'espèces réactives dérivées de

l'oxygène (ERDO) et de l'azote (ERDA), laquelle induit un stress oxydant, altère l'expression génique, les signaux de transduction, et active les voies de mort cellulaire programmée ou apoptose.

S'il existe des évidences *in vivo* selon lesquelles l'hyperglycémie et plus précisément les ERDO qui en découlent, induisent directement une mort cellulaire apoptotique et une nécrose des myocytes dans le myocarde (Cai et coll. 2002), d'autres facteurs semblent impliqués dans la fibrose myocardique. En effet, il semble que l'hyperactivité du système rénine-angiotensine intramyocardique induite par le diabète augmente les dommages oxydatifs activant ainsi l'apoptose, la nécrose des cardiomyocytes, et ce faisant la fibrose myocardique (Frustaci et coll. 2000). De même, l'hyperactivité du système endothéline induite par l'hyperglycémie dans le cœur diabétique pourrait aussi jouer un rôle important dans la fibrose myocardique.

Par ailleurs, quelques soient les mécanismes d'apparition de la fibrose, interstitielle ou perivasculaire, la diminution de la compliance du myocarde en est la principale conséquence fonctionnelle.

### 1.1.3. Hypertrophie ventriculaire

Parallèlement à cette fibrose myocardique, l'hypertrophie ventriculaire constitue une des caractéristiques essentielles de la cardiomyopathie diabétique. Cette hypertrophie ventriculaire est retrouvée dans les études épidémiologiques de Rubler et coll. (1972) ou encore de Hamby et coll. (1974) chez des patients diabétiques présentant des complications sévères et une insuffisance cardiaque. En effet, ces patients présentent une hypertrophie myocardique associée à une augmentation du poids du cœur. Les études expérimentales réalisées chez l'animal aboutissent à la même conclusion que les études épidémiologiques, selon laquelle une hypertrophie cardiaque est induite par le diabète. En effet, le ratio poids du cœur / poids du corps, calculé comme index de l'hypertrophie cardiaque, est significativement augmenté dans de nombreuses études chez des rats diabétiques (Golfman et coll. 1999, Bidasee et coll. 2001, Kim et coll. 2001, Netticadan et coll. 2001). L'augmentation du ratio poids du cœur / poids du corps résulte d'une hypertrophie cellulaire à laquelle s'associent des processus complexes de remodelage, telle que la fibrose (Swynghedauw 1999). L'utilisation du ratio poids du ventricule gauche (VG) / poids du cœur par Golfman et coll. (1996) suggère plus précisément une hypertrophie



ventriculaire. En effet, la masse, la taille et l'épaisseur du ventricule gauche vont progressivement augmenter à mesure que la cardiomyopathie diabétique devient de plus en plus sévère (Fang et coll. 2004). Plus récemment, le recours à l'imagerie par résonance magnétique a permis à l'équipe de Loganathan et coll. (2006) de mettre en évidence une augmentation du ratio volume du VG / poids du corps, suggérant une hypertrophie du VG chez des rats 8 semaines après l'induction du diabète.

L'ensemble de ces données épidémiologiques, cliniques et expérimentales confirment l'existence d'une mort cellulaire, d'une fibrose myocardique et d'une hypertrophie ventriculaire, caractéristiques de la cardiomyopathie diabétique. Il est important de préciser que ces changements structuraux sont à l'origine de la diminution de la compliance myocardique observée au cours du diabète. De plus, il apparaît que la perte de fonction systolique dépendrait du degré de nécrose/apoptose des myocytes cardiaques tandis que la perte de fonction diastolique serait directement liée au degré de fibrose (Fang et coll. 2004).

Cependant, le développement de la cardiomyopathie diabétique est aussi fréquemment associé à des désordres métaboliques.

## **1.2. Désordres métaboliques du myocarde au cours de la cardiomyopathie diabétique**

Dans les cœurs normaux, approximativement 60% de l'énergie totale du métabolisme provient de l'oxydation des acides gras (AG), alors que la glycolyse en fournit environ 30%. Dans les cœurs diabétiques où une utilisation moins importante du glucose est observée (Feuvray et coll. 1979), l'oxydation des AG peut participer à plus de 90% de la production d'énergie (Morgan et coll. 1961, Randle 1978). En effet, le cœur diabétique est relié aux AG presque exclusivement pour sa production d'énergie. Il est estimé que le cœur diabétique peut recevoir 90% de ses besoins en énergie par l'oxydation de ces AG. Ceci est associé, à un défaut primaire de la stimulation de la glycolyse et de l'oxydation du glucose (Wall et Lopaschuk 1989, Mokuda et coll. 1990). En effet, une diminution significative des stocks et de l'utilisation myocardiques de glucose a été observée aussi bien dans des cardiomyocytes isolés de rats diabétiques (Chen et coll. 1984) que chez des patients diabétiques (Ohtake et coll. 1995). Cette moindre utilisation du glucose dans les cœurs

diabétiques pourrait être due en partie à une plus faible disponibilité en glucose du myocarde diabétique en particulier dans des conditions de stress comme lors d'une augmentation de la charge de travail imposée au coeur (Garvey et coll. 1993, Stanley et coll. 1994). Un rythme plus lent de transport du glucose à travers la membrane du sarcolemme (SL) dans le myocarde permet d'expliquer cette plus faible disponibilité myocardique en glucose. En effet, Garvey et coll. (1993) ont mis en évidence une diminution de 53 % de l'activité de transport du glucose dans les vésicules de SL cardiaque chez des rats traités à la STZ comparés à des animaux contrôles. Ces données sont à mettre en parallèle avec la diminution du nombre de transporteurs de glucose (GLUT<sub>1</sub> et GLUT<sub>4</sub>) au niveau du sarcolemme de la cellule cardiaque lors du diabète (Eckel et Reinauer 1990, Garvey et coll. 1993, Stanley et coll. 1994, Osborn et coll. 1997, Depré et coll. 2000).

Parallèlement à ce transport du glucose altéré, l'augmentation du métabolisme des AG (Randle et coll. 1964), liée à des niveaux élevés d'AG libres, contribue également à la moindre utilisation du glucose par le myocarde diabétique. En effet, l'oxydation des AG a un effet inhibiteur sur le complexe pyruvate déshydrogenase et ce faisant sur l'oxydation du glucose (Wall et Lopaschuk 1989).

Ainsi, un transport du glucose altéré associé à une augmentation du métabolisme des AG dans le tissu myocardique diabétique constituent les principales altérations métaboliques du myocarde diabétique. Ces altérations semblent être la 1<sup>ère</sup> cause de la pathogénèse de cette maladie spécifique du myocarde (Rodrigues et coll. 1998). Néanmoins, il est important de noter que ces désordres métaboliques sont directement dus à l'état d'hyperglycémie induit par le diabète et qu'ils sont largement insulino-réversible puisque l'amélioration du contrôle métabolique par le traitement des animaux diabétiques avec de l'insuline renverse ces désordres (Garvey et coll. 1993).

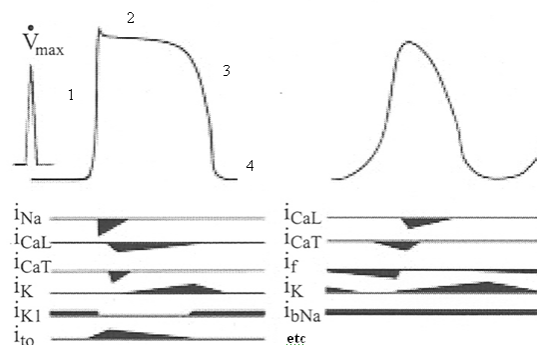
### **1.3. Propriétés électriques du myocarde au cours de la cardiomyopathie diabétique**

#### **1.3.1. Caractéristiques du potentiel d'action au cours de la cardiomyopathie diabétique**

Malgré un potentiel de repos de la membrane des myocytes ventriculaires normal (Sauviat et Feuvray 1986, Horackova et Murphy 1988, Magyar et coll. 1992, Jourdon et Feuvray 1993), l'altération électrique majeure observée au cours de la cardiomyopathie diabétique est une augmentation de la durée du potentiel d'action (PA) dans les myocytes ventriculaires isolés (Horackova et Murphy 1988, Jourdon et Feuvray 1993), dans des muscles ventriculaires intacts (Fein et coll. 1983, Sauviat et Feuvray 1986, Nobe et coll. 1990), comme dans les oreillettes de rats (Legaye et coll. 1988).

Cet allongement du PA se produit soit sans aucune modification significative de l'*overshoot* (valeur 0 du potentiel), de l'amplitude et de la vitesse maximale de développement du PA (Sauviat et Feuvray 1986, Nobe et coll. 1990, Magyar et coll. 1992), soit avec seulement une légère diminution de l'amplitude du PA (Jourdon et Feuvray 1993) ou de la vitesse maximale de dépolarisation (Tsuchida et coll. 1994, Pacher et coll. 1999).

Cet allongement de la durée du PA est caractérisée par un allongement de la phase de plateau (phase 2) et un délai de la repolarisation (phase 3) (Sauviat et Feuvray 1986, Magyar et coll. 1992, Jourdon et Feuvray. 1993, Shimoni et coll. 1994, Pacher et coll. 1999).



**Figure 1** : Potentiel d'action ventriculaire (à gauche) et vitesse maximale de dépolarisation ( $V_{max}$ ) de la phase 0 et potentiel d'action à réponse lente (nœud sinusal et atrio-ventriculaire) avec les cinétiques des principaux courants impliqués dans leur genèse.

Cet allongement pourrait alors être le résultat d'une augmentation des courants entrants dépolarisants et/ou d'une diminution des courants sortants repolarisants (Tableau 1).

$i_{Na}$	Courant entrant rapide, de nature sodique, responsable de la dépolarisation des cellules à conduction rapide. Ce courant est inhibé par les antiarythmiques de la classe I.
$i_{CaL}$	Courant entrant lent, de nature calcique, responsable de la dépolarisation des cellules à conduction lente. Ce courant est inhibé par les antiarythmiques de la classe IV.
$i_{CaT}$	Courant entrant transitoire, de nature calcique, impliqué dans la phase initiale de la dépolarisation des cellules à conduction lente.
$i_{bNa}$	Courant entrant de base ("baseline"), de nature sodique, contribuant à la dépolarisation diastolique lente spontanée.
$i_f$	Courant net entrant à travers un canal $Na^+-K^+$ activé après la repolarisation membranaire, pendant la diastole, et contribuant à la dépolarisation diastolique lente spontanée.
$i_{K1}$ ou $i_{Kir}$	"Inward rectifier potassium current" : courant instantané, entrant, de rectification, de nature potassique.
$i_K$ ou $i_{Kdr}$	"Delayed rectifier potassium current" : courant retardé, entrant, de rectification, de nature potassique, responsable de la phase 3 du potentiel d'action rapide. A deux composantes $i_{Kr}$ et $i_{Ks}$ .
$i_{Kr}$	"Delayed-rectifying potassium current-rapid component" : composante rapide du courant $i_K$ .
$i_{Ks}$	"Delayed-rectifying potassium current-slow component" : composante lente du courant $i_K$ .
$i_{to}$	"Transient outward potassium current" : courant sortant transitoire de nature potassique, responsable de la phase 1 du potentiel d'action rapide.
$i_{KNa}$	Canal potassique dont l'activation dépend de la concentration intracellulaire de sodium.
$i_{KCa}$	Canal potassique dont l'activation dépend de la concentration intracellulaire de calcium.
$i_{KACH}$	Canal potassique sensible à l'acétylcholine. Son activation diminue l'activité pacemaker du nœud sinusal et la conduction du nœud auriculo-ventriculaire. Ces canaux sont impliqués dans l'effet antiarythmique du massage carotidien et des manœuvres vagues.
$i_{KATP}$	Canal potassique dont l'activation est régulée par la concentration intracellulaire d'ATP. Son activation diminue l'activité des canaux calciques. Ceci confère aux agonistes de $i_{KATP}$ des propriétés vasodilatatrices et cardio-protectrices.

Tableau 1 : Principaux courants ioniques transmembranaires impliqués dans les potentiels d'action membranaire

Le ralentissement de la phase de dépolarisation (phase 1) du potentiel d'action et son amplitude maximale réduite dans les préparations multicellulaires diabétiques (Fein et coll. 1983, Nordin et coll. 1985) suggèrent que la conductance membranaire du  $Ca^{2+}$  peut être

réduite. Cette hypothèse est également supportée par la réduction du contenu total en  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  des myocytes ventriculaires diabétiques (Horackova et Murphy 1988) et par l'observation que l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans de nombreuses conditions expérimentales est nettement réduits au cours du diabète (Bergh et coll. 1988, Horackova et Murphy 1988, Tani et Neely 1988). Ainsi, les cardiomyocytes diabétiques chroniques se caractérisent par une réduction de l'influx calcique via le courant calcique entrant lent ( $I_{\text{Ca,L}}$ ), tant en densité qu'en amplitude (Wang et coll. 1995, Chattou et coll. 1999, Bracken et coll. 2004).

La prolongation du PA, notamment de son plateau (phase 2) pourrait également résulter d'une diminution du courant d'échange  $I_{\text{Na-Ca}}$  (Makino et coll. 1987, Chattou et coll. 1999). Cependant, selon Chattou et coll. (1999), la diminution des courants  $I_{\text{Ca}}$  et  $I_{\text{Na-Ca}}$  ne participerait pas à l'allongement du PA au cours de la cardiomyopathie diabétique, celui-ci serait plutôt liée à la diminution des courants potassiques responsables à la fois de la dépolarisation et de la repolarisation.

Ainsi, l'allongement du PA cardiaque au cours de la cardiomyopathie cardiaque pourrait s'expliquer au moins en partie par la réduction de la densité des courants potassiques  $I_{\text{to}}$  (courant sortant responsable de la phase 1 du PA) et  $I_{\text{K}}$  (courant entrant responsable de la phase 3 du PA) (Magyar et coll. 1992, Shimoni et coll. 1994, 1998). La densité et l'amplitude du courant  $I_{\text{to}}$  sont toutes deux réduites sur une large gamme de potentiels (Magyar et coll. 1992, Jourdon et Feuvray 1993, Shimoni et coll. 1994, Wang et coll. 1995). La cinétique d'activation du courant  $I_{\text{to}}$  est ralentie (Shimoni et coll. 1994) tandis que sa cinétique d'inhibition est accélérée (Magyar et coll. 1992, Wang et coll. 1995). Ainsi, la dépression de  $I_{\text{to}}$ , en association avec une diminution du courant  $I_{\text{Ca,L}}$ , dans les cellules diabétiques pourrait être un des facteurs responsables du plus long état de dépolarisation de la membrane (Magyar et coll. 1992, Jourdon et Feuvray 1993). La dépression de ce courant  $I_{\text{to}}$  pourrait donc principalement retarder la repolarisation du PA. De même, puisque  $I_{\text{K}}$  est impliqué dans la phase 3 du PA, il est raisonnable de conclure qu'une diminution de ce courant dans les cardiomyocytes diabétiques puisse contribuer à l'allongement de la repolarisation du PA. Par ailleurs, la faible densité des courants potassiques ( $I_{\text{to}}$  et  $I_{\text{K}}$ ) observée dans les cellules diabétiques peut résulter d'une diminution du nombre de canaux et/ou de changements dans les propriétés de ces canaux voltage-dépendants. Les travaux de Jourdon et Feuvray (1993) ont d'ailleurs démontré que la

prolongation du PA induite par le diabète résulte principalement d'une diminution de la perméabilité transmembranaire au potassium.

Un traitement à l'insuline réduit la prolongation du PA cardiaque bien qu'une normalisation complète ne soit pas obtenue (Magyar et coll. 1992).

#### **1.4. Propriétés fonctionnelles du myocarde au cours de la cardiomyopathie diabétique**

##### **1.4.1. Contrôle cardiovasculaire**

En parallèle de la cardiomyopathie, la neuropathie cardiovasculaire autonome est une complication caractéristique du diabète qui se traduit par des dommages au niveau des fibres nerveuses autonomes qui innervent le cœur et les vaisseaux. En effet, des changements dégénératifs des neurones autonomes ont été observés dès 3 jours après l'induction d'un diabète expérimental par injection de streptozotocine (STZ) chez des rats (Schmidt et coll. 1983). Ces dommages résultent alors en des anomalies dans le contrôle de la fréquence cardiaque (FC) et de la dynamique vasculaire (Vinik et coll. 2003). Les études expérimentales s'accordent à dire qu'il existe une bradycardie et une hypotension de repos chez des animaux diabétiques 5 à 80 jours après l'induction du diabète par injection de STZ. (Maeda et coll. 1995a, b, Dall'Ago et coll. 1997, De Angelis et coll. 2000). Les mécanismes sous-jacents de ces altérations associées au diabète restent encore mal connus. Certains auteurs ont associés la bradycardie et l'hypotension à la réduction de la FC intrinsèque, du tonus vagal et du contrôle cardiovasculaire reflexe (Maeda et coll. 1995a, b, Dall'Ago et coll. 1997, De Angelis et coll. 2000), suggérant les prémices de dysfonctions autonomes. En effet, Maeda et coll. (1995a) ou encore De Angelis et coll. (2000) ont mis en évidence, dans le cœur de rat diabétique, une réduction du tonus vagal et le maintien du tonus sympathique évalué par blocage pharmacologique avec du propranolol et de la méthylatropine, respectivement. Ces résultats confirment ceux de Wegner et coll. (1987), suggérant bien une neuropathie cardiaque vagale. De plus, la bradycardie de repos chez des animaux rendus expérimentalement diabétiques a été attribué à des altérations au niveau du nœud sino-atrial avec une réduction concomitante de la FC intrinsèque (Senges et coll. 1980, Maeda et coll. 1995a, De Angelis et coll. 2000), bien que des altérations

fonctionnelles dans les mécanismes cholinergiques ne peuvent être exclues comme facteur causal. Ainsi, ces données indiquent que la fonction vagale et la FC intrinsèque sont diminués dans le diabète induit.

Il est important de noter que ces adaptations au niveau de la FC et du contrôle nerveux autonome semblent dépendantes de la durée du diabète. En effet, Hicks et coll. (1998) ont montré, que des rats traités à la STZ présentent (1) dans un 1<sup>er</sup> temps une augmentation importante de leur glycémie, puis (2) une réduction marquée de la FC durant les 15 premiers jours après le traitement, suivie d'un déclin plus progressif de plusieurs semaines, (3) une réduction dans la variation circadienne de la FC, (4) une diminution de la pression et (5) une réduction apparente au niveau du tonus nerveux sympathique et parasympathique. Ces mêmes auteurs ont démontré que 6 semaines de traitement à l'insuline restaurent partiellement ou complètement ces altérations, suggérant qu'elles résultent bien de l'état diabétique induit par l'injection de STZ. En effet, les rats traités à l'insuline ont une FC supérieure de 15 bpm comparée à celle des animaux diabétiques non traités.

Chez le patient diabétique, les effets du diabète sur la FC et le contrôle cardiaque nerveux autonome ne sont pas toujours consistants et en accord avec ceux retrouvés dans le modèle animal. Certaines études cliniques indiquent que le diabète est associé à de l'hypertension (Sundkvist et coll. 1980, Trujillo et coll. 1989, Ambepityia et coll. 1990) alors que d'autres ne montrent aucun changement au niveau de la pression artérielle (Mildenberger et coll. 1984, Paillole et coll. 1989). Chez l'homme, l'étiologie de l'hypertension dans le cas du diabète n'est pas claire mais elle est typiquement associée à la maladie de longue durée, et à des complications telles que l'athérosclérose, la néphropathie... Ces complications peuvent ainsi contribuer à expliquer la disparité entre les données obtenues chez l'homme et chez l'animal. De même, alors qu'une bradycardie est observée chez les animaux diabétiques, la majorité des études cliniques rapportent une tachycardie (Lloyd-Mostyn et Watkins 1975, Hilsted et coll. 1979) ou aucune variation de la FC de repos (Ambepitya et coll. 1990, Navarro et coll. 1991). Néanmoins, l'absence de bradycardie chez le patient diabétique peut en partie s'expliquer par le traitement thérapeutique systématique du diabète. En effet, les données de Hicks et coll. (1998) suggèrent que la bradycardie résulte de l'état diabétique puisque le traitement à l'insuline des animaux diabétiques renverse partiellement la bradycardie.

Il est généralement reconnu que les complications neuronales liées au diabète se développent progressivement chez l'homme. Les études cliniques montrent que cette neuropathie se traduit dans un 1<sup>er</sup> temps par une réduction de la variabilité de la FC, dont la détection apparaît subclinique (Ewing et coll. 1980, De Angelis 2002). Ensuite, les symptômes deviennent de plus en plus apparents. Il a été principalement démontré des dommages au niveau du nerf vague et en conséquence du tonus vagal, résultant en une tachycardie de repos puisque l'influence sympathique devient alors prédominante chez les patients diabétiques (Lloyd-Mostyn et Watkins 1975, Hilsted et coll. 1979). Le déclin de la fonction sympathique précède en effet l'altération du contrôle nerveux parasympathique (Eckberg et coll. 1986, Lishner et coll. 1987, Roy et coll. 1989). La FC est reportée plus basse chez des patients atteints de dysfonctions sympathique et parasympathique ; cependant, elle reste toujours plus élevée que chez des sujets non diabétiques (Ewing et coll. 1981).

Ainsi, les différences perçues et observées entre le diabète expérimental et la situation clinique peuvent résulter du modèle (animal ou humain) mais aussi de différences inhérentes à la forme d'induction du diabète : autonome ou chimique.

Cependant, quelque soit le modèle utilisé, ces changements associés au diabète dans le système de contrôle nerveux du cœur peuvent avoir de profonds effets sur le travail cardiaque qui se traduisent par un déclin important dans la fonction contractile cardiaque.

#### 1.4.2. Propriétés mécaniques : fonctions diastoliques et systoliques

Tant chez l'homme que chez l'animal, cette cardiomyopathie diabétique réduit de manière significative les performances cardiaques (Regan et coll. 1974, Feuvray et coll. 1979). Dans un premier temps, la cardiomyopathie diabétique se caractérise, sur le plan mécanique, par une altération de la fonction diastolique, responsable du processus de relaxation myocardique. Ce processus permet au cœur, dans des conditions normales, de revenir à des conditions initiales de longueur et de force. Il est relié à la fin de l'interaction de l'actine et de la myosine et au départ du calcium de la troponine C. Les anomalies de cette fonction diastolique caractéristiques de la cardiomyopathie diabétique sont la conséquence d'un ralentissement de la relaxation ventriculaire et/ou d'une diminution de la compliance. Les études cliniques comme expérimentales s'accordent à dire que les



paramètres de la relaxation active sont altérés dans le myocarde diabétique en l'absence de toutes autres maladies cardiaques (Fein et coll. 1980, Zarich et coll. 1988, Litwin et coll. 1990, Ishikawa et coll. 1999, Rajan et coll. 2002, Shen et coll. 2005). En effet, l'ensemble des études s'accordent sur le fait que le diabète prolonge significativement la phase de relaxation laquelle est exprimée en terme de durée de relaxation, de vitesse maximale de relaxation ou d'aire sous la courbe de la phase de relaxation (Fein et coll. 1980, Rodgers 1986, Davidoff et coll. 1990, Litwin et coll. 1990, Bouchard et Bose 1991, Brown et coll. 1993, Kotsanas et coll. 2000, Ren et Bode 2000, Trost et coll. 2002). Les caractéristiques de cette fonction anormale incluent donc une augmentation de la durée et une réduction du rythme de la relaxation ventriculaire (dépression de  $-dP/dt$ ) mesurée dans des muscles ventriculaires isolés (Fein et coll. 1980) et dans des cœurs isolés travaillants (Rodgers 1986, Davidoff et coll. 1990). Ces dysfonctions au niveau des propriétés actives de la relaxation myocardique sont apparentes dès 4-6 jours après l'induction du diabète (Ren et Davidoff 1997) et peuvent être observés dans diverses conditions incluant différentes longueurs de muscle, différentes fréquences de stimulations et diverses concentrations en calcium, glucose ou norépinephrine.

Par ailleurs, l'altération de la fonction diastolique peut aussi être la conséquence d'une modification des propriétés élastiques passives du ventricule gauche. En effet, le diabète est fortement associé à une diminution de la compliance ventriculaire, résultat d'une augmentation du tissu conjonctif interstitiel notamment liée à une accumulation de glycoprotéines (triglycérides) et de collagène. Ainsi, une pression élevée du ventricule gauche mesurée en fin de diastole est également caractéristique de la cardiomyopathie diabétique (Litwin et coll. 1990, Tsuchida et coll. 1994, Maghoub et Abd-Elfattah 1998, Golfman et coll. 1999). Bien que la raideur passive du myocarde ne soit pas élevée dans le cœur de rat diabétique 3 à 4 semaines après l'injection de 65 mg/kg de STZ, la pression ventriculaire en fin de diastole est augmentée (Litwin et coll. 1990, Tsuchida et coll. 1994, Golfman et coll. 1999), résultat d'une accentuation de la rigidité de la paroi cardiaque (Litwin et coll. 1990). Ces données suggèrent donc une diminution de la compliance diastolique au cours de la cardiomyopathie diabétique. Selon Litwin et coll. (1990), les animaux diabétiques présentent les caractéristiques précoces d'une cardiomyopathie dilatée. Si cette diminution de la compliance ventriculaire est également retrouvé chez le chien normoglycémique après un an de diabète induit par injection d'alloxan (Regan et coll. 1974, 1981), elle ne l'est pas dans le cœur de rat 8 semaines après l'injection de 55

mg/kg de STZ, bien que la pression ventriculaire développée soit diminuée (Penpargkul et coll. 1981).

Quoiqu'il en soit, les anomalies de la fonction diastolique ont pour conséquence une diminution du remplissage ventriculaire qui sera à la base de la détérioration de la fonction pompe et à long terme de l'insuffisance cardiaque.

En outre, une diminution de la fonction systolique est très souvent associée à ces altérations de la fonction diastolique. Elle apparaît généralement plus tardivement. En effet, il est désormais bien admis que les dommages diastoliques précèdent les dommages systoliques chez l'animal mais aussi chez l'homme (Raev 1993, 1994, Mihm et coll. 2001). Ainsi, aux stades avancés, les dysfonctions systoliques ventriculaires gauches deviennent prédominantes (Hamby et coll. 1974, Reagan et coll. 1977, Mahgoub et Abd-Elfattah 1998) avec pour conséquence une modification des paramètres de la contraction cardiaque. En effet, une contractilité cardiaque altérée est généralement retrouvée au cours du diabète (Fein et coll. 1980, Penpargkul et coll. 1980, Zarich et coll. 1988, Litwin et coll. 1990, Ren et Davidoff 1997, Ishikawa et coll. 1999, Kotsanas et coll. 2000, Rithalia et coll. 2004, Shen et coll. 2005). En effet, la force contractile des animaux atteints de diabète chronique est déprimée (Fein et coll. 1980, Penpargkul et coll. 1980, Vadlamuldi et Mc Neill 1980, Fein et coll. 1981, Schaible et coll. 1983, Pierce et Dhalla 1985). Ces dysfonctions systoliques se manifestent également par une diminution du pic de pression systolique, développée par le ventricule gauche (Penpargkul et coll. 1980, Maghoub et Abd-Elfattah 1998), par un rythme plus lent de développement de la pression systolique du ventricule gauche et donc par un rythme plus lent de contraction (dépression de  $+ dP/dt$ ) (Fein et coll. 1980, Penpargkul et coll. 1980, Liu et coll. 1997, Maghoub et Abd-Elfattah 1998). De plus, la vitesse maximale de contraction à charge nulle ( $V_{max}$ ) est l'index qui reflète le mieux les propriétés contractiles intrinsèques de la fibre musculaire cardiaque. La  $V_{max}$  mesurée sur le muscle ventriculaire est diminuée chez le rat diabétique (Fein et coll. 1980). Une dépression de la relation force-vitesse est observée dans les muscles ventriculaires au cours du diabète. Ainsi, la  $V_{max}$  de contraction isométrique mesurée sur le muscle ventriculaire est diminuée à toutes les charges testées chez le rat diabétique et la durée de la contraction isométrique est également allongée (Fein et coll. 1980). Malgré ces altérations, l'amplitude de la contraction n'est pas altérée par le diabète (Fein et coll. 1980, Ishikawa et coll. 1999, Rithalia et coll. 2004). L'ensemble de ces modifications contractiles se traduit par une

diminution concomitante du débit cardiaque (Penpargkul et coll. 1980) qui associée aux altérations de la fonction de relaxation sont à la base de la détérioration de la fonction cardiaque et à long terme de l'insuffisance cardiaque.

Notons que l'ensemble de ces altérations des fonctions diastoliques et systoliques sont au moins partiellement réversées avec un traitement à l'insuline chez des animaux diabétiques (Litwin et coll. 1990).

#### 1.4.3. La phase transitoire dans le développement de la cardiomyopathie diabétique

Il est aujourd'hui bien admis que cette cardiomyopathie diabétique, qui réduit de manière significative les performances cardiaques, est caractérisée dans les 1<sup>ers</sup> stades de la maladie par un ralentissement de la relaxation cardiaque, c'est-à-dire des dysfonctions diastoliques du VG, renforcée aux stades avancés par des dysfonctions systoliques (Hamby et coll. 1974, Regan et coll. 1977, Maghoub et Abd-Elfattah 1998). Ces caractéristiques suggèrent qu'il existe une phase transitoire dans le développement de la cardiomyopathie diabétique. En effet, des études sur les effets à court termes du diabète n'ont pas montré de signe apparent d'une altération de la fonction cardiaque durant les quatre premières semaines de la maladie (Depre et coll. 2000, Mihm et coll. 2001). Cependant, des résultats obtenus à partir du modèle de rat diabétique induit à la STZ indiquent qu'entre la 4<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine après le début de la maladie, un état transitoire se développe durant lequel quelques signes de dysfonctionnement deviennent évidents (Fein et coll. 1980, Yu et coll. 1997). D'ailleurs, l'étude de Ligeti et coll. (2006) met clairement en évidence la transition de la forme adaptative à la forme maladaptative de la cardiomyopathie diabétique. En effet, cette étude montre que les premiers signes d'altération de la contractilité cardiaque apparaissent dans les 6 semaines après le début de la maladie. Bien que la pression développée par le VG ne change pas, des détériorations de la lusitropie et de l'inotropie sont évidentes dans les cœurs diabétiques après 6 semaines de maladie.

Par ailleurs, ces altérations des propriétés contractiles observées au cours du diabète chronique ont été notamment attribuées à des perturbations dans les systèmes de régulation de la fonction cardiaque tels que le système  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ -AR) et/ou l'homéostasie du

Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Actuellement, rien de permet de dire quelle est la part exacte de chacun de ces paramètres dans le développement de la cardiomyopathie diabétique. Puisque une fonction  $\beta$ -adrénergique optimale est essentielle pour une gestion adéquate du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et donc pour un fonctionnement cardiaque normal, la suite de ce travail sera dans un 1<sup>er</sup> temps axé sur la régulation du système  $\beta$ -AR puis dans un 2<sup>nd</sup> temps, sur les mouvements du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire au cours de la cardiomyopathie diabétique.

## **2. LE SYSTEME $\beta$ -ADRENERGIQUE AU COURS DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABETIQUE**

### **2.1. Réponse cardiaque à la stimulation par des agonistes $\beta$ -adrénergiques au cours de la cardiomyopathie diabétique**

Une des plus importantes caractéristiques du cœur diabétique est la diminution de la réponse cardiaque à la stimulation par des agonistes  $\beta$ -AR qui apparaît des les premiers stades de la maladie. Ceci a été montré aussi bien chez des patients diabétiques (Berlin et coll. 1984) que dans les cœurs isolés (Ingebretsen et coll. 1981, Vadlamudi et coll. 1984, Bidasee et coll. 2003c) ou dans les muscles ventriculaires de rats diabétiques (Heyliger et coll. 1982, Atkins et coll. 1985, Takeda et coll. 1988, Yu et coll. 1991, 1994, Gando et coll. 1997). Ceci a été démontré en utilisant le test de sensibilité à l'isoprotérenol, un agoniste  $\beta$ -AR. Il s'agit d'une méthode reproductible permettant d'évaluer la sensibilité des récepteurs  $\beta$ -AR à la stimulation adrénérergique. Elle consiste à augmenter la dose d'isoprotérenol injectée jusqu'à l'obtention d'une augmentation de la fréquence cardiaque de 25 bpm par rapport à la valeur de base. En utilisant cette méthode, Berlin et coll. (1986) ont montré que la dose d'isoprotérenol nécessaire est significativement supérieure dans le groupe de patients diabétiques comparés à leurs homologues sains. Ces auteurs concluent alors que la sensibilité  $\beta$ -AR est diminuée chez les patients diabétiques, qu'elle varie en fonction de l'âge et de la durée de la maladie mais qu'elle est apparemment indépendante du niveau de glucose sanguin déterminé grâce à l'hémoglobine glyquée, HbA1c. De même, la réponse du cœur isolé perfusé à l'isoprotérenol est diminuée chez des animaux diabétiques comparés à des animaux contrôles, cette réponse étant exprimée par la  $\pm dT/dt$  (Ingebretsen et coll. 1981, Bidasee et coll. 2003c). Cette réponse altérée est retrouvée au niveau ventriculaire puisque la génération de force contractile suite à la

stimulation par de l'isoprotérenol est atténuée dans les préparations ventriculaires diabétiques comparées aux contrôles, et ce dès 4 semaines après l'induction du diabète (Heyliger et coll. 1982, Atkins et coll. 1985, Takeda et coll. 1988). Ces résultats sont confirmés par l'étude de Gando et coll. (1997) qui a montré que 4 à 6 semaines après l'induction du diabète par injection de STZ, les muscles papillaires des cœurs de rats présentent une réduction marquée des réponses inotropes positives (augmentation de la force de contraction) suite à la stimulation par divers agonistes  $\beta$ -AR (isoprotérenol, noradrénaline (NA), adrénaline (A) forskolin, isobutyl-1-méthylxantine et dibutylic-AMPc).

A l'heure actuelle, si les raisons de l'incapacité du myocarde diabétique à répondre efficacement aux stimulations  $\beta$ -AR ne sont pas encore totalement élucidées, elle pourrait être liée à des changements au niveau des récepteurs  $\beta$ -AR (diminution du nombre ou de l'affinité), conséquence de l'augmentation du relargage de catécholamines induite par le diabète (Ganguly et coll. 1987).

## **2.2. Concentrations myocardiques en catécholamines au cours de la cardiomyopathie diabétique**

Des altérations dans les niveaux de catécholamines endogènes de divers tissus provenant d'animaux diabétiques ou de patients diabétiques ont été reportées dans de nombreuses études. Il est cependant nécessaire de distinguer l'homme de l'animal puisqu'il existe des différences fondamentales entre les niveaux myocardiques de catécholamines mesurés dans ces 2 espèces. Ces différences majeures peuvent notamment s'expliquer par la durée du diabète (plus longue chez l'homme que chez l'animal) et par la présence de complications cardiovasculaires associées au diabète de longue durée.

Chez l'animal rendu expérimentalement diabétique, certaines études montrent des taux circulants de catécholamines et de NA dans le myocarde augmentés (Berkowitz et coll. 1980, Paulson et Light, 1981, Fushimi et coll. 1984, Ganguly et coll. 1986) ou inchangés (Kaul et Grewal, 1980, Atkins et coll. 1985, Akiyama et coll. 1989). Cependant, toutes s'accordent sur une activité sympathique augmentée dans le myocarde diabétique.

Berkowitz et coll. (1980) ont mesurés les niveaux de NA circulantes dans le sang veineux et artériel 4 et 16 semaines après l'induction du diabète par une injection de STZ ou d'alloxan. Les niveaux NA sont élevés uniquement dans le sang veineux et ce quelque soit

la durée du diabète. Les auteurs concluent alors à une augmentation de l'activité sympathique induite par l'état diabétique. Paulson et Light (1981) aboutissent à la même conclusion puisqu'ils retrouvent une augmentation des contenus en NA dans le sérum et dans les ventricules de rats diabétiques. Dans cette étude, l'hypothèse d'une augmentation de la sécrétion de NA par la médullo-surrénale, pour expliquer cette augmentation, est réfutée puisque le contenu en catécholamines au niveau de cette glande ne diffère pas entre les rats diabétiques et contrôles. Fushimi et coll. (1984) et Ganguly et coll. (1986) retrouvent également des concentrations en NA significativement supérieures dans le tissu cardiaque d'animaux diabétiques comparés à des animaux contrôles. Par ailleurs, Ganguly et coll. (1986) ont mesuré l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse et le métabolisme des catécholamines dans le cadre d'un diabète chronique induit expérimentalement chez le rat. Dans ce modèle, le diabète est non seulement associé à une augmentation de l'activité sympathique mais aussi à une augmentation de la synthèse et du recaptage de la NA par les terminaisons nerveuses sympathiques. Ceci permet une augmentation du turnover de cette hormone et donc de maintenir des concentrations élevées dans le cœur. Malgré des stocks endogènes cardiaques de NA inchangés, Kaul et Grewal (1980) a mis en évidence une augmentation marquée de l'excrétion urinaire de NA, d'A, et d'acide 3-methoxy-4-hydroxy mandélique, leur métabolite commun, indiquant une augmentation de l'activité sympathique. Cette augmentation de l'excrétion est observée dès le 3<sup>ème</sup> jour après l'injection de STZ. Le taux d'élimination de NA tritiée exogène, ici augmenté, est couramment utilisé pour estimer le turnover de la NA. Il est donc possible que l'augmentation de ce turnover dans le cœur puisse être attribuée à l'augmentation du contenu en NA relargué par les terminaisons nerveuses sympathiques. Ces auteurs concluent donc à une augmentation de l'activité sympathique chez les animaux diabétiques, reflétée par l'augmentation du rythme d'élimination de la NA tritiée et de l'excrétion urinaire des catécholamines. Par ailleurs, il semble que cette augmentation de l'activité sympathique dans le myocarde diabétique soit liée à la durée du diabète. En effet, Akiyama et coll. (1989) n'ont montré aucune différence significative dans les [NA] myocardiques entre des animaux diabétiques et contrôles 2 ou 4 semaines après l'induction du diabète. Cependant, 8 semaines après l'injection de STZ, ces concentrations sont significativement augmentées chez les rats diabétiques par rapport à leurs homologues contrôles. Ces données indiquent donc que l'augmentation de l'activité sympathique se fait

progressivement au cours du diabète, se traduisant notamment par des niveaux élevés de NA circulantes.

Cette activité anormale du système nerveux sympathique pourrait avoir un lien avec la physiopathologie des dysfonctions cardiovasculaires dans le diabète. En effet, les niveaux élevés de catécholamines plasmatiques dus à l'activité sympathique élevée pourraient conduire au développement de la cardiomyopathie diabétique. Des doses élevées de catécholamines produisent des dommages cellulaires myocardiques (Rona et coll. 1959) similaires à ceux observés chez les animaux diabétiques (Seager et coll. 1984). Ainsi, des niveaux de catécholamines exceptionnellement élevés dans le diabète, excédant la capacité de leur système d'inactivation normal, tel que la monoamine oxidase ou la cathécol-O-méthyltransférase, peuvent être déroutés vers d'autres mécanismes connus pour favoriser la formation d'adrénochrome et de radicaux libres (Dhalla et coll. 1985). Les radicaux libres et l'adrénochrome sont connus pour exercer des effets toxiques sur le myocarde (Singal et coll. 1981). Ainsi, il est certain que la NA et/ou les produits de l'oxydation des catécholamines peuvent être impliqués dans la production des dommages cellulaires cardiaques dans le diabète (Dhalla et coll. 1985).

Le diabète expérimental est donc associé à une augmentation de l'activité nerveuse sympathique reflétée par l'augmentation des concentrations en NA au niveau plasmatique et myocardique, par une synthèse accrue, un captage, une libération ou encore un turnover élevés (Ganguly et coll. 1986, 1987). Cependant, les différentes études s'accordent sur le fait qu'un traitement adéquat à l'insuline prévient ces altérations. En effet, une insulinothérapie chez les animaux diabétiques normalise ces changements catécholaminergiques observés au niveau myocardique (Savarese et Berkowitz 1979, Ganguly et coll. 1986, 1987, Akiyama et coll. 1989). Il apparaît alors clairement que l'insuline joue un rôle crucial dans la régulation de l'activité nerveuse sympathique et que la déficience en insuline dans le cas du diabète est fortement impliquée dans la physiopathologie de la cardiomyopathie diabétique.

Par ailleurs, les données chez l'homme apportent des données supplémentaires dans la compréhension de l'installation progressive des perturbations du système sympathique. En effet, si une augmentation de l'activité sympathique associée à des niveaux élevés de NA circulantes a également été retrouvée chez des patients diabétiques mal contrôlés (Christensen 1974), des [NA] considérablement diminuées ont été retrouvés dans le

système cardiovasculaire post-mortem de patients diabétiques de longue durée avec neuropathie (Neubauer et Christensen 1976). Dans le cœur diabétique, la valeur moyenne est de 10% inférieure à celle des contrôles et dans le système artériel, les [NA] sont comprises entre 9 et 20% des valeurs contrôles. La [NA] est davantage réduite dans le tissu post-mortem que dans les tissus obtenus sur des patients diabétiques vivants (Christensen 1972, 1973). Ceci peut s'expliquer par le fait que la durée du diabète est très importante dans l'étude post-mortem (en moyenne 28 ans) et que beaucoup de patients ont des maladies associées au diabète qui pourraient contribuer aux dommages du système adrénergique. La [NA] dans le système cardiovasculaire des patients diabétiques est, cependant, uniformément réduite chez tous les patients, indépendamment de leur maladie terminale, suggérant que le facteur principal responsable de la neuropathie est représenté par les désordres métaboliques associés au diabète de longue durée. Ainsi, la déplétion des stocks de NA qui semble associée au diabète de longue durée peut être d'une importance fondamentale dans l'infarctus du myocarde diabétique, où une activité adrénergique élevée est nécessaire pour maintenir une performance myocardique adéquate.

Ainsi, ces données chez l'homme associées à celles obtenues chez l'animal suggèrent qu'il existe une installation progressive, dans le temps, des perturbations du système sympathique. Celle-ci passerait par plusieurs étapes : tout d'abord une augmentation de l'activité sympathique se traduisant par une augmentation des [NA] myocardiques (mise en évidence en particulier chez l'animal et le patient diabétique) puis une diminution de l'activité sympathique se traduisant par une diminution des [NA] (mise en évidence dans les tissus humains post-mortem).

Dans la mesure où des variations dans les contenus en catécholamines et notamment en NA sont connues pour modifier la densité des récepteurs  $\beta$ -AR, nous nous sommes intéressés dans le paragraphe suivant à la densité de ces récepteurs au cours de la cardiomyopathie diabétique.



### **2.3. Densité des récepteurs $\beta$ -adrénergiques cardiaques au cours de la cardiomyopathie diabétique**

Des réponses inotropes positives à la stimulation à  $\beta$ -AR (isoprotérenol) ainsi qu'une réduction du nombre de site de fixation sur les récepteurs  $\beta$ -AR (sans aucun changement dans les constantes d'affinité) ont été observée dans des préparations isolées de muscle papillaire diabétique (Heyliger et coll. 1982). Les auteurs suggèrent alors que ces réponses contractiles atténuées pourraient être expliquées par des altérations de la densité des récepteurs  $\beta$ -AR. En effet, un changement dans le nombre de récepteurs a déjà été démontré dans des conditions pathologiques nombreuses et variées incluant l'hypertrophie cardiaque (Limas 1979), l'insuffisance cardiaque chronique (Karliner et coll. 1980). Les résultats de l'étude de Heyliger et coll. (1982) montrant après 8 semaines de diabète, une diminution du nombre de récepteurs  $\beta$ -AR sans altération de leur affinité confirment des travaux précédents sur le modèle de diabète chronique expérimental (Savarese et Berkowitz 1979) et sont retrouvés également après seulement 2 ou 4 semaines de diabète (Atkins et coll. 1985) ou lorsque le diabète est induit par une injection d'une autre drogue, l'alloxan (Ingebretsen et coll. 1983). En effet, dans cette dernière étude, la courbe de saturation de la fixation du [<sup>3</sup>H]-dihydroalprénolol (ligand spécifique des récepteurs  $\beta$ -AR) fournit une valeur de  $B_{\max}$  de 96,3 fmol/mg de protéines dans les préparations membranaires contrôles contre seulement 47,6 fmol/mg dans les préparations diabétiques. Cependant, la diminution du nombre de récepteur  $\beta$ -AR dans les membranes diabétiques n'est pas non plus accompagnée d'une diminution de l'affinité de ces récepteurs pour leurs agonistes. Latifpour et McNeill (1984) ont également mis en évidence après plusieurs mois de diabète expérimental, une diminution du nombre de récepteurs  $\beta$ -AR dans des préparations membranaires de ventricule gauche grâce à l'utilisation de [<sup>3</sup>H]dihydroalprenolol. En utilisant une technique similaire, Nishio et coll. (1988) ont constaté une diminution du nombre de récepteurs  $\beta$ -AR au niveau de la membrane plasmique cardiaque isolée « proportionnelle » à la durée du diabète. Cette diminution était de 29% après une semaine de diabète induit, de 50% après 3 semaines et de 49% après 10 semaines. Les auteurs concluent alors que l'altération de la réponse cardiaque aux agonistes  $\beta$ -AR chez les animaux diabétiques est spécifiquement associée à une déficience dans la densité des récepteurs  $\beta$ -AR de la membrane plasmique cardiaque. Ainsi, ce défaut

de récepteur pourrait expliquer en partie l'incapacité du myocarde à répondre aux stimulations adrénérgiques pendant le diabète.

Heyliger et coll. (1982) suggèrent que la diminution dans les récepteurs  $\beta$ -AR cardiaques observée dans le diabète pourrait être due au mécanisme de « down-régulation ». Cette diminution de récepteur serait une réponse à l'augmentation de leurs neurotransmetteurs, les catécholamines, dans le diabète expérimental et clinique (Paulson et coll. 1980, Christensen et coll. 1974) et notamment dans le tissu ventriculaire provenant d'animaux diabétiques (Paulson et coll. 1981). Cette suggestion repose sur le fait que des concentrations élevées en catécholamines sont connues pour réduire la densité des récepteurs  $\beta$ -AR (Mickey et coll. 1975) dans divers tissus dont le coeur. Cependant, Atkins et coll. (1985) considèrent que la « down-régulation » des récepteurs  $\beta$ -AR induite par les catécholamines n'est pas le seul mécanisme responsable de la diminution de la densité des récepteurs avec le diabète puisque dans cette étude, des taux de catécholamines normaux ont été mesurés chez les rats diabétiques. Cette divergence pourrait être en partie liée à la durée du diabète relativement courte dans cette étude puisque les expérimentations ne sont réalisées seulement après 2 ou 4 semaines après l'injection de STZ contre plusieurs mois dans les études précédentes.

Il apparaît fondamental de préciser que dans ces études relativement anciennes aucune distinction n'est faite entre les différents sous types de récepteurs  $\beta$ -AR. Or la diminution d'activité au niveau de la fonction cardiaque du diabétique peut être due à des modifications spécifiques de chacun des sous types de récepteurs  $\beta$ -AR.

Pour identifier les causes de cette diminution d'activité, Dinçer et coll. (2001) ont étudiés les effets à long terme du diabète sur l'expression des 3 sous types de récepteurs  $\beta$ -AR. Douze semaines après l'injection de streptozotocine, les niveaux d'ARNm et de protéines codant pour les récepteurs  $\beta$ -adrénérgiques ont été déterminés. Les niveaux d'ARNm et de protéines des  $\beta$ 1-AR diminuent de  $34,9 \pm 5,8$  et  $44,4 \pm 5,8\%$  respectivement, chez les rats diabétiques comparés aux contrôles. A l'inverse, les niveaux d'ARNm codant pour les  $\beta$ 2-AR et  $\beta$ 3-AR augmentent de  $72,5 \pm 16,6$  et  $97,3 \pm 26,1\%$  respectivement. Cependant, il est noté une augmentation proportionnelle des protéines des  $\beta$ 3 AR ( $100,0 \pm 17\%$ ) alors que les protéines des  $\beta$ 2-AR diminuent de  $82,6 \pm 1,1\%$  par rapport aux contrôles. La signification physiologique de la diminution du niveau des protéines  $\beta$ 2-AR cardiaques malgré

l'augmentation du niveau de leur ARNm reste encore aujourd'hui à clarifier. Par ailleurs, les auteurs concluent que la diminution de la réponse des cœurs diabétiques à la stimulation  $\beta$ -AR peut être due à la diminution de l'expression des  $\beta$ 1-AR et à l'augmentation des  $\beta$ 3-AR. Ces changements dans le niveau d'expression des  $\beta$ 1-AR et des  $\beta$ 3-AR peuvent être en partie expliqués par le contenu cardiaque en noradrénaline augmenté chez les rats diabétiques comparés aux rats contrôles (Paulson et coll. 1981, Ganguly et coll. 1986). Ainsi, des concentrations chroniquement élevées en NA dans le diabète pourraient contribuer à une down-régulation sélective des récepteurs  $\beta$ 1-AR et à une up-regulation sélective des récepteurs  $\beta$ 3-AR.

A notre connaissance, il existe très peu d'études dans la littérature à s'être intéressée aux effets d'un traitement à l'insuline sur la voie de signalisation  $\beta$ -AR. Il apparaît toutefois qu'un traitement à l'insuline puisse renverser les effets du diabète sur le nombre de récepteurs  $\beta$ -AR. En effet, si le nombre de récepteurs  $\beta$ -AR est significativement diminué déjà après une semaine de diabète (Nishio et coll. 1988), 2 semaines de traitement à l'insuline peuvent augmenter de manière significative la densité de ces récepteurs dans le myocarde diabétique après 10 ou 12 semaines de diabète (Nishio et coll. 1988, Dinçer et coll. 2001). Nishio et coll. (1988) observent une augmentation significative des récepteurs  $\beta$ -AR de 152% après 2 semaines de traitement qui permet d'approcher la densité de récepteurs des préparations contrôles. Par ailleurs, Dinçer et coll. (2001) ont montré qu'un traitement à l'insuline de 2 semaines après 12 semaines de diabète influence différemment les 3 sous-types de récepteurs. En effet, si le traitement restaure partiellement le niveau d'ARNm codant pour les récepteurs  $\beta$ 1-AR à environ 60% du niveau contrôle, il ne renverse pas l'augmentation des ARNm codant pour les récepteurs  $\beta$ 2-AR induite par le diabète. En ce qui concerne les messagers codant pour les récepteurs  $\beta$ 3-AR, le traitement à l'insuline atténue seulement partiellement (environ 30%) l'augmentation associée au diabète. Cependant, le traitement à l'insuline ne semble pas avoir les mêmes effets sur les niveaux protéiques des récepteurs. En effet, le traitement en insuline restaure partiellement l'expression des  $\beta$ 1-AR à  $84,4 \pm 4,8\%$  du niveau contrôle, complètement celle des  $\beta$ 2-AR à  $100,9 \pm 4,8\%$  et atténue significativement celle des  $\beta$ 3-AR ( $118,9 \pm 18,7\%$ ). Ainsi, il apparaît que le traitement à l'insuline influence positivement la densité des récepteurs  $\beta$ -AR en renversant plus ou moins les effets du diabète.

Pour compléter leurs études, Dinçer et coll. (2003) se sont également intéressés aux récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR chez le patient diabétique. Ils ont alors déterminé les effets du diabète sur les niveaux d'ARNm codant pour les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR (impliqués dans les réponses inotropes et chronotropes) dans le tissu atrial humain. Dans ce tissu, l'expression des ARNm codant pour les récepteurs  $\beta_1$ -AR est fortement diminuée alors que celle des  $\beta_2$ -AR est modérément diminuée. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'effet du niveau élevé de catécholamines est principalement médié par les  $\beta_1$ -AR, puisque l'affinité des catécholamines pour les récepteurs  $\beta_2$ -AR est moins importante.

Par ailleurs, les récepteurs  $\beta$ -AR existent non seulement comme des récepteurs exposés sur la surface externe de la cellule mais aussi comme des récepteurs internalisés (Stiles et coll. 1984, Mahan et coll. 1987). Ainsi, 70% du nombre total de récepteurs dans la cellule est exposé à la surface de la cellule chez des rats Wistar normaux. Kashiwagi et coll. (1989) ont ainsi mesuré les différences au niveau de la concentration des récepteurs  $\beta$ -AR à la surface de la cellule et de la concentration totale de récepteur  $\beta$ -AR dans les cardiomyocytes entre des rats contrôles et diabétiques STZ. Ceci pour voir si la diminution des récepteurs  $\beta$ -AR cardiaque dans le diabète a pour origine la diminution de la concentration totale de récepteur dans la cellule ou une déficience en récepteurs exprimés à la surface de la membrane. Il ont ainsi mis en évidence une diminution des récepteurs  $\beta$ -AR à la surface de la cellule (en utilisant un antagoniste  $\beta$ -AR hydrophile, le [ $^3$ H]-CGP 12177) chez les rats diabétiques STZ (10 semaines) sans aucun changement dans le nombre total de site-récepteurs  $\beta$ -AR dans les cardiomyocytes isolés déterminé grâce à l'antagoniste non spécifique  $\beta$ -AR hydrophobique, le [ $^{125}$ I]-ICYP. Ces données suggèrent fortement que la diminution du nombre de récepteurs  $\beta$ -AR cardiaques, chez les rats diabétiques, observée dans les études antérieures résulte d'une déficience spécifique des récepteurs fonctionnels qui sont localisés sur la membrane plasmatique. Il est bien connu que les récepteurs  $\beta$ -AR peuvent réversiblement s'internaliser de la membrane cellulaire vers le pool intracellulaire en réponse à un agoniste  $\beta$ -AR et peuvent être recyclés du pool intracellulaire vers la membrane plasmatique (Stiles et coll. 1984, Mahan et coll. 1987). Ainsi, la diminution des récepteurs  $\beta$ -AR à la surface de la cellule chez les rats diabétiques pourrait être expliquée par une augmentation de l'internalisation des récepteurs de la surface vers le pool intracellulaire ou par une altération de leur recyclage ou encore des 2 à la fois. Dans cette étude de Kashiwagi et coll. (1989), le degré de down-regulation des

récepteurs  $\beta$ -AR en présence de 10  $\mu$ M d'isoprotérenol est moindre chez les rats diabétiques comparés aux contrôles. En plus, la récupération des récepteurs à la surface de la cellule après le lavage de l'isoprotérenol est aussi altérée chez les rats diabétiques. Ces résultats suggèrent que l'externalisation des récepteurs  $\beta$ -AR cardiaques des rats diabétiques est altérée.

Par ailleurs, bien que la densité des récepteurs  $\beta$ -AR soit diminuée dans le myocarde diabétique, l'affinité des récepteurs pour leur agoniste ou encore la proportion de récepteurs à haute affinité ne sont pas modifiées (Heyliger et coll. 1982, Ingebretsen et coll. 1983, Gando et coll. 1997). Or l'état de haute affinité de ces récepteurs est connu pour être leur forme physiologique optimale puisque sous cette forme ils sont fonctionnellement couplés à la protéine G (De Lean et al. 1980). Ainsi, le couplage des récepteurs  $\beta$ -AR avec la protéine G n'est pas altéré dans le myocarde diabétique. Gando et coll. (1997) concluent alors que le défaut potentiel dans la réponse inotrope positive à la stimulation par des agonistes  $\beta$ -AR réside au-delà des récepteurs  $\beta$ -AR plutôt qu'au niveau même des récepteurs.

Ainsi, dans le paragraphe suivant, nous allons nous intéresser aux évènements post-récepteurs qui influencent la réponse  $\beta$ -AR au niveau de l'adénylate cyclase (Sundaresan et coll. 1984, Ingebersten et coll. 1981) ou de la protéine G, et ce indépendamment des changements dans les propriétés du récepteur lui-même.

#### **2.4. Système « récepteurs $\beta$ -AR / protéine G / adénylate cyclase » au cours de la cardiomyopathie diabétique**

Le système catécholamines – adénylate cyclase (AC) est composé d'au moins 3 composants protéiques distincts : le récepteur  $\beta$ -AR, la sous-unité catalytique qui convertit l'ATP en AMPc et la protéine G qui médie l'action hormonale.

Trois types de protéines G ont été identifiés dans le tissu ventriculaire (Foster et coll. 1990). La Gs médie la stimulation de l'AC et la modulation des canaux calciques voltage-dépendant via les récepteurs  $\beta$ -AR. La Gi médie l'inhibition de l'activité de l'AC stimulée par la voie  $\beta$ -AR grâce aux récepteurs muscariniques cholinergiques (Roof et coll. 1985, Liang et Galper 1988) et aux récepteurs à l'adénosine (Neumann et coll. 1989) et couple directement les récepteurs muscariniques aux canaux calciques (Roberts et coll. 1992). La

Go présente dans le tissu cardiovasculaire (Asano et coll. 1988, Luetje et coll. 1988, Foster et coll. 1990) est couplée au récepteur  $\beta_3$ -AR. Des altérations dans l'intégrité fonctionnelle de l'une des sous-unités du système catécholamines – AC pourraient altérer l'expression et l'activité de l'AC et ainsi, expliquer la diminution de la sensibilité aux catécholamines au cours du diabète (Smith et coll. 1984).

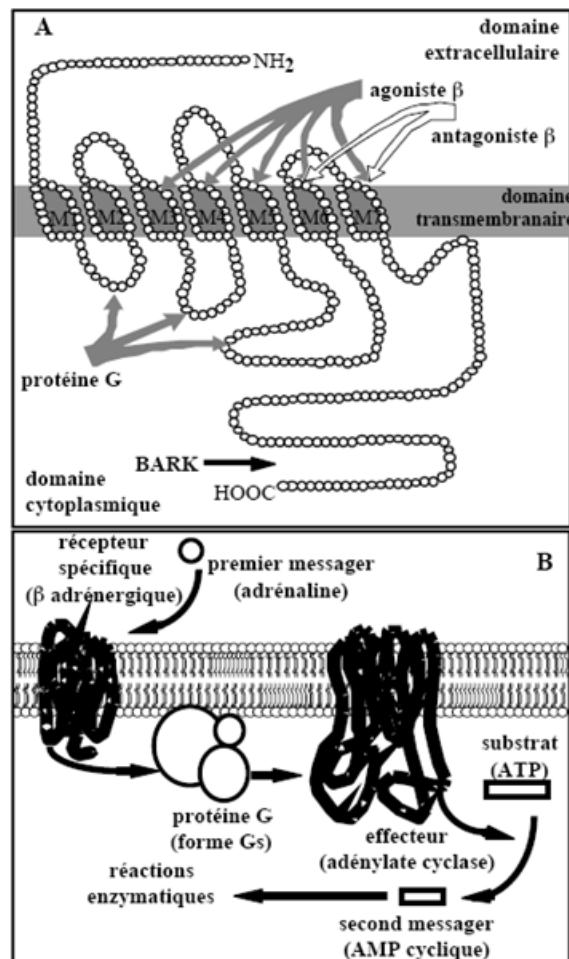
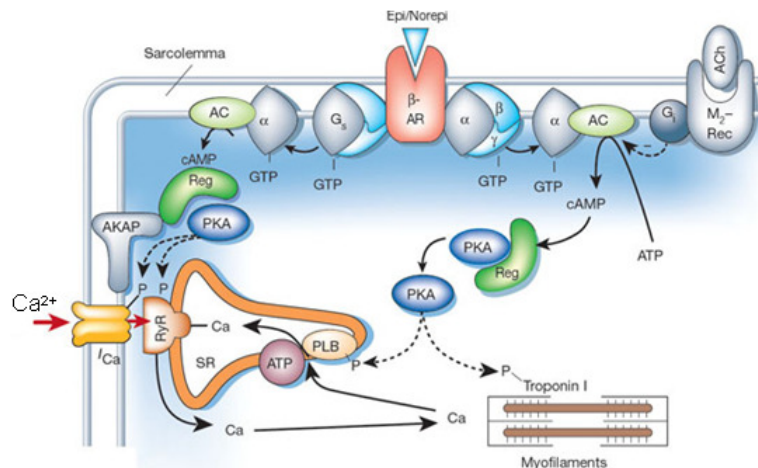


Figure 2: A. Schéma de la structure moléculaire d'un récepteur  $\beta$ -adrénergique mettant en évidence les trois parties : la partie transmembranaire intervient comme poche de fixation du ligand agoniste ou antagoniste. La partie intracytoplasmique s'articule avec la protéine G. L'intervention d'une kinase peut phosphoryler l'extrémité du récepteur et le désensibiliser - B. Schématisation du fonctionnement du récepteur  $\beta$ -adrénergique avec la liaison du ligand ou premier messenger au récepteur, la stimulation de la protéine G avec activation de l'effecteur, l'adénylate cyclase (AC). L'adénine monophosphate cyclique (AMPc) formée à partir de l'ATP est le second messenger avec les réactions enzymatiques secondaires responsables de l'effet.

Les altérations dans les réponses cardiaques inotropes à une stimulation  $\beta$ -adrénergique s'expliqueraient plutôt par une fonction altérée de la protéine G (Wichelhaus et coll. 1994, Gando et coll. 1997), par un couplage non fonctionnel entre les récepteurs  $\beta$ -AR et l'AC (Gotzsche et coll. 1983, Nishio et coll. 1988), ou encore par des altérations des fonctions cellulaires au-delà de l'AC (Gando et coll. 1997).



**Figure 3:** Voie de signalisation du système  $\beta$ -adrénergique chez le rat (d'après Bers 2002) (AC, adénylate cyclase, ACh, acétylcholine,  $\beta$ AR, récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, M2-Rec, récepteurs muscariniques, cAMP = AMP cyclique, PKA = protéine kinase A, PLB = phospholamban, RyR, récepteur de la ryanodine, SR, réticulum sarcoplasmique).

Dans le cas du diabète, si Gando et coll. (1997) conclut que le couplage des récepteurs  $\beta$ -AR avec la protéine G n'est pas altérée dans le myocarde diabétique, d'autres auteurs ont reporté une altération de l'expression de la protéine G (Gawler et coll. 1987, Bushfield et coll. 1990, Griffith et coll. 1990), et / ou un défaut fonctionnel intrinsèque de la protéine G elle-même (Bushfield et coll. 1990, Green et Johnson, 1991). En effet, une diminution de l'expression et de l'activité de la protéine G et plus particulièrement de sa sous-unité  $G_i$  est retrouvée dans ces cellules (Gawler et coll. 1987, Green et Johnson 1991). Par ailleurs, des analyses immunologiques sur les membranes plasmiques de cardiomyocytes ventriculaires révèlent la présence de 3 sous-unités  $\alpha$  de la protéine  $G_s$  avec des masses moléculaires de 45, 47 et 52 kDa (Wichelhaus et coll. 1994, Gando et coll. 1997). De plus, les cardiomyocytes contiennent également la protéine  $G_{i-2}$  (41 kDa) et la protéine  $G_o$  (39 kDa).

Néanmoins, l'influence de l'état diabétique sur chacune de ces protéines G est clairement différente. Les cellules cardiaques provenant des rats diabétiques ne présentent pas de modification de l'expression des protéines Gs, alors que l'expression de  $G_{i-2}$  et  $G_o$  est réduite de 58 et 27% respectivement (Wichelhaus et coll. 1994, Gando et coll. 1997). Ainsi, Gando et coll. (1997) concluent que le niveau myocardique de protéine G ne peut pas être une composante clé de la diminution de la réponse inotrope positive à la stimulation  $\beta$ -AR dans le diabète puisque la protéine Gs qui médie la stimulation de l'AC n'est pas sous-exprimée.

Les études concernant l'activité de l'AC stimulée par des agonistes  $\beta$ -AR dans le cas du diabète s'accordent sur une préservation de celle-ci. En effet, l'étude d'Ingebretsen et coll. (1983) suggère que si le diabète induit une réduction du nombre de récepteurs  $\beta$ -AR cardiaques, le traitement à l'alloxan n'altère pas l'activité de l'AC, à l'état basal ou en présence de NaF, de GppNHp (un analogue du GTP, guanosine triphosphate), d'isoprotérenol ou encore de forskolin qui ont des effets inotropes positifs. Ainsi, l'état diabétique ne semble pas diminuer l'effet stimulant du NaF, du GppNHp, de l'isoprotérenol ou encore du forskolin sur l'AC. Une activité inchangée de l'AC par l'état diabétique est également retrouvée lorsque le diabète est induit par une injection de STZ. En effet, après 8 semaines ou 10 semaines (Nishio et coll. 1988) de diabète, l'activité de base et l'activité stimulée de l'AC avec du forskolin, du NaF ou du GppNHp ne sont pas significativement différentes entre les animaux diabétiques et les animaux contrôles. Cependant, il apparaît une diminution significative de l'activité de l'AC stimulée par l'adrénaline (Smith et coll. 1984) ou par l'isoprotérenol (Nishio et coll. 1988) dans les préparations diabétiques. Dans cette étude, le forskolin active l'AC, par interaction directe avec l'unité catalytique, de la même manière dans les préparations diabétiques et contrôles, indiquant qu'aucune altération de l'unité catalytique n'apparaît durant le diabète chronique expérimental. La protéine G (unité régulatrice) est connue pour favoriser les effets stimulants du NaF et du GppNHp. L'intégrité de cette unité régulatrice est établie par la similarité des activités de l'AC stimulées par le GppNHp entre les cœurs contrôles et diabétiques. Ces résultats n'indiquent donc aucun changement majeur au niveau du couplage des récepteurs  $\beta$ -AR avec l'AC, de l'activité de l'AC ou des propriétés catalytiques de cette enzyme dans les cœurs diabétiques. Puisque la densité des récepteurs  $\beta$ -AR est diminuée, dans cette même étude, sans aucun changement dans leurs affinités dans le diabète induit à la STZ, il est fort probable que la diminution observée dans



l'activité de l'AC stimulée par l'adrénaline ou par l'isoprotérenol soit due à la réduction du nombre de récepteurs  $\beta$ -AR dans les préparations diabétiques. Une diminution de la sensibilité de l'AC à une stimulation par de l'isoprotérenol associée à une diminution du nombre de récepteurs adrénergiques a aussi été obtenue après 4 semaines de diabète induit (Atkins et coll. 1985). Cependant, la capacité de stimulation de l'AC avec du NaF ou du forskolin, agents qui n'interagissent pas avec les récepteurs, n'est pas altérée chez les animaux diabétiques. Ainsi, les auteurs concluent sur la possibilité d'altérations au niveau du couplage fonctionnel des récepteurs  $\beta$ -AR myocardiques avec l'AC. Cette hypothèse est également émise par Gotzsche et coll. (1983). Dans cette étude, une diminution substantielle de la production d'AMPc suite à une stimulation par l'isoprotérenol a été observée dans des préparations myocardiques diabétiques comparées à des préparations contrôles. De plus, un traitement à la thyroxine, connu pour sensibiliser le myocarde aux catécholamines, ne normalise pas cette réponse. Ainsi, il apparaît que l'isoprotérenol est incapable d'augmenter la production d'AMPc alors que la stimulation via la protéine G, avec du NaF ou du GTP, engendre une réponse en AMPc identique à celle obtenue dans les préparations contrôles. Puisque dans cette étude de Gotzsche et coll. (1983), le nombre et l'affinité des récepteurs  $\beta$ -AR tendent à être identiques dans les préparations contrôles et diabétiques, un couplage non fonctionnel entre les récepteurs  $\beta$ -AR et l'AC apparaît ainsi exister dans le diabète expérimental.

Gando et coll. (1997) résume alors la voie de signalisation du système  $\beta$ -AR dans le myocarde de rat diabétique de la manière suivante : le myocarde diabétique présente une diminution de l'action inotrope positive en réponse à la stimulation  $\beta$ -AR. Selon ces auteurs, la réduction du nombre de récepteurs  $\beta$ -AR myocardiques et leur couplage à la protéine Gs ne peuvent pas expliquer à eux seul la dépression fonctionnelle. Au niveau protéique, la protéine Gi est nettement diminuée, alors que la protéine Gs est inchangée. Le résultat est une stimulation non altérée de l'adénylate cyclase par les récepteurs  $\beta$ -AR. Ainsi, la génération d'AMPc peut se réaliser normalement sous la stimulation  $\beta$ -AR. Dans la mesure où la relation entre l'AMPc et l'activation des protéines kinases est préservée dans le diabète (Ingebretsen et coll. 1981), l'AMPc active la protéine kinase A (PKA) qui est capable de phosphoryler toute une série de protéines incluant les protéines régulatrices du calcium. La diminution des réponses fonctionnelles dans le myocarde diabétique apparaît donc comme le résultat d'altérations au-delà du stade de l'activation de l'AC mais avant la machinerie contractile. Plus spécifiquement, la phosphorylation des protéines

régulatrices du calcium est altérée dans le diabète, ce qui peut être associé à une diminution du rythme de relargage et/ ou de repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS, induisant notamment une diminution de la réponse inotrope positive à la stimulation  $\beta$ -AR.

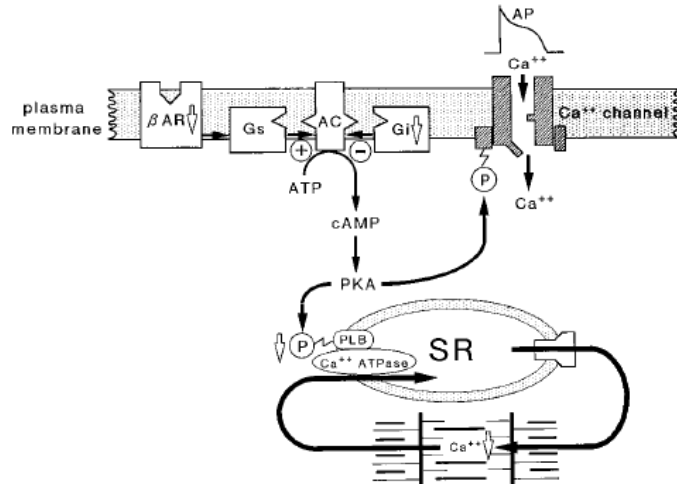


Figure 4: Voie de signalisation du système  $\beta$ -adrénergique chez le rat diabétique  
(d'après Gando et coll. 1997)

(AC, adénylate cyclase,  $\beta$ AR, récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, cAMP = AMP cyclique, PKA = protéine kinase A, PLB = phospholamban, AP, potentiel d'action).

Par ailleurs, il est important de préciser que des études *in vivo* (Nishio et coll. 1988) ont montré qu'un traitement à l'insuline pouvait augmenter l'activité de l'AC stimulée par de l'isoprotérenol pour atteindre des valeurs proches de celles obtenues dans les préparations contrôles.

Nous venons de voir que des perturbations dans le système  $\beta$ -AR et notamment au delà de l'activation de l'AC peuvent en partie expliquer la diminution de la réponse inotrope positive à la stimulation  $\beta$ -AR. Cependant, il est également suggérer que des altérations de la phosphorylation, par l'intermédiaire de la voie  $\beta$ -AR, de certaines protéines membranaires impliquées dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire puissent être en partie responsables des modifications l'homéostasie calcique et donc de la contractilité. Le chapitre suivant vise donc à décrire les principales caractéristiques des mouvements du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire au cours de la cardiomyopathie diabétique, en portant une attention particulière aux protéines membranaires impliquées dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. En effet, puisque une gestion adéquate du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est essentielle

pour un fonctionnement cardiaque normal, il est possible que les modifications dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, médiée par ces protéines membranaires, soit une caractéristique de la transition vers un mauvais fonctionnement de la fonction cardiaque.

### **3. MOUVEMENTS DE CALCIUM DANS LA CARDIOMYOPATHIE DIABETIQUE**

#### **3.1. Homéostasie calcique dans le cardiomyocyte normal**

##### 3.1.1. Couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction représente l'ensemble des phénomènes par lesquels l'excitation électrique de la cellule cardiaque entraîne le développement de la force et le raccourcissement du muscle. Le déclenchement des contractions du cœur des mammifères se fait sous l'influence de potentiels d'action apparaissant au niveau d'un tissu particulier, le tissu nodal. Cette stimulation se propage ensuite à l'ensemble des cellules du myocarde. Le SL représente l'interface de la cellule avec le milieu extracellulaire et est, de ce fait, le siège de nombreux échanges. Le SL est caractérisé par des invaginations, appelées système transverse ou T-tubules, qui pénètrent à l'intérieur de la cellule, généralement entre deux myofibrilles. Le système transverse permet la transmission de l'excitation électrique de la périphérie vers les profondeurs de la cellule, et joue donc un rôle déterminant dans le couplage excitation-contraction (EC).

L'ion calcium joue un rôle central dans ce couplage EC qui met en oeuvre trois structures principales du myocyte: le SL, le RS et les myofibrilles (Gordon et coll. 2000). En effet, il est désormais bien admis que la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  régule l'activité des muscles et notamment du muscle cardiaque.

La contraction cardiaque résulte donc de la dépolarisation membranaire provoquée par l'entrée des ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule qui permet l'ouverture des canaux calciques de type L du SL puis l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par ces canaux. Cependant, les premières études réalisées sur des fibres cardiaques dénudées de mammifères ont montré que la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  qui entre dans la cellule via le SL est insuffisante pour activer directement les myofilaments et donc pour déclencher la contraction. Ces données indiquent donc que le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le RS, principal site de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule cardiaque, est

déterminant pour la contraction (Fabiato et Fabiato 1975, 1978, Fabiato 1982). Cette découverte a donc amené Alexandre et Françoise Fabiato (1978) à parler du "Calcium-Induced Calcium Release" (CICR).

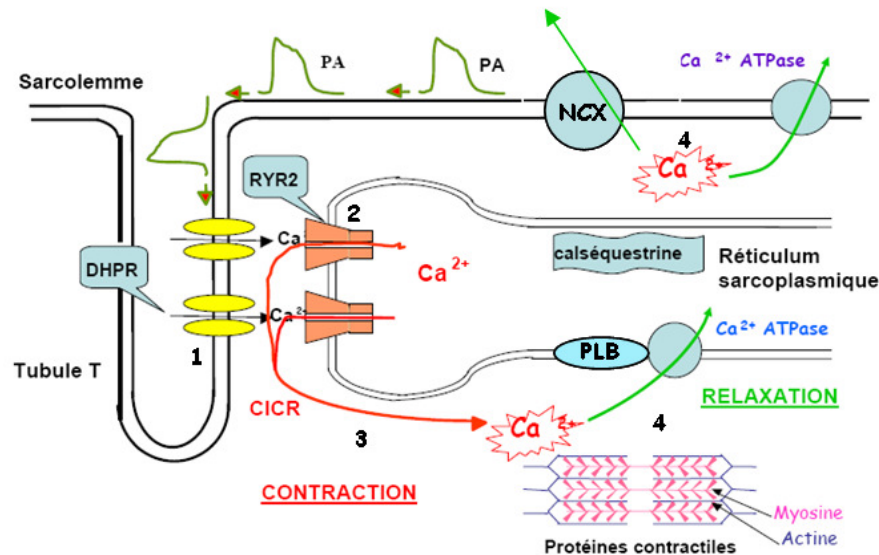


Figure 5 : Modèle du Calcium-Induced Calcium Release (CICR)

Dans ce modèle, l'onde de dépolarisation provoquée par l'entrée des ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule permet l'ouverture des canaux calciques lents (type L) localisés au niveau du SL et dont l'activation dépend du voltage (phase 1). Cette entrée très rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule cardiaque provoque à son tour l'ouverture de canaux calciques situés au niveau du RS, les récepteurs de la ryanodine (RyR), (phase 2). Ceci entraîne une libération massive du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le RS (phase 3).

L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) va permettre à la contraction de débuter. En effet, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi libérés se fixent sur la troponine C, ce qui induit un changement de conformation des protéines du complexe troponine – tropomyosine puis la formation de ponts entre l'actine et la myosine permettant le glissement des filaments épais sur les filaments fins, ce qui engendre le raccourcissement des sarcomères et la contraction.

Pour que la relaxation se produise, la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) doit diminuer. Au cours de la relaxation, le  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire est alors repompé dans le RS par la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) (phase 4) et extrudé de la cellule essentiellement par l'échangeur NCX mais aussi par la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du SL. La formation de

complexes macromoléculaires autour de chacune des protéines permettant ces mouvements de  $\text{Ca}^{2+}$  est un élément clé de la régulation du couplage EC. Dans le muscle cardiaque, l'état contracté est associé à une forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu intracellulaire (1-2  $\mu\text{M}$ ), tandis que l'état relâché est associé à une faible concentration (0,1-0,2  $\mu\text{M}$ ). Les phases de contraction et de relaxation du myocarde sont donc reliées aux variations cycliques de la concentration calcique intracellulaire appelées transitoire calcique.

### 3.1.2. Transitoire calcique

La transitoire calcique ( $\text{Ca}^{2+}$ -transient des anglosaxons) définit l'ensemble des mouvements du  $\text{Ca}^{2+}$  au cours d'un cycle de contraction-relaxation du myocyte cardiaque. Elle se décompose en deux phases : la première en quelques millisecondes est due à l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et au CICR et correspond à une forte augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (de 100 nM à 1  $\mu\text{M}$ ) ; pendant la seconde phase, beaucoup plus lente, la diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  jusqu'à son niveau diastolique est due au repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS et à l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  et provoque la relaxation. La durée totale de ce mécanisme est d'environ 300 millisecondes chez le rat et varie en fonction des espèces (Bers 2002).

La découverte par Cheng et coll. (1993) des « étincelles de  $\text{Ca}^{2+}$  » ( $\text{Ca}^{2+}$  sparks), qui correspondent à un relargage spontané du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RS a apporté un nouvel éclairage sur la genèse du CICR. La microscopie confocale qui permet de visualiser une libération localisée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les RyR a montré que l'ouverture d'un seul canal calcique de type L est suffisante pour entraîner une libération spontanée et localisée de  $\text{Ca}^{2+}$ , en activant un ou plusieurs RyR. Cette étincelle est limitée dans le temps (environ 40 ms) et dans l'espace (environ 2  $\mu\text{m}$ ) atteignant un pic de concentration calcique d'environ 300 nM. Ces phénomènes sont à la base de la théorie du couplage excitation-contraction appelée "contrôle local" du relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS par l'influx calcique au travers du SL (Wier et coll. 1994). Wier et coll. (1994) montrent que les courants calciques ainsi que les transitoires calciques observés au niveau de la cellule entière ne sont pas représentatifs des phénomènes qui se passent localement. En effet, les courants unitaires des canaux calciques du SL et du RS varient localement et induisent des réponses locales, différentes de celles observées macroscopiquement. Ceci confère donc au couplage EC une propriété fondamentale, celle d'être modulable. C'est l'amplitude du courant calcique (reflet du

nombre de charges ou d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  transportés par les canaux calciques) qui détermine la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  libérée par le RS et ainsi la force de contraction de la cellule. Le caractère modulé du couplage EC est apparu très tôt comme contradictoire avec le fait que le  $\text{Ca}^{2+}$  est le facteur déclenchant de sa propre libération (CICR). Un tel processus devrait aboutir à un système fonctionnant sur le mode du tout ou-rien (libération autocatalytique du  $\text{Ca}^{2+}$ ) puisque, même de faibles variations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire devraient activer de proche en proche l'ensemble des RyR. M.D. Stern (1992) a montré que le caractère modulable du couplage EC est incompatible avec l'existence d'un espace de diffusion commun au  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans la cellule et à celui relargué par le RS (théorie du *common pool model*). Pour résoudre ce qu'il est communément appelé le paradoxe du couplage excitation-contraction, Stern a proposé l'existence d'un contrôle local de l'activation des RyR qui pourrait être exercé par les canaux calciques interagissant avec quelques RyR. L'ensemble fonctionnerait comme une « synapse calcique », véritable unité élémentaire, séparée fonctionnellement ou anatomiquement des autres unités. Il existe des arguments architecturaux en faveur d'un contrôle local du couplage électromécanique représentés par les diades qui permettent le contact étroit entre les canaux calciques et les RyR. L'utilisation de la microscopie confocale permettant de visualiser des variations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans des micro-espaces cellulaires a apporté des arguments décisifs en faveur de l'existence d'un contrôle local du couplage EC. Il a ainsi été observé des variations de  $\text{Ca}^{2+}$  de faible amplitude (quelques dizaines de nM) de quelques  $\mu\text{m}$  de circonférence qui, en l'absence de surcharge calcique du réticulum sarcoplasmique, n'entraînent pas d'activité calcique propagée. L'ouverture des canaux calciques, lors de la dépolarisation membranaire, entraîne une augmentation de la probabilité de survenue des étincelles calciques, dont l'amplitude et la durée restent par ailleurs inchangées (Cannell et coll. 1994, Lopez-Lopez et coll. 1995, Santana et coll. 1996). Si bien que l'idée qui prévaut actuellement est que la variation globale systolique du  $\text{Ca}^{2+}$  est le résultat de la sommation d'événements élémentaires représentés par l'ouverture d'un canal calcique et de l'activation des quelques RyR qui lui sont associés, confirmant ainsi la théorie de Stern sur le contrôle local du couplage EC.

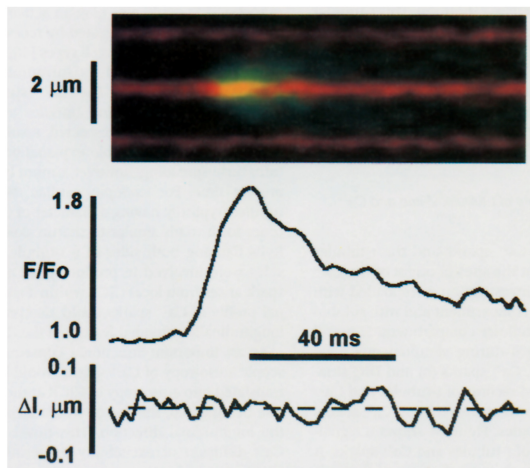


Figure 6 : En haut : images des étincelles calciques et des tubules T. Au milieu : variation en fonction du temps de la  $[Ca^{2+}]_i$  locale (transitoire calcique). En bas : variation en fonction du temps de la distance entre les tubules T pendant les étincelles calciques. (Cheng et coll. 1996).

### 3.1.3. Localisation du CICR : la diade

La structure clé du CICR est la diade. Cette structure visible en microscopie électronique correspond au rapprochement, à l'intérieur du myocyte, de la membrane plasmique invaginée sous forme de tubules-T et de la partie terminale (domaine jonctionnel) du RS. Cette structure est particulièrement bien représentée chez les mammifères où elle permet, dans une cellule dont le diamètre est élevé, d'activer de façon synchronisée l'influx calcique et l'ensemble des unités de relargage calcique, les RyR (Franzini-Amstrong et coll. 2005). Les canaux calciques et les RyR sont co-localisés dans les diades au niveau de structures appelées couplons. Mais l'organisation du couplon dans le cardiomyocyte (25 canaux calciques pour 100 RyR) est plus aléatoire que dans le muscle squelettique (25 canaux calciques pour 50 RyR) (Franzini-Amstrong et coll. 2005). Cette structure est donc à l'origine du couplage entre les 2 types de canaux, permettant ainsi le CICR : le canal calcique du SL et le RyR.

Un point important doit être souligné : le rétro-contrôle positif du CICR doit impérativement être interrompu pour que le cœur puisse se remplir en diastole. Trois mécanismes ont été proposés : 1) la diminution du contenu calcique du RS, connue pour moduler l'activité des RyR2, 2) la fermeture simultanée des canaux calciques de type L et des RyR2 et 3) l'inactivation ou adaptation des RyR2 mettant en jeu une fermeture du canal devenu réfractaire, mécanisme le plus généralement accepté (Bers 2002). Ce mécanisme, décrit par Valdivia et coll. (1995) est accéléré par la phosphorylation des

RyR2 par la PKA qui diminue la probabilité d'ouverture du canal mais peut être suivie par une réactivation rapide à une  $[Ca^{2+}]$  plus élevée.

#### 3.1.4. Repompage du $Ca^{2+}$ dans le RS et efflux calcique hors de la cellule

La relaxation du myocyte cardiaque est liée à la diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$ , le  $Ca^{2+}$  cytosolique étant repompé par une  $Ca^{2+}$ -ATPase vers l'intérieur du RS (70-90%), chassé hors de la cellule par l'échangeur échangeur sodium-calcium (NCX) (7-28 %) et pour une faible part (1-2%) par la pompe calcique ATP-dépendante ( $Ca^{2+}$ -ATPase) du SL et par les mitochondries par l'uniport mitochondrial (Bers 2002). Ces activités varient en fonction des espèces et les chiffres donnés ici concernent l'homme ou le lapin alors que chez le rat, le repompage du  $Ca^{2+}$  à l'intérieur du RS par l'intermédiaire de la  $Ca^{2+}$ -ATPase du RS est de l'ordre de 92 % et l'extrusion du  $Ca^{2+}$  via le NCX de l'ordre de 7 %. Il est important de noter que, pour maintenir l'homéostasie calcique au cours des contractions successives, la quantité de  $Ca^{2+}$  qui entre dans le myocyte par le canal calcique de type L doit être équivalente à celle qui est expulsée de la cellule par NCX et  $Ca^{2+}$ -ATPase du SL. De même, la quantité de  $Ca^{2+}$  repompée par la  $Ca^{2+}$ -ATPase doit être équivalente à celle libérée du RS par RyR2. La connaissance du rôle de chacune des protéines impliquées dans la relaxation a fortement bénéficié de l'utilisation des modèles murins de surexpression et d'inactivation de ces protéines (Kiriakis et Kranias 2000).

Dans la mesure où les altérations des propriétés contractiles observées au cours du diabète chronique ont notamment été attribuées à des perturbations dans l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, il nous semble intéressant de détailler dans le paragraphe suivant les principales caractéristiques des mouvements intracellulaires de  $Ca^{2+}$ , et d'autre part, le devenir des principales protéines membranaires impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique au cours de la cardiomyopathie diabétique.



### **3.2. Mouvements intracellulaires de calcium au cours de la cardiomyopathie diabétique**

Les mesures de la concentration calcique intracellulaire dans des préparations cardiaques diabétiques, comme dans des myocytes ventriculaires, sont controversées. Il a ainsi été reporté grâce à l'utilisation de fura-2 que la concentration calcique intracellulaire mesurée sur myocytes isolés non stimulés de rats diabétiques STZ est plus faible que celles de myocytes contrôles ( $53 \pm 3$  nM dans les myocytes diabétiques et  $75 \pm 5$  nM dans les myocytes contrôles) (Noda et coll. 1992). Un niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire plus faible a aussi été noté par d'autres équipes de recherche telles que Horackova et Murphy (1988) avec une méthode radioisotopique, Lagadic-Gossmann et coll. (1996) en utilisant l'indo-1, ou encore Ren et Bode (2000) avec du fura-2.

Néanmoins, cette diminution de la concentration diastolique de  $\text{Ca}^{2+}$  au cours du diabète n'est pas retrouvée par tous les auteurs. Aucun changement significatif dans la concentration basale de calcium intracellulaire n'a été reporté par Yu et coll. (1994), Ha et coll. (1999), Hattori et coll. (2000) alors que Choi et coll. (2002) ou encore Yaras et coll. (2005) notent des concentrations diastoliques de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire plus élevées dans les cardiomyocytes isolés de rats diabétiques comparés à celles des rats contrôles.

Concernant les concentrations systoliques de  $\text{Ca}^{2+}$ , Hattori et coll. (2000) retrouvent des niveaux similaires entre les myocytes ventriculaires isolés de rats diabétiques et ceux de rats contrôles. Par contre, pour Lagadic-Gossmann et coll. (1996), ces concentrations systoliques de  $\text{Ca}^{2+}$  sont significativement réduites par le diabète. Le pic systolique de  $\text{Ca}^{2+}$ , mesuré suite à une application de caféine, est également diminué dans les myocytes ventriculaires gauches des animaux diabétiques (Bouchard et Bose 1991, Yu et coll. 1994, Lagadic-Gossmann et coll. 1996, Ren et Davidoff 1997, Tamada et coll. 1998, Rithalia et coll. 2004) ou inchangée (Hattori et coll. 2004). Si le pic systolique de la transitoire calcique, induit par la caféine, représente la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  libérée par le RS (index du contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  du RS), ces résultats signifient que celle-ci est soit diminuée soit inchangée.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats disparates quant aux effets du diabète sur les concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, ces résultats contradictoires peuvent être en partie attribués aux différences de conditions expérimentales pour évaluer les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, à des variations de

la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'extérieur des cardiomyocytes ou encore à la sévérité et/ou à la durée du diabète, ces 2 dernières étant des éléments déterminants dans le stade de développement de la cardiomyopathie diabétique.

Ainsi, puisque la gestion du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire joue un rôle central dans la fonction cardiaque (Bers 2000, Ligeti et coll. (2006) ont cherché à déterminer si la modification des mouvements du calcium libre intracellulaire induite par le diabète sous-tend les détériorations des performances hémodynamiques durant la phase transitoire du développement de la cardiomyopathie diabétique.

Un des résultats majeurs de cette étude est que les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire en fin de diastole sont doublés au cours de la 6<sup>ème</sup> semaine de diabète. De plus, les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  systoliques sont aussi significativement augmentés dans les cœurs diabétiques. Précédemment, il a été démontré que 4 semaines de diabète n'induit pas d'altérations significatives des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Hattori et coll. 2000, Buijs et coll. 2005). Ces observations suggèrent que, durant la phase transitoire du diabète, une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire se développe dans les cœurs diabétiques.

Cette augmentation des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire en fin de diastole indique certainement une diminution de la fonction de la SERCA2, comme indiquée par la réduction de la  $V_{\max}$  du transporteur dans la phase transitoire du diabète (Ligeti et coll. 2006). Néanmoins, un rôle négatif du NCX dans le départ du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire du cytoplasme vers le milieu extracellulaire durant la diastole ne peut pas être exclu puisqu'il a été montré que l'activité de cette protéine est diminuée dans le cœur diabétique (Schaffer et coll. 1997, Hattori et coll. 2000). La concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  est également fortement dépendante des étincelles calciques, relargages locaux de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du RS. L'équipe de Shao et coll. (2007) a montré que la fréquence des étincelles calciques est deux fois plus importante dans les cardiomyocytes diabétiques comparés aux cardiomyocytes contrôles, mais que par contre leur amplitude est plus faible. L'équipe de Yaras et coll. (2005) ont également rapporté des étincelles calciques plus lentes et plus fréquentes dans le diabète. Ces auteurs suggèrent alors que l'augmentation de la fréquence des étincelles calciques entraîne une augmentation de la libération diastolique du  $\text{Ca}^{2+}$  pouvant alors appauvrir la réserve calcique du RS, et en conséquence contribuer à l'altération de la transitoire calcique observée dans les cœurs diabétiques.

En effet, une des caractéristiques les plus importantes du myocarde diabétique est la lenteur de la transitoire calcique (Yu et coll. 1994, Lagadic-Gossmann et coll. 1996, Ren et

Davidoff 1997, Ha et coll. 1999, Ishikawa et coll. 1999, Kotsanas et coll. 2000, Ren et Bode 2000, Dutta et coll. 2002, Rithalia et coll. 2004). Celle-ci va de pair avec une phase de contraction plus lente et plus spécifiquement avec une relaxation prolongée sans changement dans la tension pic développée (Fein et coll. 1980, Takeda et coll. 1988, Lagadic-Gossmann et Feuvray 1990). En effet, la diminution de la concentration systolique pic de  $\text{Ca}^{2+}$  et celle du rythme de déclin de la transitoire calcique intracellulaire sont corrélés avec la prolongation des phases de contraction et de relaxation dans des cardiomyocytes isolés diabétiques (Penpargkul et coll. 1981, Ren et Davidoff 1997). De plus, la cinétique des mouvements intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ , mesurée à l'aide de sondes fluorescentes (Fura 2, Indo 1), est ralentie dans les cœurs de rats diabétiques. Si les durées de la transitoire calcique et de la contraction sont prolongées dans les myocytes ventriculaires isolés des rats diabétiques, l'amplitude de ces phénomènes n'est pas modifiée par le diabète (Ishikawa et coll. 1999, Rithalia et coll. 2004). Il faut cependant noter que le ralentissement de la transitoire calcique se situe dans la phase de relaxation et se traduit donc par un déclin plus lent de la transitoire. Cette caractéristique de la transitoire calcique dans la cardiomyopathie diabétique peut participer au ralentissement de la relaxation observée dans le myocarde diabétique (Fein et coll. 1980, Yu et coll. 1994, Okayama et coll. 1994).

L'ensemble des mécanismes impliqués dans le déclin de la transitoire calcique est inhibé par le diabète (Penpargkul et coll. 1981, Ganguly et coll. 1983, Lopaschuk et coll. 1983, Makino et coll. 1987). Ainsi, l'utilisation de thapsigargin, un inhibiteur de la SERCA2, a permis de montrer que le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par la SERCA2 participe pour 79% de l'efflux total du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique chez les rats normaux et pour seulement 72% chez les rats diabétiques. L'inhibition de la SERCA2 qui apparaît lors du diabète pourrait ainsi être la cause principale du rallongement de la transitoire calcique. Il pourrait aussi participer à la diminution du contenu calcique du RS observée dans le diabète (Yu et coll. 1995).

Ces données indiquent que le prolongement de la transitoire calcique dans le diabète peut être au moins en partie dû à une diminution du recaptage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS par la SERCA2. Par contre, dans des cas pathologiques où la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  augmente fortement, le prolongement de la transitoire serait principalement dû à une diminution de l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule par le NCX et non une altération du recaptage de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS (Hattori et coll. 2000).

Les mouvements du  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire sont donc modifiés au cours du diabète insulino-dépendant. Il nous semble donc intéressant de compléter ces données en portant une attention particulière au devenir des principales protéines membranaires impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique au cours de la cardiomyopathie diabétique.

### **3.3. Evolution des principales protéines membranaires impliquées dans la régulation des mouvements calciques intracellulaires au cours de la cardiomyopathie diabétique**

#### **3.3.1. Canal calcique de type L du sarcolemme**

##### **3.3.1.1 Caractéristiques du canal calcique de type L**

Les canaux calciques de type L (pour « long lasting ») (Rougier et coll. 1969) concentrés dans les tubules T du SL, sont les premiers acteurs majeurs du couplage EC. Il est important de préciser qu'une autre forme de canaux calciques est présente dans les myocytes cardiaques : les canaux de type T (pour « transient ») (Nilius et coll. 1985). Cependant, ils ne semblent pas pouvoir intervenir dans le déclenchement de la contraction. C'est pour cette raison que dans la suite de ce travail nous détaillerons uniquement les caractéristiques du canal calcique de type L, dépendant du potentiel.

Le canal calcique de type L est caractérisé par une large conductance, un courant de longue durée et une activation pour des potentiels élevés. Ce canal calcique est activé par la dépolarisation membranaire et s'ouvre pour des potentiels de l'ordre -40 mV. Il est sensible à la stimulation adrénergique et l'influx calcique est limité par son inactivation lente  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante du côté cytosolique.

Ce type de canal a souvent été caractérisé par leur sensibilité aux dihydropyridines (DHP), et c'est pour cette raison qu'il est parfois dénommé récepteur des DHP. La plupart des DHP agissent comme des bloqueurs du canal calcique de type L et donc comme des antagonistes (nitrendipine, nifédipine), mais quelques uns agissent comme des agonistes (- Bay K 8644 contrairement au +Bay K 8644).

Les canaux calciques de type L sont constitués d'une sous-unité principale,  $\alpha_1$ , qui forme le pore du canal. Cette sous-unité  $\alpha_1$  qui contient le pore de conduction et le senseur de

voltage est associée à trois autres sous-unités  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$  et  $\delta$  qui en réglant son activité participent à la régulation du canal (Catterall 2000).

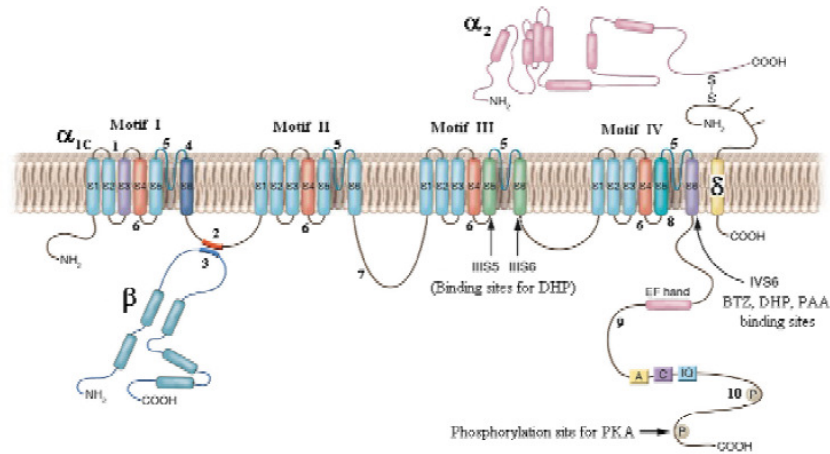


Figure 7 : Structure d'un canal calcique de type L (d'après Treinys et Jurevičius, 2008)

Comme les autres protéines responsables des mouvements du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, les canaux calciques de type L sont accompagnés de protéines régulatrices parmi lesquelles :

- 1) la calmoduline protéine de la famille des EF-Hands qui servirait de senseur calcique capable d'inactiver ou de favoriser son activité;
- 2) la sorcine, protéine de 22 kDa ayant une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  qui réalise un pont entre les canaux calciques de type L et les RyR et accélère la vitesse de fermeture du canal (Meyers et coll. 1998);
- 3) l'ANHAK (« géante » en hébreu) qui interagit avec la sous-unité  $\beta_2$  des canaux calciques de type L et permet ainsi la liaison de ces canaux calciques de type L aux filaments d'actine.

### 3.3.1.2 Devenir du canal calcique de type L au cours de la cardiomyopathie diabétique

Bien que de nombreux mécanismes contrôlent les mouvements du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, les canaux calciques voltages sensitifs et plus particulièrement les canaux calciques de type L du sarcolemme représentent l'un des facteurs déterminants de la fonction cardiaque. Les études de binding ne permettent pas de réels consensus quant aux effets du diabète sur les canaux calciques de type L. En effet, ces études montrent aucun changement, une augmentation ou une diminution de ces canaux dans des préparations membranaires de

tissu ventriculaire de rats diabétiques STZ (Nishio et coll. 1990, Yu et Mc Neill 1991, Lee et coll. 1992).

Lee et coll. (1992) ont montré, dès 3 semaines après l'induction du diabète, une diminution du nombre de récepteurs à la dihydropyridine, mesurée par la fixation du [<sup>3</sup>H]-nitrendipine, dans les préparations membranaires isolées à partir de cœur de rats diabétiques STZ, alors même que leur affinité pour les antagonistes calciques est augmentée (diminution de Kd). Selon ces auteurs, cette diminution de la densité des récepteurs avec le diabète suggère une diminution dans le nombre de canaux calciques de type L dans le sarcolemme. Résultat, l'influx calcique, déclencheur calcique essentiel pour la libération du Ca<sup>2+</sup> du RS, pourrait être diminué. Ceci expliquerait alors au moins en partie la diminution de force contractile cardiaque développée dans le diabète chronique. Par contre, l'augmentation de l'affinité de ces canaux calciques pourrait partiellement expliquer l'augmentation de la sensibilité des cœurs diabétiques au Ca<sup>2+</sup>. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec les données de Nishio et coll. (1990) sur le binding du [<sup>3</sup>H]PN 200-110 (un autre ligand dérivé dihydropyridine) sur les membranes cardiaques diabétiques.

En effet, une augmentation de 64 % dans le Bmax du binding de [<sup>3</sup>H]PN 200-110 sur les membranes musculaires cardiaques isolées de rats diabétiques STZ, comparés à des rats contrôles, a été mise en évidence par Nishio et coll. (1990), 10 semaines après l'induction de l'état diabétique. Les auteurs concluent que cette augmentation est dépendante de la durée du diabète puisque 3 semaines après l'induction du diabète, aucune différence n'est observée entre les préparations membranaires diabétiques et contrôles. L'augmentation significative apparaît après 6 semaines de diabète et l'augmentation la plus importante du Bmax est obtenue à 12 semaines de diabète. Cette augmentation du Bmax est retrouvée sans aucune différence dans le Kd entre les 2 types de préparations, diabétiques et contrôles. Yu et coll. (1995) suggèrent également une augmentation de l'activité du canal calcique de type L dans des myocytes ventriculaires de rats 6 semaines après l'injection de STZ. En effet, les variations maximales de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> au KCl, agent qui cause un influx calcique au niveau de la membrane du SL par dépolarisation, sont augmentées dans les cellules diabétiques comparées à des cellules contrôles.

Par ailleurs, Yu et Mc Neill (1991) ont montré que 6 semaines après l'injection de STZ, les oreillettes de rats Wistar-Kyoto traités à la STZ ne montrent pas d'hypersensibilité au BAY K 8644, un agoniste des canaux calciques. En plus, ils ont reporté que la fixation du

[<sup>3</sup>H]PN 200-110 sur des homogénats cardiaques n'est pas différentes entre les rats Wistar diabétiques et les rats contrôles.

La divergence de résultats entre ces 4 études pourrait être due à l'intensité du diabète (dose de STZ injectée) et au stade de la maladie. En effet, comme le démontre l'étude de Nishio et coll. (1990), 6 semaines de diabète semble être une période critique quant aux effets de la maladie sur le Bmax du binding de [<sup>3</sup>H]PN 200-110. Il peut aussi être incriminé les différences dans les conditions expérimentales utilisées pour la préparation des membranes (homogénats cardiaques, ventriculaires, atrial...) ou la détermination du binding de dihydropyridine.

Néanmoins, ces résultats indiquent que les canaux calciques sensibles au voltage dans le muscle cardiaque isolé de rats diabétiques STZ sont quantitativement et qualitativement altérés. De plus, il semble que ces altérations sont dépendantes de la durée du diabète puisque l'augmentation du Bmax du binding du [<sup>3</sup>H]PN 200-110, observée dans les préparations membranaires des rats diabétiques, n'est retrouvée que 6 semaines après l'injection de STZ (Nishio et coll. 1990). Ainsi, l'augmentation d'activité de ces canaux calciques voltage dépendants peut contribuer à l'augmentation de l'influx calcique et donc à la surcharge calcique, représentée par la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> cytosolique élevée, dans le cœur diabétique.

Par ailleurs, il apparaît que l'augmentation de ces canaux calciques de type L au cours de la cardiomyopathie diabétique est significativement inhibée et normalisée à un niveau contrôle par 8 semaines de traitement intensif en insuline (Nishio et coll. 1990).

Les études électrophysiologiques du courant calcique ont également donné lieu à des résultats divergents. Lors d'une étude de patch-clamp sur myocytes ventriculaires isolés de rats diabétiques (8 à 12 semaines après l'injection de 60 mg/kg de STZ), Bracken et coll. (2004) ont montré que la densité du courant I<sub>Ca,L</sub> est significativement réduite entre des voltages de -10 et +10 mV. De même, dans des myocytes ventriculaires isolés de rats Wistar diabétiques depuis 3-4 semaines (STZ, 40 mg/kg), Chattou et coll. (1999) observent une diminution de la densité du courant I<sub>Ca,L</sub> pour des potentiels tests compris entre -10 et +50 mV. Une diminution de l'amplitude de ce courant est également notée. Au préalable, Wang et coll. (1995) avaient déjà mis en évidence une densité de I<sub>Ca</sub> diminuée dans des myocytes ventriculaires isolés de rats ayant un diabète chronique (24-30 semaines – STZ,

65 mg/kg). Il apparaît de plus que la réduction de la densité de  $I_{Ca}$  est plus marquée dans l'étude de Wang et coll. (1995) dans laquelle la durée et la sévérité du diabète sont plus importantes ( $I_{Ca}$  pic à 0 mV est réduite de 68% pour Wang et coll. (1995) et de 50% pour Chattou et coll. (1999)). Cependant, la diminution de  $I_{Ca}$  n'est pas observée dans les études antérieures où les rats ont reçus une plus faible dose de STZ (40 mg/kg) et pour qui la durée du diabète n'a pas excédé 8 semaines: la densité de  $I_{Ca}$  des cellules cardiaques diabétiques est comparable à celle des cellules normales (Magyar et coll. 1992), ou légèrement augmentée mais de manière non significative (Jourdon et Feuvray 1993). Ainsi, pour ces derniers auteurs, le diabète n'induit pas de changement significatif dans le nombre de canaux calciques membranaires fonctionnels ou dans la dépendance au voltage pour l'ouverture et l'inactivation de ces canaux. De même, aucune différence n'est observée au niveau des effets stimulants de l'isoprotérenol, du forskolin et du DBcAMP sur le courant calcique de type L entre des myocytes de rats contrôles et diabétiques (Tamada et coll. 1998). Toutes les études électrophysiologiques ont été réalisées sur des animaux diabétiques chimiquement induits. Puisque le facteur génétique joue un rôle très important dans le développement du diabète, Tsuchida et coll. (1994) ont voulu tester des rats génétiquement diabétiques (WNB/Kob). Le courant calcique des cardiomyocytes n'est pas significativement altéré chez les rats génétiquement prédisposés au diabète comparés aux rats contrôles.

Les différences observées sont vraisemblablement liées à la concentration de drogue injectée, à l'état de diabète et/ou aux techniques employées. Cependant, la durée du diabète semble un élément déterminant : plus la durée de la maladie est importante, plus sévères sont les altérations de la fonction des canaux calciques.

### 3.3.2. Le canal calcique du RS ou récepteur à la ryanodine (RyR2)

#### 3.3.2.1 Caractéristiques du RyR2

La superfamille de protéines-canaux capables de libérer de façon dépendante du ligand le  $Ca^{2+}$  présent dans le RS comprend les RyR (RyR1, RyR2 et RyR3) et le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3R). RyR2 est l'isoforme majoritaire des cardiomyocytes. C'est un homotétramère de 4 sous-unités de 565 kDa chacune. Chaque sous-unité est formée d'une large partie cytoplasmique N-terminale (80% de la protéine) et de 4 segments



transmembranaires en partie C-terminale. Cette partie transmembranaire forme le pore du canal permettant le passage du  $\text{Ca}^{2+}$ . Mais l'unité de relargage est, en fait, un complexe macromoléculaire associé au RyR2 et comportant des kinases, des phosphatases, des protéines adaptatrices et des protéines d'ancrage. Ainsi, sur chaque sous-unité du RyR2 peuvent se fixer une molécule d'immunophiline FK-506 Binding protein 12.6 (FKBP12.6), de PKA et ses sous-unités régulatrices (RII), de protéine d'ancrage mAKAP, de protéine phosphatase 1 (PP1), et de protéine phosphatase 2A (PP2A). Cette organisation est responsable du mécanisme appelé « coupled gating » (Marx et coll. 2001). L'activité de RyR2 est régulée par phosphorylation par les protéines kinases A, C, G et la protéine kinase  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-dépendante (CamKII). Elle est également régulée par la protéine FKBP12.6 et inhibée par la sorcine qui favorise la fermeture du canal. Des travaux récents ont montré que FKBP12 et FKBP12.6, co-exprimées dans le cœur, stabilisent les homotétramères et catalysent l'ouverture coordonnée des canaux sur un mode « tout ou rien ». La phosphorylation par la PKA, en augmentant fortement la probabilité et/ou la vitesse d'ouverture du canal, active le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  en systole. Par contre, une hyperphosphorylation du RyR2 par la PKA déstabilise le complexe RyR2/FKBP12.6 et provoque une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  (Marx et coll. 2000). Ce mécanisme jouerait un rôle important au cours de l'insuffisance cardiaque et dans la survenue de certaines arythmies (Wehrens et coll. 2005). Ainsi, des mutations du gène du RyR2 sont à l'origine de tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques dont le mécanisme exact reste encore débattu (Lehnart et coll. 2004, Priori et Napolitano 2005) mais qui semble lié à une hyperphosphorylation du RyR2.

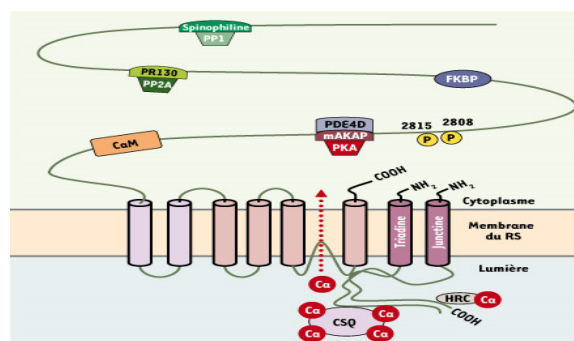


Figure 8 : Structure d'un RyR2

### 3.3.2.2 Devenir du RyR2 au cours du diabète

Yu et Mc Neill (1991) ont suggéré que les RyR2 pouvaient être impliquées dans la genèse et la progression de la cardiomyopathie diabétique lorsqu'ils montrèrent que la libération de calcium par le RS, évaluée indirectement en mesurant l'amplitude de la contraction induite après une période de repos prolongé, est significativement réduite dans le muscle papillaire après 6 semaines de diabète (STZ) chez des rats Wistar. Dans une étude plus récente, Yu et coll. (1994) démontrèrent que la membrane du RS de cœurs de rats diabétiques fixe moins de ryanodine tritiée (exprimée comme une diminution du nombre maximal de site de fixation du ligand,  $B_{max}$ ) que celle de cœurs de rats contrôles. Ceci suggère qu'il existe soit une diminution de la densité des protéines RyR2 au niveau du RS et donc une réduction de l'expression de cette protéine, soit une dysfonction de la protéine RyR2.

#### 3.3.2.2.1 Diminution de l'expression de la protéine RyR2

Une explication évidente pour les altérations dans la libération du  $Ca^{2+}$  par le RS induites par le diabète repose sur des niveaux réduits de la protéine RyR2 puisque les données de la littérature révèlent une diminution de l'expression de cette protéine durant les manifestations de la cardiomyopathie diabétique (Zhong et coll. 2001, Choi et coll. 2002, Bidasee et coll. 2003b), notamment au-delà de 6 semaines de diabète (Zhou et coll. 2006). Par contre, Bidasee et coll. (2001, 2003c) montre qu'après 4 ou 6 semaines de diabète, le contenu en protéines RyR2 ainsi que le niveau d'ARNm mesurés dans des préparations cardiaques ne sont pas significativement différents par rapport à ceux des animaux contrôles. Ces données sont également retrouvées par Ligeti et coll. (2006) qui ont été incapable de montrer une réduction majeure dans le contenu tissulaire en protéines RyR2 6 semaines après l'induction du diabète. Ainsi, 6 semaines de diabète semblent être une période de transition puisque, lorsque la durée du diabète est augmentée ou après une injection de STZ plus importante (augmentant alors la sévérité du diabète), les études relèvent une diminution du contenu et de l'expression des protéines RyR2 (protéines et ARNm codant), que ce soit dans des préparations de tissu cardiaque (Teshima et coll. 2000, Bidasee et coll. 2003c, Yaras et coll. 2005), dans des myocytes ventriculaires (Choi et coll. 2002) ou dans des préparations tissulaires issus du ventricule gauche (Netticadan et coll. 2001).

Une étude chez l'homme arrive à la même conclusion quant aux effets du diabète sur l'expression de la protéine RyR2 (Guner et coll. 2004). En effet, comparés aux patients non diabétiques, l'ARNm codant pour la protéine RyR2 dans l'oreillette droite est diminué de 74% chez les patients diabétiques. Ces auteurs concluent que puisque la réduction dans l'état stable d'ARNm est généralement un indicateur d'une diminution des niveaux protéiques, la diminution de l'inotropie et de la chronotropie observée chez les patients diabétiques pourrait être due en partie à une diminution de l'expression du RyR2. Parallèlement, à cette diminution du contenu total de la protéine RyR2, un certain nombre d'études mettent en évidence des altérations de l'intégrité fonctionnelle de cette protéine.

#### 3.3.2.2.2 Dysfonction de la protéine RyR2

Un certain nombre d'études s'accordent pour affirmer que le diabète induit des dysfonctions de la protéine RyR2. En effet, le diabète semble altérer la sensibilité de la protéine RyR2 au  $Ca^{2+}$ . Dans une étude de Bidasee et coll. (2001), la réponse de la protéine RyR2 à des concentrations en  $Ca^{2+}$  a été évaluée à partir de sa capacité à fixer la ryanodine tritiée, puisque le contenu de ryanodine tritiée fixé est une mesure directe de l'ouverture de ce canal (Balshaw et coll. 1999). Ils ont démontré qu'à contenu équivalent en protéines, les protéines RyR2 issues des préparations membranaires des cœurs de rats diabétiques fixent moins de ryanodine tritiée que celles des cœurs contrôles sans qu'il y ait de différence en terme d'affinité pour la ryanodine (autre indice d'intégrité fonctionnelle définit au travers des valeurs de  $IC_{50}$  et  $K_d$ ). Ainsi, ces données suggèrent que malgré une intégrité fonctionnelle altérée, l'affinité apparente de ce canal pour le  $Ca^{2+}$  ne change pas lors de la phase transitoire de la maladie (Bidasee et coll. 2001, Buijs et coll. 2005). Par ailleurs, plus la durée du diabète est importante et plus la capacité de fixation est altérée puisque les dommages sont plus importants après 6 semaines de diabète qu'après 4 semaines. Après 4 semaines, les protéines RyR2 fixent 9% de moins de ryanodine tritiée que les contrôles, alors qu'après 6 semaines, elles en fixent 36% de moins. Ainsi, puisque l'expression des protéines RyR2 ne change pas significativement au cours des six premières semaines de diabète mais que la fixation de la ryanodine tritiée diminue lors de la phase transitoire de la maladie, ces données suggèrent que l'intégrité fonctionnelle des RyR2 est compromise dans les cœurs de rats diabétiques au cours de cette phase de développement de la cardiomyopathie diabétique. Cette hypothèse s'est confirmée dans les études suivantes

menées par cette équipe de recherche (Bidasee et coll. 2003a, b, c). Il apparaît dans ces études que la capacité de fixation de la ryanodine tritiée pour une concentration donnée de  $Ca^{2+}$  est plus faible dans les préparations cardiaques des rats diabétiques que dans celles des rats contrôles. De plus, les récepteurs RyR2 diabétiques sont plus sensibles à l'activation calcique et leur désactivation nécessitent des concentrations de  $Ca^{2+}$  plus importantes (Shao et coll. 2009). Par ailleurs, il semble que l'altération de la capacité de fixation de la ryanodine tritiée et de la sensibilité de la protéine RyR2 à l'activation calcique puisse résulter de perturbation dans le complexe macromoléculaire associé au RyR2 (Bers 2004), dans l'expression de certaines protéines qui régulent l'activité de la protéine RyR2, telle que FKBP12, des protéines kinases, phosphatases..., et/ou de modifications post-translacionnelles.

- Régulation par FKBP12.6

Parallèlement, à la diminution de la densité des protéines RyR2, Yaras et coll. (2005) ou plus récemment Shao et coll. (2007) ont mis en évidence une diminution du niveau protéique des FKBP12.6 par rapport à celui des RyR2 dans les cardiomyocytes diabétiques. Puisque FKBP12.6 est en partie responsable de la stabilisation du complexe RyR2, les auteurs suggèrent qu'une réduction de son expression peut entraîner une activation aberrante de la protéine RyR2.

- Phosphorylation de la protéine RyR2

Les altérations observées dans la sensibilité de la protéine RyR2 à l'activation/désactivation calcique peuvent aussi provenir d'une augmentation du contenu phosphorylé de la protéine (Reiken et coll. 2001). Carter et coll. (2006) ont montré qu'une augmentation de la phosphorylation PKA-dépendante de RyR2 au niveau de Ser2809 entraînait une augmentation de son activité. Ainsi, plusieurs équipes se sont intéressées aux effets du diabète sur le niveau de phosphorylation de RyR2. Parallèlement à la réduction des contenus protéiques en RyR2 et en FKBP 12.6, Yaras et coll. (2005) ont mis en évidence une hyperphosphorylation PKA-dépendante de la protéine RyR2. Cette hyperphosphorylation PKA-dépendante de la protéine RyR2 est également retrouvée dans l'étude de Shao et coll. (2007) qui montre une augmentation de la phosphorylation de la RyR2 au niveau de Ser2809. Pour aller plus loin dans la compréhension des altérations au niveau de l'intégrité fonctionnelle de la protéine RyR2, Shao et coll. (2009) ont cherché à

déterminer si le diabète augmente le niveau de phosphorylation de la protéine au niveau d'autres sites. Ils ont alors mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de RyR2 au niveau du résidu sérine 2808 (Ser2808) (phosphorylation PKA- et CaMKII-dépendantes) et de Ser2814 (phosphorylation CaMKII-dépendante). De plus, pour déterminer la ou les kinase(s) responsable(s) de l'augmentation de la phosphorylation de RyR2 au cours du diabète, Shao et coll. (2009) ont évalué l'activité de la PKA et de la CaMKII. Ces auteurs concluent que l'hyperphosphorylation de RyR2 au niveau de Ser2814 et de Ser2808 résulte principalement d'une augmentation d'activité de CaMKII puisque l'activité intrinsèque de la PKA est réduite dans les homogénats ventriculaires diabétiques. Cette conclusion est cependant à nuancer car Netticadan et coll. (2001) ont démontré une augmentation de l'activité de la CaMKII mais aussi de la PKA. Cette divergence de résultats peut être due aux homogénats utilisés pour évaluer le niveau d'activité de CaMKII et PKA comme le suggèrent Netticadan et coll. (2001) en comparant leurs résultats avec ceux de Yang et coll. (1999) qui ne montrent aucun changement dans l'activité kinase. En effet, si Netticadan et coll. (2001) ont utilisé des vésicules de RS pour mesurer le niveau d'activité de CaMKII et PKA, Yang et coll. (1999) ont utilisé des homogénats de cœurs et Shao et coll. (2009), des homogénats ventriculaires.

Ainsi, ces données suggèrent que les dysfonctionnements observés dans la cinétique d'ouverture des RyR2 au cours du diabète pourraient être liés à la réduction du contenu protéique en RyR2 et en FKBP12.6, à la perte conséquente de stabilisation du complexe ainsi qu'à une hyperphosphorylation dépendante de la PKA et de la CaMKII du RyR2. En conséquence, associées à ces altérations au niveau de RyR2 et FKBP12.6, l'augmentation de la fréquence des étincelles calciques ainsi que l'augmentation de la libération diastolique de  $Ca^{2+}$  épuiserait les stocks calciques du RS (Yaras et coll. 2005, Shao et coll. 2007). Ces altérations pourraient alors contribuer à la réduction de l'amplitude de la transitoire calcique, à l'altération du couplage excitation-contraction et à la perte de contractilité myocardique au cours du diabète.

Néanmoins, si la régulation de la RyR2 par FKBP12.6 ainsi que son niveau de phosphorylation joue un rôle important dans l'altération de l'intégrité fonctionnelle de la protéine, il semble que d'autres mécanismes interviennent dans ces altérations.

- Formation d'AGEs

L'élévation des taux circulants d'aldoses et de cétooses déclenchée par le diabète est susceptible d'augmenter la formation de base de Schiff sur les résidus de lysine, arginine, cystéine et histidine (réactions de glycation non enzymatique) sur de nombreuses protéines. Ces bases de Schiff peuvent subir des réarrangements pour former des produits Amadori plus stables. Sur les protéines à longue durée de vie comme le RyR2, ces produits peuvent être réarrangés pour former des AGEs (Advanced Glycation End Products). Ces molécules complexes une fois formées restent fixées à la protéine pendant toute sa vie et altère son fonctionnement. Ainsi, dans le diabète, les AGEs s'accumulent à un rythme accéléré dans la circulation sanguine et dans des tissus variés, expliquant le développement des complications vasculaires diabétiques. Le récepteur des AGEs (RAGEs) est la molécule la plus caractéristique de la surface cellulaire qui reconnaît les AGEs. Il est exprimé dans des organes variés incluant le cœur. Des études *in vitro* (Yamagishi et coll. 1997) et *in vivo* (Yamamoto et coll. 2001) révèlent le rôle important des interactions AGEs-RAGEs dans le développement des complications diabétiques. Il a été démontré que les RyR2 des cœurs de rats diabétiques (8 semaines après l'injection de STZ) contiennent des AGEs. Ces produits post-translacionnels sont détectés en utilisant la spectrométrie de masse après digestion des RyR2 par la trypsine (Bidasee et coll. 2003a). Ces données suggèrent alors une relation entre la diminution de l'activité de la protéine RyR2 induite par le diabète et son contenu en AGEs.

- Formation de pont disulfure

Le diabète peut agir sur un autre type de modification post-translacionnelle, plus particulièrement sur l'état oxydatif de groupes sulfure sur le RyR2. En effet, il a été démontré chez des rats diabétiques de 6 semaines que la perte d'activité de la protéine RyR2 pouvait être en partie liée à l'augmentation de son contenu en ponts disulfures (Bidasee et coll. 2003b). Cette conclusion est basée sur le fait que quand la protéine RyR2 provenant de préparations cardiaques d'animaux diabétiques de 6 semaines est traitée en réduisant la concentration de dithiothreitol (2 mM), sa capacité à fixer la ryanodine tritiée est restaurée. Ces données suggèrent donc que le diabète augmente la formation de ponts disulfures (entre des groupes sulfures adjacents) sur la protéine RyR2 et diminue sa capacité à fixer son ligand spécifique, ceci suggérant que le canal calcique du RS est alors stabilisé dans sa conformation fermée.

- Effet de l'oxydation et de la nitrosylation

Il est bien connu que les changements métaboliques induit par le diabète augmentent la production d'ERDO et d'ERDA (Uchida et coll. 2000, Ulrich et coll. 2001, Baynes 2003). Ces espèces (radicalaires comme non radicalaires) sont aussi capables de réagir avec plusieurs résidus d'acides aminés sur les protéines. Comme les glycations, les modifications des résidus d'acides aminés par les ERDO et ERDA peuvent altérer la structure tertiaire de certaines protéines telles que le RyR2 et ces changements en retour peuvent altérer la sensibilité du RyR2 aux ligands endogènes et donc diminuer son activité. Cependant, la mesure par laquelle les protéines RyR2 deviennent oxydées durant le diabète, le type de produits d'oxydation qui prédomine et l'impact de ces produits sur la fonction des RyR2 ne sont pas encore clairement définis à l'heure actuelle.

Par ailleurs, le rôle de la molécule de signalisation qu'est le monoxyde d'azote (NO) dans la modulation de la fonction cardiaque est aujourd'hui bien reconnue (Lim et coll. 2008). En effet, il est clairement établi que la production de NO module la fonction de plusieurs protéines régulatrices du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, telles que RyR2, impliquées dans le couplage EC (Sears et coll. 2004, Seddon et coll. 2007). Le NO semble avoir un effet stimulant, dose-dépendant, sur la probabilité d'ouverture du canal calcique du RS (Lim et coll. 2008). Dans une étude visant à déterminer le rôle des récepteurs  $\beta$ 3-AR dans les dysfonctions  $\beta$ -AR associées à la cardiomyopathie diabétique, Amour et coll. (2007) ont montré non seulement que les récepteurs  $\beta$ 3-AR jouent un rôle important dans ces dysfonctions mais aussi que cet effet est exclusivement médié par le NO dérivé de la NO synthase neuronale (NOs1). Or dans des conditions physiologiques, il a été montré que cette NOs1 est localisée au niveau du RS où elle est associée au RyR2, suggérant que le NO dérivé de la NOS1 joue bien un rôle majeur dans l'activité du RyR2 (Bendall et coll. 2004). Cependant, dans les cardiomyocytes diabétiques, Amour et coll. (2007) ont également montré que si la production de NO résulte quasi-exclusivement de la NOs1 dont l'expression est d'ailleurs augmentée, l'interaction de NOs1 avec le RyR2 est elle diminuée. Ces données suggèrent donc que les dysfonctions de RyR2 peuvent résulter d'un défaut au niveau de sa nitrosylation. Une étude réalisée chez des souris déficientes en NOs1 apporte quelques éclairages quant à ces relations entre les nitrosylations de la protéine RyR2 et la cardiomyopathie diabétique. En effet, Gonzalez et coll. (2007) ont montré que la déficience en NOs1 induit une hyponitrosylation des protéines RyR2 et augmente l'oxydation, engendrant des fuites diastoliques de  $Ca^{2+}$  en provenance du RS, une

augmentation de la concentration diastolique de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et donc une diminution du contenu calcique du RS. Ces fuites de  $\text{Ca}^{2+}$  induisent alors une diminution de la contractilité et une augmentation de l'instabilité des propriétés électriques du myocarde, principales caractéristiques de l'insuffisance cardiaque. Ainsi, ces données suggèrent l'importance des nitrosylations endogènes des RyR2 par les NOs1 et montrent les mécanismes par lesquels la déficience en NOs1 peut engendrer une contractilité myocardique altérée, caractéristique de la cardiomyopathie diabétique.

#### 3.3.2.2.3 Effet d'un traitement à l'insuline sur le RyR2

A notre connaissance, les études disponibles dans la littérature s'accordent sur des effets positifs d'un traitement à l'insuline sur les désordres occasionnés par le diabète sur la protéine RyR2. En effet, bien que toutes les études s'intéressant aux effets du diabète sur cette protéine, n'aient pas testé l'influence d'une thérapie insulinaire, il apparaît clairement que celle-ci restaure et/ou minimise les effets du diabète sur l'expression et la fonction de la protéine RyR2.

Bidasee et coll. (2001) ont montré qu'un traitement à l'insuline de 2 semaines administré 4 semaines après l'induction du diabète augmente de manière significative les niveaux de protéines et d'ARNm codant pour la protéine RyR2 dans les myocytes ventriculaires. Ces niveaux atteignant des valeurs plus importantes que celles obtenues dans les myocytes contrôles. Ainsi, bien que l'affinité de la ryanodine pour les RyR2 ne diffère pas de manière significative entre les myocytes diabétiques, diabétiques traités à l'insuline et contrôles, la capacité des récepteurs à fixer la ryanodine tritiée est augmentée de 38% chez les animaux traités à l'insuline comparés aux animaux contrôles et aux animaux diabétiques. Ainsi, le traitement à l'insuline augmente non seulement l'expression de la protéine RyR2 mais aussi son intégrité fonctionnelle. Ce résultat est confirmé par un certain nombre d'autres études (Teshima et coll. 2000, Netticadan et coll. 2001, Bidasee et coll. 2003a, b, c) qui relèvent que la thérapie à l'insuline minimise et/ou prévient la diminution de l'expression et de la fonction des RyR2, notamment en minimisant la production d'AGEs (Bidasee et coll. 2003a) et la formation de ponts disulfures (Bidasee et coll. 2003b). Il apparaît ainsi que le traitement à l'insuline améliore les performances cardiaques en minimisant les désordres dans l'activité de relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS via les protéines RyR2 (Netticadan et coll. 2001).



### 3.3.3. La Ca<sup>2+</sup>-ATPase du RS ou SERCA2

#### 3.3.3.1 Caractéristiques de la SERCA2

Le remplissage calcique du RS lors de la diastole s'effectue contre un gradient de concentration entre la [Ca<sup>2+</sup>] libre dans le cytosol (0,1 à 2µM) et le RS (1 mM). Le calcium est pompé vers le réticulum sarcoplasmique par un transporteur ATP-dépendant, la Ca<sup>2+</sup>-ATPase ou SERCA qui catalyse le transport de 2 ions Ca<sup>2+</sup> aux dépens de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (MacLennan et coll. 1997). La SERCA est une protéine membranaire de masse moléculaire 110 KDa. Cette protéine existe sous la forme de 5 isoformes différents, codées par 3 gènes différents (SERCA1, SERCA2, SERCA3) (Arai et coll. 1994) dont l'expression est tissu spécifique. La SERCA2 est l'isoforme caractéristique du tissu cardiaque (Lompré et coll. 1994). C'est pourquoi dans la suite de ce travail, nous porterons une attention particulière à cette isoforme de la Ca<sup>2+</sup>-ATPase du RS. La SERCA2 du RS se divise en trois domaines : 1) un domaine transmembranaire formé de 10 segments M1-M10, dont certains interviennent dans la fixation et le transport du Ca<sup>2+</sup> (Clarke et coll. 1989), 2) un domaine cytoplasmique hydrophile composé de deux boucles, responsables notamment du couplage entre l'hydrolyse de l'ATP et la fixation puis le transport du Ca<sup>2+</sup> (Clarke et coll. 1989), et 3) une région « tige » qui unit le domaine cytoplasmique hydrophile au domaine transmembranaire hydrophobe.

L'activité de SERCA est régulée par une protéine phosphorylable, le PLB dont le rôle essentiel dans la contractilité musculaire a été démontré par l'utilisation de souris génétiquement modifiées (MacLennan et Kranias 2003). Le PLB, homopentamère de 52 acides aminés, qui est une protéine du RS de faible masse moléculaire (27,000-dalton) est connu, sous sa forme non phosphorylée, pour inhiber la fonction de la SERCA2 (et donc réduire la séquestration du Ca<sup>2+</sup> dans le RS) en diminuant son affinité pour le Ca<sup>2+</sup> (Tada et coll. 1983), alors que sous sa forme phosphorylée, il exerce l'effet opposé. Les études *in vitro* ont indiqué que le PLB peut être phosphorylé sur la Ser<sup>10</sup> par la PKC, sur la Ser<sup>16</sup> par la PKA et sur la Thr<sup>17</sup> par la CaMK (Simmerman et coll. 1986, Koss et Kranias 1996). La phosphorylation du PLB au niveau de la Ser<sup>16</sup> et Thr<sup>17</sup> lève ses effets inhibiteurs sur la SERCA, induisant une forte augmentation de l'affinité de la SERCA pour le Ca<sup>2+</sup>, et donc une augmentation du rythme de repompage du Ca<sup>2+</sup> dans le RS (Kranias 1985).

### 3.3.3.2 Devenir de la SERCA2 au cours de la cardiomyopathie diabétique

La prolongation de la relaxation est une des caractéristiques de la cardiomyopathie diabétique. De nombreuses études attribuent cette altération à une diminution de l'expression de la SERCA2 (Teshima et coll. 2000, Netticadan et coll. 2001, Choi et coll. 2002). Cependant, cette altération de la relaxation peut aussi être liée à des dysfonctions de cette pompe calcique (Penpargkul et coll. 1980, Dutta et coll. 2002).

#### 3.3.3.2.1 Diminution de l'expression de la protéine SERCA2

Actuellement, de nombreuses études s'accordent sur le fait que le diabète induit une diminution de l'expression de la SERCA2, mesurée dans des préparations tissulaires cardiaques (Depré et coll. 2000, Teshima et coll. 2000, Bidasee et coll. 2004) ou dans des préparations ventriculaires (Russ et coll. 1991, Kim et coll. 2001, Zhong et coll. 2001, Netticadan et coll. 2001, Choi et coll. 2002). Ces études mettent en évidence une diminution des niveaux d'ARNm et/ou de protéines de la SERCA2, notamment au-delà 6 semaines de diabète (Bidasee et coll. 2004).

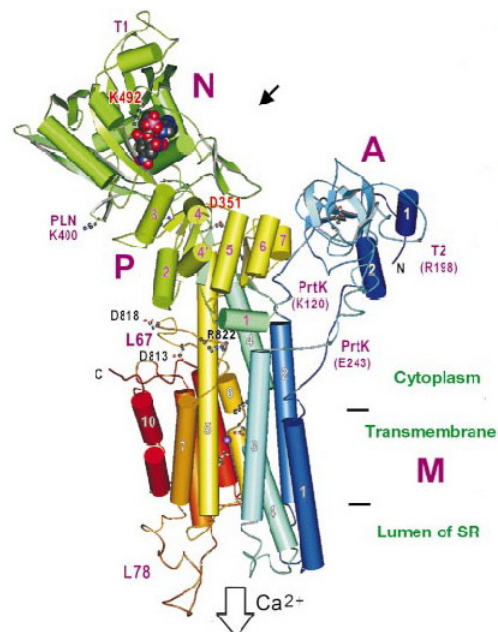


Figure 9 : Structure tri-dimensionnelle de la SERCA2 (d'après Toyoshima, 2000).

Cette ATPase a 10 segments membranaires dont l'organisation en faisceau constitue la voie de passage au calcium. Les domaines notés N et P sont les domaines de fixation du

---

nucléotide et de phosphorylation et forment la grande boucle. Le domaine A forme la petite boucle. On notera que cette ATPase n'a pas de site(s) de fixation de métaux lourds en position N-terminale.

Par ailleurs, ces altérations dans l'expression de la protéine SERCA2 peuvent être mises en relation avec l'état hypothyroïdique très souvent retrouvé dans le diabète (diminution des niveaux en hormones thyroïdiennes T3 et T4) (Russ et coll. 1991). En effet, cet état hypothyroïdique est connu pour réduire le niveau des ARNm codant pour la protéine SERCA2. Cette réduction serait selon Russ et coll. (1991) un des mécanismes cellulaires responsable des altérations du transport du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS et du délai de la relaxation observés dans le diabète. De plus, Teshima et coll. (2000) indiquent que la diminution de l'expression de la SERCA2 précède celle de la protéine RyR2, expliquant en partie l'altération préalable de la diastole par rapport à la systole dans le développement de la cardiomyopathie diabétique.

Toutefois, Zarain-Herzberg et coll. (1994) et plus récemment Watanuki et coll. (2004) après respectivement 3 à 5 semaines et 4 à 6 semaines de diabète induit par la STZ ne retrouvent pas cette diminution de l'expression de la SERCA2 dans des vésicules de RS ou dans les muscles papillaires isolées à partir du VG. En effet, dans ces études, le diabète n'a aucun effet sur l'expression de la protéine. Un résultat similaire est obtenu suite à une injection d'alloxan puisque 6 semaines après l'induction du diabète, l'expression de la SERCA2 n'est pas significativement modifiée dans des fractions membranaires du RS isolé à partir de tissu ventriculaire de rats (Golfman et coll. 1999). Zhao et coll. (2006) aboutissent à la même conclusion puisqu'ils n'ont démontré aucune altération du niveau protéique de la SERCA2 dans le myocarde de rats diabétiques comparés à des rats contrôles, ceci 4 semaines après l'injection de STZ. Cependant, il apparaît une tendance, bien que non significative, à une sous-expression de la protéine SERCA2 chez les rats diabétiques 6 et 8 semaines après l'induction du diabète. Cette donnée relative à la durée du diabète pourrait être un argument éventuel pour expliquer les divergences observées dans les études.

Ainsi, bien que la majorité des études relève une diminution de l'expression de la protéine SERCA2, les résultats contradictoires de certaines études peuvent notamment s'expliquer par la nature de la drogue diabéto-gène injectée, le lieu d'injection, le degré de diabète

induit, la durée de la maladie et donc le moment de l'étude par rapport à la phase transitoire de la cardiomyopathie diabétique ...

Parallèlement, à cette diminution du contenu total de la protéine SERCA2, un certain nombre d'études mettent en évidence des altérations de l'intégrité fonctionnelle de cette protéine.

#### 3.3.3.2.2 Dysfonction de la protéine SERCA2

Un certain nombre d'études s'accordent pour affirmer que le diabète altère l'intégrité fonctionnelle de la protéine SERCA2. Après 28 jours de diabète induit, le transport ATP-dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  et les activités calciques ATPases stimulées sont significativement diminuées dans les échantillons microsomaux provenant des cœurs de rats diabétiques comparés à ceux provenant des cœurs de rats contrôles (Ganguly et coll. 1983). Cette diminution du transport ATP-dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  est à mettre en relation avec la dépression du repompage ATP-dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS observée chez des rats diabétiques comparés à des animaux contrôles (Penpargkul et coll. 1981, Golfman et coll. 1999). Ces données mettent donc en évidence une altération de l'activité de la SERCA2 au cours du diabète. Plus récemment, une diminution de l'activité de transport du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS cardiaque, en termes de vitesse maximale de repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  ( $V_{\max}$ ) et d'affinité de la SERCA2 pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{EC}_{50}$ ) a été observée dans des cardiomyocytes diabétiques (Kim et coll. 2001). Ces résultats sont confirmés par les données de Dutta et coll. (2002). En effet, il a été montré que les mouvements de  $\text{Ca}^{2+}$  attribués à la SERCA2 sont plus lents dans les myocytes ventriculaires de rats mis en culture dans un milieu contenant une concentration élevée de glucose (25,5 mM) que dans ceux situés dans un milieu à concentration de glucose normale (5,5 mM). Il est alors conclu que la dépression de l'activité de la SERCA2 est un facteur contribuant à la dégradation de la relaxation dans la cardiomyopathie diabétique. De plus, il semble que la diminution de l'activité de la SERCA2 soit associée à la diminution d'expression de la protéine puisque ces 2 caractéristiques sont retrouvées conjointement dans les cardiomyocytes provenant de rats diabétiques (Golfman et coll. 1999, Kim et coll. 2001, Ye et coll. 2005, Zhao et coll. 2006). Ainsi, ces modifications fonctionnelles du repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS peuvent être associées à la diminution des niveaux protéiques de la SERCA2. Cette conclusion est renforcée par l'étude de Vetter et coll. (2002). Puisque le ralentissement de la relaxation dans la cardiomyopathie diabétique

est partiellement lié à une diminution de l'expression de la SERCA2 du RS, les auteurs ont évalué l'impact de la surexpression de la SERCA2 sur les mouvements calciques en générant des rats transgéniques (transgène SERCA2). Il apparaît chez ces rats transgéniques diabétiques ou non, comparés à des rats contrôles, une augmentation des ARNm codant pour la SERCA2, des protéines de la SERCA2 et une augmentation du repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. L'amplitude de la contraction et les rythmes de contraction et de relaxation sont également augmentés dans les muscles papillaires isolés. Ainsi, une surexpression de la SERCA2 dans les cœurs de rats améliore le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS, accélère la relaxation et compense, au moins en partie, la dépression du repompage dans les cardiomyocytes diabétiques. Ces résultats confirment donc le rôle de la diminution de l'expression de la protéine SERCA2 dans la diminution de l'activité de repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS par l'intermédiaire de la SERCA2.

Cependant, cette diminution de l'activité de la protéine SERCA2 est, aussi, souvent attribuée à son inhibition par le PLB non phosphorylé ou encore à des modifications post-translationnelles telles que la formation d'AGEs sur la protéine.

- Augmentation de la forme non phosphorylée du phospholamban

Le PLB est un élément clé de la régulation de l'activité de la protéine SERCA2 puisque sous sa forme non phosphorylée, il est connu pour inhiber la fonction de la SERCA2 alors que sous sa forme phosphorylée, il exerce l'effet opposé. Le rôle du PLB dans la diminution de l'activité de la SERCA dans le diabète peut alors être expliqué par une augmentation de la forme non phosphorylée du PLB, qui va interagir avec la SERCA en diminuant son affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, le cœur de rat diabétique se caractérise par une augmentation de la forme non phosphorylée du PLB, mesurée dans des préparations cardiaques (Bidasee et coll. 2004) ou dans des préparations ventriculaires (Zhong et coll. 2001, Choi et coll. 2002.). Puisque l'expression de la SERCA2 est diminuée au cours du diabète, la diminution du ratio SERCA2/PLB pourrait signifier une augmentation de l'inhibition de la SERCA2 par le PLB dans les cœurs diabétiques (Bidasee et coll. 2004).

Le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS est subordonné à la régulation par la phosphorylation de la SERCA2 par la CaMK (Xu et coll. 1993) et par la phosphorylation du PLB par la CaMK et la PKA (LePeuch et coll. 1979, Davis et coll. 1983, Kargacin et coll. 1998). Chacune de ces phosphorylations augmente le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. Alors que la phosphorylation du PLB par la CaMK et la PKA lève l'action inhibitoire du PLB sur la

SERCA2, conduisant à une augmentation de l'affinité de la SERCA2 pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (LePeuch et coll. 1979, Davis et coll. 1983, Kargacin et coll. 1998), la phosphorylation de la SERCA2 par la CaMK augmente la  $V_{\text{max}}$  du transport du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS (Xu et coll. 1993). Ainsi, l'altération du repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS observé dans les cœurs diabétiques peut aussi partiellement être expliquée comme le résultat d'une diminution de la phosphorylation du PLB puisque une diminution de la phosphorylation du PLB médiée par la CaMK et par la PKA a été observée dans les cœurs diabétiques (Netticadan et coll. 2001, Zhong et coll. 2001, VasANJI et coll. 2004). Paradoxalement, cette diminution du niveau de phosphorylation du PLB est retrouvée alors même que l'activité des protéines kinases associées au RS est augmentée (Netticadan et coll. 2001, VasANJI et coll. 2004). Ceci pourrait être expliqué sur la base d'une réduction du contenu protéique en PLB comme d'une augmentation de l'activité des protéines phosphatases associées au RS.

De nombreuses études attribuent donc les altérations dans la vitesse de repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS et le ralentissement de la relaxation durant le diabète principalement à 1) une diminution de l'expression de la SERCA2, 2) une augmentation de l'expression du PLB ou, 3) une diminution du ratio SERCA/PLB. Ces observations font du PLB un candidat important dans l'altération des mouvements calciques et de la relaxation. Cependant, parallèlement aux modifications post-translationnelles qui touchent le PLB et donc indirectement la SERCA2, le diabète induit également des modifications post-translationnelles directement de la protéine SERCA2 pouvant expliquer l'altération de sa fonction dans les cœurs pathologiques.

- Formation d'AGEs sur la protéine SERCA2

Comme la protéine RyR2, la protéine SERCA2 est également victime de la formation des AGEs du fait de l'élévation des taux circulants d'aldoses et de cétoles. Bidasee et coll. (2004) ont mis en évidence que des AGEs sont formés sur la protéine SERCA2 après 8 semaines de diabète. Ils suggèrent alors un mécanisme original par lequel la relaxation cardiaque pourrait être ralentie au cours du diabète. Selon Petrova et coll. (2002), les AGEs étant liés à leur récepteurs spécifiques, le système AGEs-RAGEs pourrait alors affecter directement l'homéostasie calcique myocardique et ainsi jouer un rôle spécifique dans l'altération de la relaxation et donc dans le développement de la cardiomyopathie diabétique en modifiant l'activité de la SERCA2 ou d'autres protéines membranaires

impliquées dans l'homéostasie calcique telles que le NCX. Les AGEs et les RAGEs pourraient donc être des facteurs environnementaux qui contribuent aux troubles des mouvements calciques dans les cardiomyocytes, et pourquoi pas, au développement de la cardiomyopathie diabétique. Les mécanismes d'action impliqués ne sont pas encore bien compris, mais ils pourraient agir en créant un stress oxydant. En effet, la réduction du contenu en protéine SERCA2 dans les cardiomyocytes de souris diabétiques OVE26 peut être complètement prévenue par la surexpression de la protéine anti-oxydante, la mélathionine (Ye et coll. 2005). Ce résultat suggère alors que le stress oxydant est une cause probable de la réduction de l'expression de la SERCA2 dans les cœurs diabétiques.

### 3.3.3.3 Effet d'un traitement à l'insuline sur la protéine SERCA2 et le phospholamban

Les études s'accordent sur le fait que le traitement à l'insuline administré chez des rats diabétiques normalise les niveaux de protéines SERCA2 et d'ARNm codant pour celle-ci (Teshima et coll. 2000, Netticadan et coll. 2001, Zhong et coll. 2001). De plus, si l'insuline semble améliorer l'expression de la protéine SERCA2, il apparaît également qu'elle normalise la fonction de la protéine. En effet, chez des animaux diabétiques recevant un traitement à l'insuline, l'activité de repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS via la SERCA2 est aussi améliorée (Zarain-Herzberg et coll. 1994, Golfman et coll. 1999, Netticadan et coll. 2001, Zhong et coll. 2001). Ainsi, la fonction de la SERCA2 peut être améliorée par la thérapie à l'insuline. Cependant, celle-ci peut-être mise en relation avec les effets de la thérapie sur le PLB. En effet, il apparaît que le traitement soit capable de renverser l'augmentation du PLB non phosphorylé induite par le diabète (Zhong et coll. 2001). Une diminution des niveaux protéiques et d'ARNm codant pour le PLB est aussi retrouvée dans l'étude de Watanuki et coll. (2004) qui montre également que le traitement à l'insuline renverse les effets du diabète sur la PKA et la PKC. Ainsi, la thérapie à l'insuline permettrait d'augmenter l'activité de la PKA et de diminuer l'activité de la PKC. Ces données sont à permettre en parallèle avec celles de Zhong et coll. (2001) qui ont montré que le traitement à l'insuline permet de prévenir complètement la diminution de la phosphorylation du PLB et donc d'augmenter l'affinité de la SERCA2 pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, cet effet positif de l'insuline sur les activités des protéines kinases n'est pas retrouvé par Netticadan et coll. (2001). En effet, l'insuline renverse significativement les changements induits par le

diabète sur les performances cardiaques, sur les activités de relargage et de repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS, et sur le contenu en protéines SERCA2, PLB ou encore RyR2. Néanmoins, le traitement à l'insuline n'atténue pas l'augmentation de la phosphorylation par la PKA et par la CaMK de ces 3 protéines. Ainsi, l'insuline n'atténue pas l'augmentation de l'activité de ces protéines kinases. Ceci peut notamment s'expliquer par le fait que l'insuline n'atténue pas non plus l'augmentation de l'activité des protéines phosphatases induite par le diabète. Ainsi, les auteurs concluent que la durée du traitement à l'insuline (3 semaines) n'est peut être pas suffisante pour une normalisation complète de tous les changements cellulaires dans le cœur diabétique. De plus, ils affirment que la normalisation de la fonction du RS par le traitement à l'insuline est médiée par la protection directe des protéines du RS impliquées dans les mouvements calciques plutôt que par des mécanismes régulateurs tels que les phosphorylations. De ce fait, les protéines du RS pourraient constituer des cibles intéressantes pour le traitement du diabète.

### 3.3.4. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ du sarcolemme ou NCX

#### 3.3.4.1 Caractéristiques du NCX

L'échangeur  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  (NCX) fonctionne sur un mode réversible, avec une stoechiométrie de 3 ions  $\text{Na}^+$  pour 1 ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Il est donc électrogène et son sens de fonctionnement (sortie ou entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ ) dépend principalement du gradient sodique et du potentiel membranaire. Dans le myocyte, l'efflux calcique est favorisé pendant toute la repolarisation du PA et le fonctionnement inverse (entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ ) est pratiquement inexistant, sauf si la  $[\text{Na}^+]_i$  est élevée, par exemple après inhibition de l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  par les digitaliques. Le NCX est une protéine de 140 kDa, codée par 3 gènes (NCX1, NCX2, NCX3). Le NCX1 est l'isoforme majoritaire du cœur.

La protéine est constituée : 1) de neuf segments transmembranaires formant deux domaines (I-V et VI-IX) possédant l'activité d'échange, 2) d'une longue boucle cytoplasmique liant les segments V et VI et qui contient les principaux sites de régulation et 3) de deux séquences homologues nommées  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , situées entre les segments II-III et VII-VIII qui sont impliquées dans le transport des ions. Comme les autres protéines de la transitoire calcique, le NCX forme avec des protéines régulatrices un complexe macromoléculaire. Parmi les autres protéines de ce complexe : l'ankyrine B, protéine



impliquée dans l'organisation du cytosquelette des membranes cellulaires, est indispensable à l'adressage du NCX ; la cavéoline 3, petite protéine impliquée dans la formation d'invaginations membranaires appelées cavéoles, est nécessaire à l'activité du NCX ; l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dont l'isoforme  $\alpha 2$ , régule la concentration sodique des tubules-T; enfin, la calcineurine activée par une concentration calcique élevée provoque une inhibition de l'activité de NCX. Les interactions entre protéines régulatrices et NCX se situent le plus souvent sur la boucle cytoplasmique de NCX, soulignant l'importance de cette boucle dans la régulation de son activité.

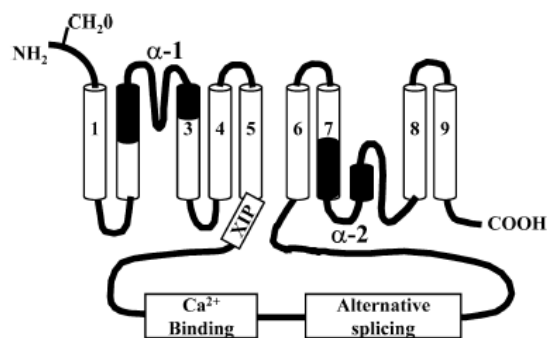


Figure 10 : Structure de l'échangeur NCX.

(D'après Philipson et coll. 2002)

Cette protéine est composée de 9 domaines transmembranaires et d'une large boucle intracellulaire

#### 3.3.4.2 Devenir du NCX au cours de la cardiomyopathie diabétique

Les études concernant les effets du diabète sur l'échangeur NCX semblent toutes aller dans le sens d'une diminution de son expression et de sa fonction. En effet, si Golfman et coll. (1998) ont montré que l'expression de la protéine NCX augmentée après 3 semaines de diabète, revient à un niveau contrôle après 5 semaines de maladie, Takeda et coll. (1996) puis Hattori et coll. (2000) ont au contraire observé une diminution de la densité de l'échangeur NCX cardiaque après 4 à 6 semaines de diabète. En effet, cette étude a mis en évidence une diminution de 30% des niveaux de protéines et d'ARNm du NCX1, isoforme de NCX fortement exprimé dans le cœur (Kofuji et coll. 1992, Quednau et coll. 1997). Ces résultats ont été confirmés par les analyses immunologiques menées par Choi et coll. (2002) qui montrent que le niveau de protéines NCX dans les cœurs de rats diabétiques 12

semaines après l'induction de la maladie est diminué par 45% par rapport à celui des cœurs de rats contrôles. Ainsi, il semble que comme pour les protéines RyR2 et SERCA2, 6 semaines de diabète semblent être une période de transition dans l'évolution de la densité de l'échangeur NCX.

Parallèlement à cette diminution de l'expression de l'échangeur NCX, un certain nombre d'études mettent également en évidence une diminution d'activité de cette protéine au cours de la cardiomyopathie diabétique.

En effet, les activités de recaptage du  $\text{Ca}^{2+}$  de l'échangeur NCX sont significativement diminuées dans des préparations membranaires de sarcolemme de cœurs de rats diabétiques (8 semaines après l'injection de STZ) (Makino et coll. 1987, Golfman et coll. 1996) ou de myocytes ventriculaires isolés de rats diabétiques STZ (12 semaines de diabète) (Choi et coll. 2002). Ces résultats indiquent une diminution de la capacité de la cellule à réguler le flux calcique via le NCX. Selon Choi et coll. (2002), cette altération contribue largement aux altérations de la transitoire calcique observées dans les myocytes de rats diabétiques, à l'apparition de la surcharge calcique intracellulaire et donc au développement de la cardiomyopathie diabétique. Cette diminution observée dans l'activité d'échange du NCX apparaît rapidement après l'induction de la maladie puisque Takeda et coll. (1996) ont mis en évidence cette altération dans des fractions de SL après seulement 21 jours de diabète.

Il semble important de préciser que l'administration d'insuline aux animaux diabétiques normalise l'efflux calcique via l'échangeur NCX ainsi que l'expression de la protéine (Makino et coll. 1987, Gofman et coll. 1996, Hattori et coll. 2000).

Parallèlement à la diminution d'expression et de fonction de l'échangeur NCX, la densité du courant  $I_{\text{Na-Ca}}$  semblent également diminuée. En effet, Chattou et coll. (1999) ont observé une densité du courant  $I_{\text{Na-Ca}}$  significativement plus faible dans les myocytes diabétiques par rapport aux contrôles à tous les potentiels testés. La densité pic du courant  $I_{\text{Na-Ca}}$  activé par la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la caféine est significativement plus faible et la phase de déclin de ce courant est prolongée. Une densité de  $I_{\text{Na-Ca}}$  correspondant à seulement 55% de celle des myocytes ventriculaires de rats contrôles a également été mise en évidence dans des myocytes de rats diabétiques (Hattori et coll. 2000).

Ces résultats reflètent donc principalement la réduction d'activité de l'échangeur NCX.

En conclusion, au cours de la cardiomyopathie diabétique, la synthèse des échangeurs NCX seraient donc limitée et même déprimée (diminution des niveaux de protéines et d'ARNm codant pour cet échangeur) et expliquerait en partie la diminution d'activité et la diminution du courant  $I_{Na-Ca}$ . Cependant, une autre explication, impliquant le courant  $I_{Ca}$  ne peut pas être exclue. En effet, l'activation de  $I_{Ca}$  est essentielle, non seulement pour la libération du  $Ca^{2+}$  par le RS (Fabiato 1983), mais aussi pour la stimulation subséquente du courant  $I_{Na-Ca}$  (Mitchell et coll. 1987). On peut alors penser qu'en plus de la diminution de l'activité intrinsèque du NCX, la réduction de  $I_{Ca}$  (observée dans certaines études citées précédemment) peut indirectement contribuer à réduire l'activation de l'échangeur NCX et donc à diminuer le courant  $I_{Na-Ca}$ .

Nous venons de voir que la cardiomyopathie diabétique se caractérise notamment par des performances contractiles myocardiques altérées. Ces altérations de la fonction cardiaque semblent être en grande partie liées à des perturbations dans le système  $\beta$ -AR et dans le système de régulation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Bien que peu d'études se soient intéressées aux effets spécifiques du traitement à l'insuline sur les performances myocardiques chez le patient diabétique de type 1, cette revue de la littérature montre que des traitements à l'insuline relativement courts (2 à 3 semaines) normalise la fonction contractile (Litwin et coll. 1990, Netticadan et coll. 2001, Zhong et coll. 2001, Bidasee et coll. 2004), les concentrations myocardiques en catécholamines (Ganguly et coll. 1986, 1987), l'expression des récepteurs  $\beta$ -AR (Nishio et coll. 1988, Dinçer et coll. 2001) ainsi que l'expression des principales protéines régulatrices du calcium (Choi et coll. 2001, Bidasee et coll. 2001, Netticadan et coll. 2001, Zhong et coll. 2001, Bidasee et coll. 2003a). Néanmoins, le traitement à l'insuline chez les patients diabétiques n'empêche pas, à long terme, le développement de nombreuses complications telles que la cardiomyopathie diabétique, suggérant alors de sévères altérations apparaissent malgré le traitement (Flaim et coll. 1983, Fallow et Singh 2004, Acar et coll. 2009). Ainsi, avec le traitement à l'insuline, un régime alimentaire spécifique et une certaine éducation, la pratique sportive régulière est considérée comme un élément majeur de la prise en charge thérapeutique du diabète de type 1. La suite de cette revue de littérature va donc être consacrée aux effets d'un entraînement physique sur le cœur diabétique.

#### **4. EFFET D'UN ENTRAÎNEMENT PHYSIQUE SUR LE CŒUR DIABÉTIQUE**

Chez l'homme comme dans toutes les espèces animales habituellement étudiées, la charge hémodynamique imposée par un entraînement physique de longue durée induit un certain nombre d'adaptations physiologiques fondamentales du cœur. Celles-ci incluent une augmentation du débit cardiaque maximal, une élévation de la consommation d'oxygène maximale ( $VO_2$  max), une bradycardie de repos et lors d'un exercice submaximal, une augmentation du volume systolique maximal, une augmentation des dimensions de fin de diastole du ventricule gauche, une amélioration de la fonction contractile du myocarde et une hypertrophie adaptative. L'ensemble de ces adaptations induisent ce qui est communément appelé le « cœur d'athlète » (Carré et coll. 2006).

Aujourd'hui, la pratique physique régulière est réellement reconnue dans la prise en charge thérapeutique du diabète. Des études ont démontré que les événements cardiovasculaires délétères apparaissant au cours du diabète peuvent être prévenus par une activité physique régulière (Nadeau et coll. 1988, De Angelis et coll. 2000). Les paragraphes suivants vont détailler les effets d'un entraînement physique au cours de la cardiomyopathie diabétique.

##### **4.1. Effet de l'entraînement sur l'aptitude aérobie**

La  $VO_2$  est un très bon indice pour évaluer l'aptitude aérobie d'un sujet. De plus, il est fortement admis qu'un programme d'entraînement en endurance s'accompagne d'une amélioration de cette aptitude aérobie évaluée par une augmentation de la  $VO_2$  max.

Cet effet bénéfique de l'entraînement est retrouvé chez des rats mâles diabétiques de souche Sprague-Dawley (Wegner et coll. 1987). En effet, 9 semaines d'entraînement sur tapis roulant, à raison de 45 à 60 minutes à 60-70% de  $VO_2$  max, 5 jours par semaine, induisent une augmentation de la  $VO_2$  max des rats diabétiques. Les données chez l'homme font également ressortir le rôle bénéfique de l'entraînement sur l'aptitude physique. En effet, Laaksonen et coll. (2000) ont montré que 3 à 4 mois d'entraînement à dominante aérobie permet d'augmenter la  $VO_2$  pic chez des hommes actifs diabétiques. De même, en utilisant une épreuve sous-maximale validée, la *Physical Working Capacity 170* ( $PWC_{170}$ ), Heyman et coll. (2007) ont mis en évidence un effet bénéfique de 6 mois

d'entraînement également à dominante aérobie sur l'aptitude physique d'adolescentes diabétiques.

Il ressort donc de ces études chez l'homme comme chez l'animal que l'entraînement à dominante aérobie améliore l'aptitude physique au cours du diabète. Ces effets bénéfiques de l'entraînement seraient liés à la restauration au moins partielle des propriétés fondamentales des systèmes cardiovasculaires et musculaires. Ainsi, dans la suite de ce travail, nous aborderons les effets de l'entraînement sur le cœur diabétique tout d'abord d'un point de vue du métabolisme énergétique puisque les altérations de la fonction cardiaque au cours du diabète résultent dans un 1<sup>er</sup> temps d'altérations du métabolisme énergétique. Ensuite, nous nous intéresserons aux effets de l'entraînement sur la fonction cardiaque en elle-même puis sur 2 de ces systèmes de contrôle, le système  $\beta$ -adrénergique et le système de régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

#### **4.2. Effet de l'entraînement sur les hormones et métabolites**

Il est bien connu que le diabète sucré se caractérise par une hyperglycémie chronique et une hypertryglycémie associées à la déficience en insuline. Il se pourrait, cependant, que l'exercice puisse atténuer ces altérations. En effet, l'entraînement, qui améliore la sensibilité à l'insuline des rats normaux (Berger et coll. 1979, Mondon et coll. 1980), pourrait améliorer les anomalies du métabolisme des carbohydrates et des lipides associés à la déficience en insuline induite expérimentalement. Cependant, si les concentrations plasmatiques de repos en lipides (triglycérides, cholestérol, lipoprotéines à haute densité) sont nettement diminuées chez des rats diabétiques après 8 à 10 semaines d'entraînement physique (Reaven et Chang 1981, Tancrede et coll. 1982, Paulson et coll. 1987, 1988, 1992a, Broderick et coll. 2005), celles de glucose sont tantôt inchangées ( Paulson et coll. 1987, 1988, 1992a, Deblieux et coll. 1993), tantôt diminuées (Reaven et Chang 1981, Tancrede et coll. 1982, Sylvestre-Gervais et coll. 1984, Nadeau et coll. 1986, Plourde et coll. 1992, Hall et coll. 1995). Néanmoins, il semble que la durée du programme d'entraînement puisse jouer un rôle dans cette divergence de résultats. En effet, dans les études où l'entraînement n'a aucun effet sur la concentration plasmatique de repos du glucose, la durée de l'entraînement est de 8 semaines (Paulson et coll. 1987, 1988, 1992a, Deblieux et coll. 1993) alors que dans celles où la concentration plasmatique de glucose est

diminuée chez les rats diabétiques entraînés comparés aux rats diabétiques sédentaires, l'entraînement dure 10 semaines (Reaven et Chang 1981, Tancrede et coll. 1982, Sylvestre-Gervais et coll. 1984, Nadeau et coll. 1986, Plourde et coll. 1992, Hall et coll. 1995). Il semble donc que la durée du programme d'entraînement doive être suffisamment importante pour induire de quelconques effets sur les niveaux plasmatiques de glucose. De plus, 10 semaines après l'induction d'un diabète modéré (injection de 45 mg/kg de STZ) non traité thérapeutiquement, il a été observé que les niveaux d'insuline sont comparables (ou légèrement inférieurs) (Reaven et Chang 1981, Tancrede et coll. 1982, Sylvestre-Gervais et coll. 1984, Hall et coll. 1995) chez les rats diabétiques entraînés par rapport aux rats diabétiques sédentaires. Face à ce constat, il est raisonnable d'attribuer les effets bénéfiques de l'exercice sur l'homéostasie du glucose à l'augmentation de la sensibilité de l'insuline. En effet, les mesures de l'insuline circulante suggèrent, pour Tancrede et coll. (1982) que l'amélioration de la tolérance au glucose induite par l'entraînement chez les rats diabétiques est dépendante de la sensibilité à l'insuline plus que d'une augmentation de la sécrétion en insuline. Cette suggestion est basée sur le fait que les rats diabétiques entraînés ont des niveaux similaires d'insuline et une courbe de réponse de l'insuline à la surcharge de glucose par intraveineuse similaire, mais des niveaux de glucose plus faibles que les rats diabétiques sédentaires. Ainsi, l'entraînement physique semble induire des effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose, notamment par l'intermédiaire d'une meilleure sensibilité à l'insuline.

#### **4.3. Effet de l'entraînement sur le transport et l'utilisation du glucose au niveau du cardiomyocyte diabétique**

L'entraînement semble avoir un effet bénéfique sur le transport de glucose au niveau du cardiomyocyte. En effet, le captage myocardique de glucose au repos et à l'exercice est significativement augmenté après 7 à 13 semaines d'entraînement de nage, chez des rats contrôles non diabétiques (Kainulainen et coll. 1989). Dans les coeurs de rats diabétiques, l'entraînement en endurance augmente le taux de GLUT<sub>4</sub> présents au niveau du sarcolemme ainsi que de leur ARNm (Hall et coll. 1995, Osborn et coll. 1997). En effet, dans l'étude de Osborn et coll. (1997), suite à un entraînement de 10 semaines sur tapis roulant, les rats diabétiques présentent une normalisation partielle de leur niveau de protéines GLUT<sub>4</sub> cardiaques et sarcolemmales ainsi qu'un retour complet au niveau de

base pour les niveaux d'ARNm de ces protéines. Précédemment, Hall et coll. (1995) avaient montré qu'un entraînement physique chez des rats diabétiques traités à la STZ produit une augmentation partielle des niveaux des protéines GLUT<sub>4</sub> dans le cœur entier. Ces données suggèrent que l'entraînement de rats diabétiques augmente la synthèse de nouvelles protéines GLUT<sub>4</sub> et leur incorporation à la membrane du sarcolemme. Le protocole d'entraînement utilisé n'a cependant eu aucun effet sur les niveaux de protéines GLUT<sub>4</sub> et de leur ARNm chez les rats contrôles non diabétiques. Cette absence d'effet pourrait être dû au fait que les niveaux myocardiques de GLUT<sub>4</sub> sont déjà à un niveau optimal chez les animaux contrôles.

Parallèlement, à cette uprégulation des protéines GLUT<sub>4</sub> et de leur ARNm, l'entraînement physique semble également avoir des effets bénéfiques sur l'oxydation du glucose. En effet, l'étude de Paulson et coll. (1992a) grâce à la technique du cœur isolé perfusé, met en évidence une augmentation de la capacité des cœurs diabétiques à utiliser le glucose comme substrat énergétique suite à une période d'entraînement de 10 semaines. Une étude plus récente (Broderick et coll. 2005) confirme ces effets bénéfiques de l'entraînement sur l'utilisation myocardique du glucose. Ces auteurs montrent bien que comparés aux cœurs contrôles perfusés dans des conditions aérobies, les niveaux d'oxydation myocardique du glucose et de glycolyse sont plus faibles dans les cœurs diabétiques. Suite à l'entraînement, les niveaux d'oxydation du glucose et de glycolyse sont restaurés, ce qui a pour conséquence une amélioration des performances cardiaques chez les animaux diabétiques entraînés comparés aux cœurs diabétiques sédentaires. De plus, pour juger des effets bénéfiques de l'entraînement sur l'oxydation du glucose, Broderick et coll. (2005) ont fait subir aux cœurs isolés perfusés des épisodes d'ischémie-reperfusion. Ils ont alors démontré que pendant la période d'ischémie, la diminution de la glycolyse observée dans les cœurs diabétiques est atténuée suite à l'entraînement. Enfin, durant la reperfusion, l'oxydation du glucose et la glycolyse retournent à leur niveau pré ischémique chez les sédentaires comme chez les entraînés mais les cœurs de rats diabétiques entraînés ont des niveaux d'oxydation du glucose supérieurs. Cette meilleure oxydation est en plus accompagnée d'une amélioration de la récupération de la fonction cardiaque suite à l'ischémie. Ce bénéfice semble lié à une diminution des lipides circulants dans le cœur diabétique qui permet alors une augmentation de l'oxydation du glucose. De plus, si dans l'étude de Paulson et coll. (1992a), l'entraînement de 10 semaines ne semble pas avoir d'effet, *in vivo*, sur les niveaux

d'acylcarnitines à longues chaînes, d'acyl-coA et de phosphates à haute énergie (ATP, ADP, AMP), des résultats contradictoires avaient été obtenus dans des études antérieures (Paulson et coll. 1987, Broderick et coll. 1990). En effet, le contenu en carnitine (habituellement diminué au cours de la cardiomyopathie diabétique) apparaît augmenté et celui d'acylcarnitines à longues chaînes apparaît diminué dans le cœur de rats diabétiques entraînés dans ces deux études. Si la durée du protocole d'entraînement est la même (à savoir 10 semaines), la différence d'effet de l'entraînement sur les acylcarnitines à longues chaînes entre les études de Paulson et coll. (1992a) et Broderick et coll. (2005) pourrait notamment s'expliquer par l'intensité du diabète. En effet, dans l'étude de Broderick et coll. (2005), l'injection de 50 mg/kg de STZ induit un diabète moins sévère que dans l'étude de Paulson et coll. (1992a) où 60 mg/kg de STZ sont injectés. L'entraînement pourrait donc avoir des effets positifs sur le métabolisme des acides gras dans le cœur des animaux diabétiques, dans lequel on retrouve habituellement des niveaux élevés de ces intermédiaires du métabolisme des acides gras, potentiellement toxiques au niveau intracellulaire. Ainsi, en prévenant l'accumulation des acylcarnitines à longues chaînes, l'entraînement peut minimiser les complications cardiaques associées au diabète, en normalisant notamment la participation énergétique provenant de l'oxydation des acides gras. Cet aspect paraît d'une importance capitale dans la mesure où la corrélation entre l'hyperlipidémie et la diminution des performances cardiaques chez les diabétiques pourrait être liée aux effets des lipides sur l'utilisation myocardique du glucose. En effet, une augmentation des lipides circulants induit une inhibition de l'utilisation du glucose, les acides gras devenant la source principale d'énergie (Randle et coll. 1964). Mais comme le ratio de la production mitochondriale d'ATP sur le nombre de molécule d'oxygène consommée pour l'oxydation du glucose est plus élevé que celui obtenu pour l'oxydation des acides gras, la diminution de l'utilisation du glucose peut causer un déséquilibre entre la demande et les apports en oxygène. Ainsi, en diminuant les taux de lipides plasmatiques, l'entraînement physique peut augmenter l'oxydation du glucose dans les cœurs diabétiques. L'amélioration des performances de la pompe cardiaque semble donc bien passer par un meilleur contrôle de la disponibilité en glucose chez le sujet diabétique. Il apparaît donc clairement que l'entraînement physique est efficace dans la prévention de l'altération du métabolisme du glucose myocardique observée dans les cœurs de rats diabétiques. Ceci expliquant en partie les bénéfices de l'exercice sur la prévention des dysfonctions cardiaques.



#### **4.4. Effet de l'entraînement sur la fonction cardiaque et sur les performances contractiles cardiaques**

##### **4.4.1. La fonction myocardique de base**

L'entraînement physique semble donc jouer un rôle fondamental sur la fonction cardiaque, puisqu'il a été démontré qu'il limite les altérations de la fonction myocardique chez le sujet diabétique (Paulson et coll. 1987), notamment grâce à une meilleure utilisation du glucose. Paulson et coll. (1987) ont démontré que dans le cœur isolé perfusé, 8 semaines d'entraînement physique progressif en endurance réduisent la dépression de la fonction cardiaque associée au diabète expérimental. Riggs et coll. (1992) se sont intéressés aux effets d'un entraînement en endurance sur la pression systolique pic du ventricule gauche, sur la dérivée maximale de la pression (+dP/dt max) et sur la fréquence cardiaque. Comme dans l'étude de Paulson et coll. (1987), toutes les mesures de la fonction cardiaque sont déprimées dans les cœurs de rats diabétiques sédentaires *in vivo*. Cependant, l'entraînement physique ne modifie pas significativement le déclin de cette fonction cardiaque. L'orientation initiale semble conclure que l'entraînement n'améliore pas la fonction cardiaque des rats diabétiques. Néanmoins, la pression systolique pic du ventricule gauche, la vitesse et la durée maximale de contraction des rats diabétiques entraînés ne sont pas significativement différents de ceux des rats contrôles. Puisque les rats diabétiques entraînés ne sont pas différents des rats contrôles pour toutes les variables à l'exception de la fréquence cardiaque, il apparaît que l'entraînement physique puisse être efficace au moins en partie en limitant le déclin de la fonction cardiaque induite par le diabète. Cet effet limitant de l'entraînement sur le déclin de la fonction cardiaque a été confirmé par Takeda et coll. (1988). Afin d'estimer les effets de l'entraînement sur la contractilité myocardique, ils ont mesuré la tension isométrique développée par le muscle papillaire du VG chez des rats mâles traités à la STZ suite à un entraînement de nage. L'entraînement n'a induit aucun effet sur cette tension isométrique mais dT/dt max tend à augmenter dans le groupe entraîné. De plus, le changement de dT/dt en réponse à une administration d'isoprotérénol est significativement plus important dans le groupe entraîné que dans le groupe sédentaire. Les auteurs expliquent ces résultats nuancés quant au rôle bénéfique de l'entraînement sur la contractilité myocardique par une durée journalière d'entraînement trop courte. Cette conclusion est à considérer avec précaution puisque 10

min de nage progressivement augmenté jusqu'à 90 min pendant 6 semaines semble constituer un entraînement relativement conséquent.

Par ailleurs, un effet bénéfique de l'entraînement physique sur la fonction cardiaque a été noté par Deblieux et coll. (1993). Dans cette étude, le débit cardiaque (flux aortique et coronaire) a été mesuré à différentes pressions atriales droites sur des préparations de cœur isolé perfusé avec le glucose comme unique substrat énergétique. Les rats diabétiques ont un débit cardiaque diminué aux lourdes charges de travail comparés aux animaux non diabétiques, indiquant chez eux une diminution des réserves cardiaques. Cependant, suite à la période d'entraînement, il est noté une augmentation du débit cardiaque chez les animaux diabétiques (aux charges élevées) dans les mêmes proportions que chez les animaux non diabétiques. Les fréquences cardiaques ne sont pas altérées ni par le diabète, ni par l'entraînement. Il est alors suggéré que l'entraînement physique peut atténuer la sévérité de la cardiomyopathie diabétique puisqu'il atténue la réduction du débit cardiaque associé au diabète. De même, De Angelis et coll. (2000) ont démontré qu'un programme d'entraînement de 10 semaines a des effets bénéfiques sur les dysfonctions hémodynamiques et autonomes observées chez les sujets diabétiques. Cependant, le résultat majeur de cette étude est que l'entraînement renverse la bradycardie, l'hypotension *in vivo*, améliore la fréquence cardiaque intrinsèque ainsi que les propriétés contractiles du myocarde. Plus récemment des travaux de la même équipe ont montré que l'entraînement améliore également la sensibilité chémo- et baro-reflexe artérielle chez des rats diabétiques (Harthmann et coll. 2007). L'étude récente menée par l'équipe de Loganathan et coll. (2007) a confirmé les effets positifs de l'entraînement sur la fonction cardiaque en mettant en évidence une amélioration des performances myocardiques chez des rats diabétiques. En effet, ces auteurs ont montré, en utilisant une série d'évaluations non invasive de la fonction cardiaque grâce à l'imagerie par résonance magnétique, que la diminution du volume ventriculaire en fin de diastole qui accompagne le diabète est prévenue grâce à un entraînement physique de 9 semaines. De plus, l'entraînement atténue également l'augmentation du volume télésystolique observée chez les rats diabétiques sédentaires. Le volume systolique, la fraction d'éjection ainsi que le débit cardiaque des animaux diabétiques sont également améliorés suite aux 9 semaines d'entraînement. Ainsi, cette étude non invasive suggère une amélioration globale des événements du cycle cardiaque chez les rats diabétiques entraînés et confirment les effets bénéfiques de l'entraînement sur la fonction cardiaque observés par l'équipe de Villanueva et coll. (2003) de manière

invasive. En effet, ces derniers ont démontré que l'entraînement physique atténue la diminution du débit cardiaque de base de cœurs isolés perfusés chez des rats diabétiques biobreedings. Ainsi, l'ensemble de ces données confirment le rôle bénéfique de l'entraînement physique dans le management de la cardiomyopathie diabétique. Cependant, les données récentes de Mostarda et coll. (2009) apportent encore du poids quant au rôle bénéfique de l'entraînement. En effet, ils ont montré que les bénéfices de l'entraînement sur les paramètres cardiovasculaires (fréquence cardiaque et pression artérielle de base) et autonomes (fréquence cardiaque intrinsèque) semblent persister après 3 semaines de désentraînement chez des rats diabétiques (Mostarda et coll. 2009). Ainsi, l'ensemble de ces changements représentent une réponse adaptative et persistante à la demande de l'entraînement, soutenant le rôle positif de l'activité physique sur la fonction cardiaque basale des sujets diabétiques.

#### 4.4.2. Les réponses myocardiques à la stimulation $\beta$ -adrénergique

Afin d'évaluer les effets de l'entraînement sur la réactivité myocardique à la stimulation  $\beta$ -AR, Heller et coll. (1988) ont mesuré *in vivo* la fréquence cardiaque, la pression pic intraventriculaire gauche,  $\pm$  dP/dt en réponse à l'administration de plusieurs doses de dobutamine en intraveineuse (*i.v.*) chez des rats diabétiques. Les résultats de cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence un effet positif de l'entraînement sur les réponses ventriculaires inotropes et chronotropes à la dobutamine. Ainsi, les auteurs ont alors conclu que l'entraînement ne modifie pas de manière significative les effets du diabète sur la réponse et la sensibilité du myocarde à la stimulation  $\beta$ 1-AR. Par ailleurs, un entraînement initié avant l'installation du diabète améliore la contractilité myocardique et la réponse cardiaque à la stimulation  $\beta$ -AR, mesurée par administration d'isoprotérenol chez des rats diabétiques anesthésiés (Bidasee et coll. 2008, Shao et coll. 2009). Cette conclusion est basée sur l'amélioration de la pression développée et de  $\pm$ dP/dt du ventricule gauche au repos et en réponse à la stimulation  $\beta$ -AR chez les rats diabétiques entraînés comparés aux rats diabétiques sédentaires. Les auteurs concluent d'ailleurs que l'amélioration *in vivo* de la contractilité et de la réponse cardiaque à la stimulation  $\beta$ -AR est principalement liée à la préservation du niveau protéique des récepteurs  $\beta$ 1-AR. Cette conclusion est cohérente avec le fait que les récepteurs  $\beta$ 1-AR sont les principaux régulateurs de l'inotropie et de la chronotropie dans les cœurs de rats (Altan et coll. 2007).

Ces données récentes suggèrent donc bien que l'entraînement durant le diabète ralentie la progression de la cardiomyopathie.

#### 4.5. Effet de l'entraînement sur le système $\beta$ -adrénergique

Nous venons de voir que l'entraînement physique permet d'améliorer le métabolisme du glucose et ce faisant la fonction myocardique. Or cette homéostasie glucidique est fortement affectées par le système sympatho-adrénergique, et plus particulièrement par les catécholamines, directement (activation de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse) et indirectement (inhibition de la sécrétion d'insuline et stimulation de la sécrétion de glucagon). Ainsi, des études ont cherché à déterminer si les changements dans l'homéostasie du glucose induits par l'entraînement sont liés à des changements adaptatifs du système adrénergique. Cette hypothèse est suggérée à partir d'observations qui montrent que des exercices répétés modulent l'activité du système adrénergique (Galbo et coll. 1977, Christensen et coll. 1979), qui en retour, influence la production et l'utilisation du glucose (Altszuler et coll. 1967, Rizza et coll. 1979). Néanmoins, le système adrénergique est très complexe et des changements adaptatifs peuvent être envisagés à un ou plusieurs niveaux : sécrétion des catécholamines, rythme de turnover, concentrations en hormones circulantes, captage des catécholamines par les tissus, récepteur adrénergique...

##### 4.5.1. Les concentrations myocardiques en catécholamines

Jobidon et coll. (1985) ont montré que les niveaux plasmatiques de base de l'A chez les rats contrôles et diabétiques soumis à l'entraînement sont 2 fois supérieurs à ceux des rats sédentaires. Ces niveaux plasmatiques de base en A ne sont pas surprenants au vu de l'augmentation du contenu adrénal en A suite à l'entraînement. Cette augmentation représente fort certainement une augmentation de la synthèse, puisque les activités des enzymes impliquées dans ce processus sont augmentées dans des situations de stress chronique comme l'exercice (Battista et coll. 1973). Cette étude suggère qu'une augmentation similaire peut être obtenue chez des rats diabétiques.

Bien que des mesures directes de la sécrétion d'A n'aient pas été faites, l'augmentation simultanée des niveaux d'A au niveau adrénal et plasmatique suggère que la sécrétion de base d'A est augmentée chez les animaux entraînés contrôles et diabétiques. Cette

hypothèse est de plus supportée par l'étude des contenus en catécholamines dans le tissu cardiaque. Puisque le contenu en A cardiaque est dépendant de son captage, un contenu élevé au niveau cardiaque peut être interprété comme une augmentation de la sécrétion périphérique par la médullo-surrénale. Bien que l'entraînement s'accompagne d'une augmentation des concentrations en NA plasmatique et adrénale, celle-ci n'est pas significative. Nadeau et coll. (1986) se sont intéressés au rythme de turnover de repos de la NA dans des organes impliqués spécifiquement dans l'homéostasie du glucose (pancréas, foie, muscle squelettique et cœur). En effet, le turnover de la NA est une méthode utilisée pour estimer *in vivo* la contribution du système nerveux sympathique dans la régulation de différents organes tels que le cœur, le pancréas ou le foie. Dans cette étude, bien que l'entraînement cause une réduction du niveau plasmatique en glucose chez les rats diabétiques, aucun changement dans le rythme de turnover de la NA dans le cœur, le foie ou le muscle gastrocnémien n'est observé chez les rats contrôles ou diabétiques entraînés. Ces auteurs concluent alors que les effets bénéfiques de l'entraînement sur le diabète sucré, et plus particulièrement sur l'homéostasie du glucose, ne peuvent pas s'expliquer par des changements adaptatifs dans l'activité du système nerveux sympathique.

#### 4.5.2. Le système récepteurs $\beta$ -AR / protéine G / adénylate cyclase

Une des plus importantes caractéristiques du cœur de rats diabétiques est la diminution de la réponse cardiaque à la stimulation par des agonistes  $\beta$ -AR qui apparaît dès les 1ers stades de la maladie (Heyliger et coll. 1982). Cette moindre réponse pourrait être notamment expliquée par la diminution de la densité des récepteurs  $\beta$ -AR (Latifpour et McNeill 1984, Nishio et coll. 1988), c'est-à-dire par le phénomène de down régulation de ces récepteurs, résultat d'une surexposition aux catécholamines. Cependant, les études plus récentes (Dinçer et coll. 2001) ont montré que le diabète induit des modifications spécifiques des sous-types de récepteurs. Ainsi, la diminution de la réponse cardiaque et plus particulièrement de la force de contraction à la stimulation  $\beta$ -AR serait liée à une diminution des  $\beta$ 1-AR (rôle inotrope positif) et une augmentation des  $\beta$ 3-AR (rôle inotrope négatif).

Ainsi, face à ces modifications des récepteurs  $\beta$ -AR au cours de la cardiomyopathie diabétique, on se retrouve face à un véritable paradoxe. En effet, l'entraînement en

endurance et la stimulation sympathique pathologique, de part les concentrations en NA élevées qu'ils induisent, engendrent des modifications similaires au niveau des récepteurs  $\beta$ -AR dans le VG. En effet, Barbier et coll. (2004) ont également montré une diminution du nombre de récepteurs  $\beta_1$ -AR et une augmentation du nombre de récepteurs  $\beta_3$ -AR dans le tissu ventriculaire de rats sains entraînés. Cependant, dans le cas de l'entraînement, ces modifications ont des répercussions positives « le cœur d'athlète » (Booth et coll. 1991) alors que dans le cas du diabète, elles ont des répercussions négatives « le cœur diabétique » (Rozec et coll. 2003).

Cependant, l'effet combiné de l'entraînement et du diabète sur les différents sous-types de récepteurs  $\beta$ -AR reste à préciser. La première étude relative aux effets de l'entraînement sur les récepteurs  $\beta$ -AR cardiaque du sujet diabétique a été réalisée par Sylvestre-Gervais et coll. en 1984. Ils se sont intéressés plus particulièrement aux récepteurs  $\beta$ -AR du tissu ventriculaire. Les résultats de cette étude mettent en évidence que l'entraînement physique chez des rats diabétiques réduit le nombre et la densité des récepteurs  $\beta$ -AR dans le tissu ventriculaire cardiaque. Parallèlement, il est noté que bien que les valeurs basales de catécholamines ne soient pas affectées par le diabète seul, les concentrations en A plasmatique sont 3 fois plus élevées chez les rats diabétiques entraînés que chez les rats diabétiques sédentaires ou contrôles (les concentrations en NA ne sont pas modifiées). Ainsi, il peut être suggéré qu'il existe une relation entre la diminution de la densité des récepteurs adrénergiques et l'augmentation des concentrations en A. En effet, ces concentrations augmentées pourraient jouer un rôle dans le phénomène de down-régulation des récepteurs  $\beta$ -AR. Cependant, ces effets de l'entraînement sur la densité des récepteurs peuvent être remis en cause par l'étude de Plourde et coll. (1991). En effet, dans cette étude, la densité des récepteurs  $\beta$ -AR est significativement réduite chez les rats diabétiques sédentaires et entraînés comparés aux rats sédentaires contrôles. L'entraînement des rats diabétiques n'induit aucun effet sur la densité des récepteurs. De plus, bien que le nombre de récepteurs  $\beta$ -AR à haute affinité soit réduit chez les rats diabétiques, l'entraînement n'induit aucun changement dans les interactions des récepteurs  $\beta$ -AR avec les protéines Gs. Cette étude démontre donc une diminution du nombre de récepteurs  $\beta$ -AR dans le tissu ventriculaire des rats diabétiques. Cette altération est principalement due à une réduction des récepteurs à l'état de haute affinité, expliquant bien la diminution de l'activité de l'AC stimulée par l'isoprotérenol, observée chez les animaux diabétiques. Toutes ces

observations restent valables dans le groupe diabétique entraîné alors même que les animaux montrent une amélioration de leur état diabétique. Néanmoins, l'étude très récente menée par l'équipe de Bidasee et coll. (2008) relance le débat sur les effets de l'entraînement physique sur les récepteurs  $\beta$ -AR, notamment en différenciant les trois isoformes. En effet, ces auteurs ont mis en évidence qu'un entraînement nettement plus faible en durée et en intensité que celui utilisé dans les études citées précédemment, mais initié avant le début du diabète, prévient la diminution des récepteurs  $\beta$ 1-AR. En effet, il est montré que l'entraînement augmente le binding du [ $^3$ H]dihydroalprenolol, données cohérentes avec l'augmentation du niveau d'expression des récepteurs  $\beta$ 1-AR chez les rats diabétiques entraînés. Ce programme d'entraînement n'a cependant aucun effet sur les deux autres isoformes  $\beta$ 2- et  $\beta$ 3-AR. Ces données récentes suggèrent donc que l'entraînement préserve la densité des récepteurs  $\beta$ 1-AR, régulateurs importants de l'inotropie et de la chronotropie cardiaque.

Si les effets bénéfiques de l'entraînement sur la fonction cardiaque peuvent résulter de modifications au niveau du système  $\beta$ -adrénergique, il paraît également important de s'intéresser au système de régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, qui comme nous l'avons vu précédemment est fortement impliqué dans la cardiomyopathie diabétique.

#### **4.6. Effets de l'entraînement sur les mouvements de calcium intracellulaire**

A notre connaissance, très peu d'études se sont intéressées aux effets de l'entraînement sur le système de régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans le cas du diabète. Howarth et coll. (2008) se sont intéressés aux effets de 2 types d'entraînement (intensité légère ou modérée) sur le raccourcissement et le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans des myocytes de rats rendus expérimentalement diabétiques depuis 2 mois. Ils ont montré que l'entraînement, quelque soit l'intensité utilisée, n'atténue ni la prolongation du temps d'atteinte du pic de raccourcissement, ni l'augmentation de son amplitude induites par le diabète. De plus, la durée prolongée de la transitoire calcique observée dans les myocytes diabétiques n'a pas été raccourcie par l'une ou l'autre des 2 modalités d'entraînement. Puisque cette prolongation de la transitoire calcique peut, en partie être attribuée à des altérations dans les mécanismes de libération et captage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS, les auteurs ont mesuré la

libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS suite à une stimulation électrique ou à une application de caféine. Il apparaît alors que la fraction de  $\text{Ca}^{2+}$  libérée par le RS n'est pas modifiée par l'entraînement léger ou modéré, suggérant alors que le contenu de  $\text{Ca}^{2+}$  libérable par le RS n'est pas modifié par l'entraînement chez le rat diabétique.

Les auteurs suggèrent que les intensités d'entraînement choisies, légère ou modérée, ne sont pas suffisantes pour moduler la dynamique de contraction du muscle cardiaque et donc pour renverser les effets délétères du diabète sur cette dynamique. Ils en concluent que l'intensité et/ou la durée de l'entraînement doit être augmentée afin de pouvoir quantifier les effets bénéfiques de l'entraînement sur la fonction cardiaque. Ainsi, dans une étude plus récente de la même équipe, le rôle cardioprotecteur éventuel d'un entraînement long et intense mis en place dès le début de la maladie (1 semaine après le traitement à la STZ) a été évalué sur les performances contractiles et sur la transitoire calcique dans des myocytes ventriculaires de rats diabétiques (Howarth et coll. 2009). Si le diabète prolonge le délai d'obtention du pic de raccourcissement, l'entraînement intense chez les animaux diabétiques prolonge encore davantage ce délai, sans avoir d'effet significatif sur l'amplitude de la contraction ou sur la transitoire calcique. Ni le diabète et l'entraînement intense n'ont eu d'effet sur la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, les auteurs concluent qu'un entraînement long et intense influence la dynamique mais pas l'amplitude de la contraction mesurées sur des myocytes provenant de rat diabétique.

Cependant, les effets d'un entraînement peuvent également varier selon qu'il soit initié au début du diabète ou lorsque la maladie est déjà installée, lorsqu'un certain nombre de complications cardiovasculaires sont déjà développées. Récemment, Shao et coll. (2009) se sont intéressés aux effets d'un entraînement de 4 semaines initié 3 semaines après l'induction du diabète chez des rats. Après avoir démontré que ce type d'entraînement était efficace pour limiter la perte de contractilité myocardique, ils ont étudié la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. Dans cette étude, l'entraînement atténue l'augmentation des sparks calciques spontanés résultant d'une activation anarchique du récepteur à la ryanodine au cours du diabète. Cet effet bénéfique de l'entraînement peut s'expliquer par une meilleure stabilisation du RyR2 puisqu'il a été montré que les membranes de RS préparées à partir des cœurs de rats diabétiques entraînés contiennent des niveaux normalisés de FKBP 12 lié à RyR2. L'entraînement atténue également la diminution de l'amplitude de la transitoire calcique et du rythme d'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$ , paramètres qui sont en partie dépendants de l'activité de RyR2 dans les myocytes. En plus des libérations spontanées de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS,



les auteurs ont aussi étudié les effets de l'entraînement sur les transitoires calciques. Il apparaît alors que l'entraînement atténue les libérations diastoliques et asynchrones de  $\text{Ca}^{2+}$ , et les auteurs suggèrent que cet effet bénéfique de l'entraînement pourrait passer par la normalisation de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  du RyR2 observée chez les animaux diabétiques entraînés. Enfin, les auteurs montrent et concluent que l'entraînement initié avant le début du diabète préserve la fonction du RyR2, en réduisant la phosphorylation du récepteur au niveau de Ser2808 (par la PKA et la CaMKII) et Ser2814 (CaMKII). Cette étude récente apporte donc de nouvelles données permettant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels l'entraînement pourrait améliorer la fonction myocardique au cours du diabète.

## 5. SYNTHESE ET OBJECTIFS

Les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la cardiomyopathie paraissent complexes, multifactoriels et intriqués. Néanmoins, des altérations au niveau du système  $\beta$ -adrénergique associés à des altérations au niveau du système de régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire semblent en partie responsables des modifications des propriétés contractiles du myocarde lors de la cardiomyopathie diabétique. De nombreuses études expérimentales démontrent que le traitement à l'insuline, principale stratégie thérapeutique du diabète, joue un rôle primordial dans l'amélioration de la fonction myocardique en atténuant les désordres occasionnés par le diabète au niveau de la fonction  $\beta$ -adrénergique et de l'homéostasie calcique. Cependant, le traitement insulinique chez le patient diabétique n'empêche pas, à long terme, le développement de nombreuses complications cardiovasculaires. Ainsi, la pratique physique régulière est aujourd'hui fortement conseillée comme complément aux traitements médicamenteux. Bien reconnue dans la prise en charge thérapeutique du diabète, elle permettrait de limiter les facteurs de risques cardiovasculaires. D'après les études expérimentales récentes de Bidasee et coll. (2008) et Shao et coll. (2009), un entraînement physique de courte durée pourrait améliorer la fonction cardiaque en agissant, comme le traitement insulinique, au niveau du système  $\beta$ -adrénergique d'une part et du système de régulation du calcium intracellulaire d'autre part. Néanmoins, si le traitement à l'insuline et l'entraînement physique paraissent efficaces au moins à court terme dans le traitement du diabète, les effets respectifs de l'un et de l'autre à plus long terme n'ont jamais été étudiés. Il nous semble donc nécessaire de déterminer sur une durée conséquente, les effets respectifs de l'entraînement physique (études 1 et 2) et du traitement à l'insuline (étude 2) sur la fonction cardiaque en portant une attention particulière au système  $\beta$ -adrénergique et/ou au système de régulation du calcium intracellulaire. Enfin, bien que constituant avec l'alimentation, les pierres angulaires de la prise en charge thérapeutique du diabète, les effets combinés du traitement à l'insuline et de l'entraînement physique n'ont jamais été étudiés ensemble chez l'homme comme chez l'animal. Ainsi, nous faisons l'hypothèse qu'à long terme, le traitement à l'insuline et l'entraînement physique peuvent agir de manière synergique et ce faisant améliorer les performances myocardiques médiées plus particulièrement par les protéines régulatrices du calcium. Il nous semble donc intéressant de mener une analyse à la fois sur le plan

moléculaire et sur le plan fonctionnel des adaptations myocardiques apparaissant dans le cœur diabétique en réponse à un traitement bi-dimensionnel combinant le traitement à l'insuline et l'entraînement physique (étude 2). La dernière étude amorcée dans cette thèse vise à étudier l'un des acteurs clé impliqué dans la régulation des réponses contractiles le NO. En effet, le NO, produit par les NOs, joue un rôle régulateur important en particulier en modulant l'activité des protéines calciques. Il s'agit dans un premier temps d'étudier la relation RyR2/NOs1 dans les cœurs diabétiques entraînés ou non (étude 3).



# ***CONTRIBUTION PERSONNELLE***

## *Méthodologie générale*

**Fiche technique n°1 :**  
**Identification de la population d'étude**

**Modèle animal :** rat

**Souche :** Wistar

**Sexe :** mâle

**Age :** 9 semaines (au début de l'étude)

**Provenance :** élevage « Janvier » (Le Genest Saint Isle, 53 940 France)

**Hébergement :** animalerie

- UMR 6061 - Génétique et Développement (CNRS / Université de Rennes 1)
- validée par les services vétérinaires départementaux
- avec un rythme nuit-jour autoprogrammé de 12 heures
- température entre 20 et 22°C

**Alimentation :**

- croquettes produites et commercialisées par "HERSTELLER" ("special diet service")
- eau du robinet
- alimentation et hydratation libres

**Répartition des animaux dans les différents groupes d'étude :**

- répartition aléatoire en 3 groupes :
  - o diabétiques (STZ)
  - o diabétiques traités à l'insuline (STZIns)
  - o non diabétiques (C)

**Fiche technique n°2 :**  
**Induction du diabète**

Le modèle animal de diabète est induit chimiquement par injection de **streptozotocine (STZ)**.

**Action de cette substance chimique :** action diabétogène en détruisant de manière sélective les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas.

**Induction du diabète par la STZ chez le rat :**

- modèle élaboré par Portha en 1974
- développement d'un syndrome clinique caractérisé par une hyperglycémie, une diurèse osmotique excessive et une perte de poids, similaire au diabète humain
- développement de complications microvasculaires chroniques (néphropathie, neuropathie périphérique et autonome) comme observées chez les patients diabétiques.

L'induction du diabète est réalisée par **injection intrapéritonéale** de STZ diluée avec du tampon citrate.

Les rats contrôles reçoivent une injection de tampon citrate seul.

Préparation de l'acide citrique :

Poids moléculaire (PM) = 192.12

Pour obtenir 50 mL d'acide citrique à [100 mM] : peser 0,96g et ajouter de l'eau Ultrapure (UpH<sub>2</sub>O) jusqu'à 50 mL

Préparation du citrate :

PM = 294.10

Pour obtenir 50 mL de citrate à [100 mM] : peser 1,47g et ajouter de UpH<sub>2</sub>O jusqu'à 50 mL

Préparation du tampon citrate :

Pour obtenir 50 mL de tampon citrate à [0,1 M] – pH 4,5 : mélanger volume à volume soit 25 mL d'acide citrique et 25 mL de citrate puis ajuster le pH.

Préparation de la STZ :

Pour injecter 45 mg/kg de STZ par rat de 350g : diluer 15,75 mg de STZ dans 200  $\mu$ L de tampon citrate

Références produits :

Acide citrique 99% : Sigma 240621

Sodium Citrate Dihydrate : Sigma W 302600

Streptozotocine : Sigma S0130

Références bibliographiques

Pour revue, Szkudelski (2001)

**Fiche technique n°3 :  
Vérification du diabète**

L'action de la STZ sur les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas est accompagnée par des **altérations caractéristiques des concentrations sanguines d'insuline et de glucose.**

L'injection de STZ conduit finalement à une **hyperglycémie chronique** et à une diminution de la concentration sanguine en insuline.

**Confirmation du diabète :**

- 72 heures après l'injection de STZ
- $[\text{glucose}]_{\text{sanguine}}$  mesurée au niveau de la queue  $> 250 \text{ mg.dL}^{-1}$  à l'aide d'un glucomètre
- détection de corps cétoniques par le glucomètre ou par des bandelettes urinaires
- perte de poids



Glucomètre



Bandelettes urinaires

**Références matériels :**

Glucomètre MediSense Optium

Bandelettes urinaires Keto-Diastix® -

Bayer Diagnostic



**Fiche technique n°4 :**  
**Traitement à l'insuline**

Dès la confirmation du diabète, les animaux du groupe STZInsuline sont placés sous un **régime insulinique** jusqu'à la fin du protocole.

Les doses d'insuline sont **individuellement ajustées** afin de maintenir un état euglycémique.

**Le traitement en pratique :**

- injection quotidienne à heure fixe (l'après-midi, après la session d'entraînement pour les rats entraînés)
- utilisation d'un stylo d'insuline injectable
- doses comprises entre 8 et 15 U/kg

**Suivi de la glycémie et ajustement du traitement :**

- contrôle fréquent de la glycémie, en fonction de l'état de la queue des animaux, soit au niveau de la veine de la queue grâce au glucomètre, soit au niveau urinaire grâce aux bandelettes urinaires
- adaptation de la dose d'insuline en fonction de la valeur de glycémie obtenue



Stylo d'insuline



Injection sous-cutanée de l'insuline

**Références médicaments :**

Insuline Glargine Lantus Optiset –  
Sanofi Aventis

**Fiche technique n°5 :**  
**Protocole d'entraînement physique**

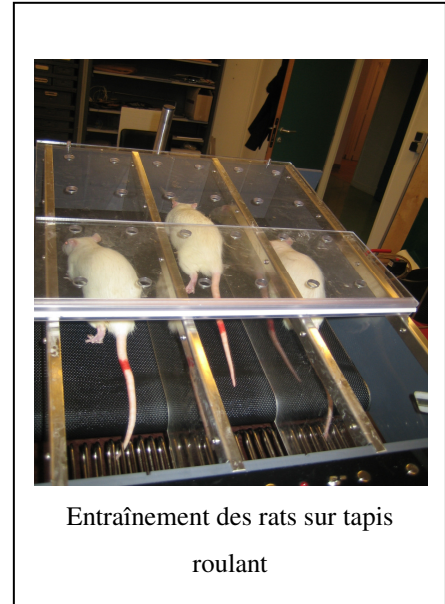
**Organisation :**

- Familiarisation des animaux durant une semaine à l'animalerie puis placement aléatoire dans les groupes sédentaires et entraînés
- Entraînement sur tapis roulant
- Réalisation de toutes les sessions d'entraînement au même moment de la journée, le matin
- Début du protocole d'entraînement une semaine jour pour jour après l'injection de STZ aux rats des groupes diabétiques

**Protocole :**

En accord avec la littérature, l'entraînement consiste en une **course continue d'intensité et de durée progressive** divisée en 3 périodes (Broderick et coll. 2005). Son intensité (durée et vitesse) est augmentée progressivement, la pente du tapis restant fixe sur toute la durée du protocole d'entraînement.

- 8 semaines d'entraînement, à raison de 5 jours par semaine
- pente de 10°
- 1<sup>ère</sup> période : 2 semaines avec pour objectif final 10 min à 20 m/min
- 2<sup>ème</sup> période : 3 semaines → 40 min à 22 m/min
- 3<sup>ème</sup> période : 3 semaines → 60 min à 25 m/min



**Compte-rendu de séance pour chaque rat :**

- Date
- Durée de la course
- Vitesse et pente du tapis
- Poids
- Appréciations sur la qualité de la séance

**Références matériel :**

Tapis roulant : Exer 3/6 Treadmill, Columbus Instruments

**Fiche technique n°6 :**  
**Suivi des animaux au cours de l'étude**  
**Sacrifice**

**Contrôle du poids :**

- Pésée sur une balance classique de tous les animaux le matin avant la séance d'entraînement des animaux des groupes entraînés.

**But :**

- Contrôler régulièrement l'état physique des animaux et leur tolérance à l'entraînement
- Comparer l'évolution des masses corporelles des rats sédentaires et entraînés, et des rats diabétiques et non diabétiques.
- Contrôler l'état du diabète chez les animaux diabétiques.



**Sacrifice :**

- Anesthésie réalisée 24h après la dernière session d'entraînement pour les animaux entraînés
- Anesthésie par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50 mg/kg)
- Disposition particulière pour l'étude de la fonction contractile du myocarde par la technique du cœur isolé-perfusé : au moment de l'anesthésie, injection intrapéritonéale d'héparine (500 U/kg) afin de rendre le sang incoagulable

**Références médicaments :**

Pentobarbital Sodique : Ceva Santé Animale  
Héparine Choay 1F1 5mL

**Fiche technique n°7:****Mesure de l'activité de la citrate synthase**

La mesure de l'activité de la **citrate synthase (CS)**, enzyme du cycle de Krebs, permet de vérifier et d'attester de l'efficacité du programme d'entraînement sur le potentiel aérobie.

Au moment des prélèvements, soit 24h après la dernière session d'entraînement, les gastrocnémiens, muscles squelettiques de la patte postérieure sont prélevés, congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

**Protocole de mesure:**

- Homogénéiser, à l'aide du polytron, les échantillons tissulaires (environ 200 mg) dans un le tampon d'homogénéisation (TH) (dilution au 1/10), contenant un cocktail d'antiprotéases. L'opération se réalise dans un tube à hémolyse, en 20 secondes à 30 000 tr/min.
- Sonifier l'homogénat 60 sec à 50 Hz
- Centrifuger l'homogénat 13 min à 1 500 G, 4°C
- Prélever le surnageant et réaliser des aliquots
- Stocker les aliquots à -80°C

**Composition du tampon d'homogénéisation pH 7,5 :**

- Solution 1 :

(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, EDTA 2 mM)

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> → 14,2 g
- EDTA → 0,744g
- QSP H<sub>2</sub>O → 1L

- Solution 2 :

(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 0,1 M, EDTA 2 mM)

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O → 2,76 g
- EDTA → 0,1488g
- QSP H<sub>2</sub>O → 200 mL

-Tampon d'homogénéisation :

- Solution 1
- QSP solution 2, pH 7,5

**Références produits :**

EDTA : VWR 33 600.267

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : Sigma S 0876

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O: Sigma S 9638

Cocktail d'antiprotéases : Roche  
04693116001

### Fiche technique n°8 :

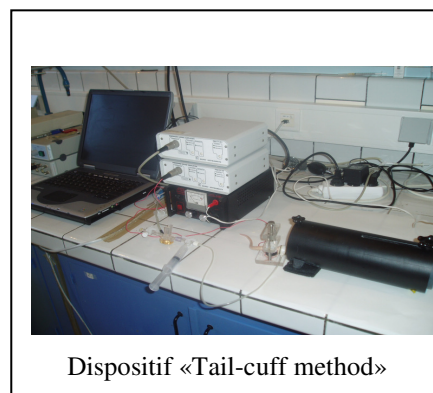
#### Mesure non-invasive de pression systolique et fréquence cardiaque par la queue

##### Dispositif :

La mesure de la pression artérielle systolique et de la fréquence cardiaque au niveau de l'artère caudale peut se faire *in vivo* chez le rat vigile légèrement contraint grâce au dispositif *tail-cuff method* (méthode du manchon caudal) commercialisé par la société Phymep.

Le pouls de l'animal est détecté par un capteur piezoélectrique. L'acquisition et le traitement des signaux sont réalisés par PowerLab 8SP piloté par le logiciel Chart 5 (ADInstrument).

Cette méthode indirecte permet de mesurer les pulsations du flux sanguin au niveau de l'artère caudale et de déterminer la pression artérielle systolique correspondant à la disparition de ce flux à la suite du gonflement d'un manchon en latex autour de la queue du rat.



##### Constitution du système :

- appareil de prise de pression
- boîte de contention chauffante
- capteur de pression
- manchon en latex
- poire et manomètre
- amplificateurs
- boîtier d'interface d'acquisition

##### Avantage du dispositif :

Permet de préserver les animaux

##### Protocole :

- Habituation de l'animal à la boîte de contention chauffante durant quelques minutes
- Mise en place de la queue du rat dans le manchon en latex puis au niveau du capteur de pression
- 15 mesures successives sont ensuite effectuées
- Sélection des 10 meilleures mesures pour obtenir une valeur moyenne cohérente pour la pression artérielle systolique et la fréquence cardiaque pour chaque rat.
- Chaque animal, quelque soit son groupe d'appartenance, est analysé 2 fois avec un intervalle de 8 semaines (durée du protocole d'entraînement).

**Fiche technique n°9 :**  
**Préparation du réactif de Krebs**

Le réactif de Krebs est un **réactif physiologique** utilisé pour préserver les propriétés et l'intégrité fonctionnelle du myocarde lors des manipulations de cœur isolé perfusé. Ce milieu contient tous les éléments nécessaires à la survie du cœur *ex vivo*.

Ce réactif qui constitue le milieu de perfusion est une **solution ionique de Krebs-Henseleit modifiée et tamponnée** par du bicarbonate (pour la stabilité de la préparation). Cette solution de pH 7,4 est équilibrée avec un mélange d'oxygène (95%) et de gaz carbonique (5%) puis filtrée.

La solution de Krebs-Henseleit doit être fraîchement faite, filtrée, oxygénée et chauffée à 37°C au moment de son utilisation.

Préparation du réactif de Krebs :

Pour obtenir 5 L de solution de Krebs-Henseleit pH 7,4 ;

- diluer dans 5L d'H<sub>2</sub>O distillée :

-34,52g de NaCl

-1,75g de KCl

-0,55g de MgSO<sub>4</sub>

-0,8g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

-10,5g de NaHCO<sub>3</sub>

-9,9g de glucose

-contrôler le pH

-oxygéner la solution

-y ajouter 1,11g de CaCl<sub>2</sub>

-contrôler le pH

Molécules	[C] (mM)	Rôle
NaCl	118	Rôle majeur dans l'osmolarité et dans le maintien du potentiel de membrane
KCl	4,7	Permet de maintenir la différence de potentiel de membrane en maintenant la concentration intracellulaire d'ions K <sup>+</sup>
CaCl <sub>2</sub>	1,9	Indispensable à la contraction musculaire et cofacteur enzymatique important
MgSO <sub>4</sub>	1,2	L'ion Mg <sup>2+</sup> est cofacteur enzymatique important
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	Tampon acido-basique
NaHCO <sub>3</sub>	25	Tampon acido-basique, le pH final est de 7,4
Glucose	11	Source d'énergie

**Concentration et rôle des molécules composant le réactif de Krebs**

**Utilisation :**

- perfusion du cœur suite à son prélèvement
- préparation des solutions contenant les drogues nécessaires aux expérimentations.

Références produits :

Sodium chloride 99,5% : Sigma S7653

Kalium chloride: Merck

Calcium chloride 96% : Sigma C4901

Magnesium sulfate heptahydrate : Merck

Potassium phosphate : Sigma P5379

Sodium bicarbonate : Sigma S5761

D-(+)-Glucose 99,5% : Sigma G7528

**Fiche technique n°10 :**  
**Préparation des solutions contenant l'Isoprotérenol**

**Fiche d'identification de l'Isoprotérenol**  
**Hydrochloride**

Synonyme : Isoprénaline, Isuprel

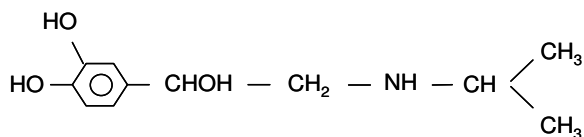
Formule moléculaire : C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> – HCl

Nom Chimique :

3,4-Dihydroxy- $\alpha$ - [(isopropylamino)methyl]phenylmethanole hydrochloride

Poids moléculaire : 247,72

Demi-vie : 1 minute



Mécanismes d'action : l'isoprotérenol a une action spécifique et marquée sur les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques mais ne possède aucune action  $\alpha$ .

Effets physiologiques cardiaques :

- effet inotrope positif lié exclusivement à l'activation des récepteurs  $\beta_1$  du myocarde
- effet chronotrope positif
- effet dromotrope marqué
- effet bathmotrope positif en augmentant l'hyperexcitabilité auriculaire et ventriculaire

Préparation de la solution stock  
d'Iso 10<sup>-4</sup> mol/L

- Diluer 2,48 mg d'Isoprotérenol dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O distillée : obtention d'une solution d'Iso 10-2
- Reprendre 10  $\mu$ L de cette solution d'Iso 10-2 dans 990  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O distillée
- Cette solution est préparée extemporanée

Préparation de la solution d'Iso  
10<sup>-7</sup> mol/L

- Prélever 12,4  $\mu$ L d'Iso 10<sup>-4</sup> puis ajuster à 100 mL avec la solution de Krebs
- Cette solution d'Iso 10<sup>-7</sup> est ensuite diluée plusieurs fois avec la solution de Krebs afin d'obtenir des solutions d'Iso moins concentrées : 2.10<sup>-11</sup> à 10<sup>-5</sup>

Références produits :

- (-) - Isoprotérenol Hydrochloride: Sigma Aldrich I6504

**Fiche technique n°12 :**

**Dispositif du Langendorff pour cœur isolé perfusé**

**Le montage Langendorff comprend :**

- un bain-marie qui permet de maintenir les solutions à 37°C à leur arrivée au cœur
- un système d'oxygénation des solutions grâce à un mélange contenant 95% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>
- une pompe péristaltique qui permet de maintenir le débit à 15 mL/min
- Deux tuyaux semi-rigides pour l'acheminement, en alternance du perfusat jusqu'au cœur après être passé dans un serpentin chauffé à 37°C
- Un piège à bulle qui évite l'arrivée de bulles d'air au niveau du cœur
- Une canule aortique, cannelée, en acier, de 2 mm de diamètre, sur laquelle est fixé le cœur
- Une chambre thermostatée qui permet de maintenir la température autour du cœur à 37°C

**Le système d'enregistrement se compose :**

- D'un capteur de pression constitué d'un ballon de latex rempli d'eau, placé dans le ventricule gauche et relié à un capteur électronique
- D'une interface d'acquisition
- D'un conditionneur de signaux
- D'un logiciel d'acquisition des données



Dispositif Langendorff

**Références matériels :**

Pompe péristaltique : Gibson F155001, Paris,

Capteur de pression : Powerlab MLT 1199, Phymep, Paris, France

Interface d'acquisition : Powerlab 8SP, Phymep, Paris, France

Conditionneur de signaux : Powerlab ML 11°, Phymep, Paris, France

Logiciel d'acquisition : Chart 5, ADInstruments



**Fiche technique n°13 (1) :**  
**La technique du cœur isolé perfusé *ex vivo***

Dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, **Langendorff** décrit la technique permettant de **perfuser** et de **maintenir la viabilité** d'un cœur isolé (Langendorff, 1895).

Le cœur isolé est une préparation permettant **d'étudier la fonction cardiaque** en dehors de l'organisme. L'organe, prélevé chez un **animal vivant et anesthésié**, est installé sur un montage assurant sa perfusion tout en maintenant les cellules cardiaques métaboliquement viables.

**Protocole :**

Une fois prélevé, le cœur est rapidement nettoyé puis monté par l'aorte sur une canule permettant une perfusion retrograde de l'organe (contraire au sens du flux sanguin *in vivo*). Puis successivement :

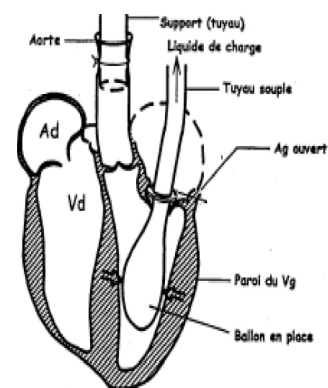
- l'artère pulmonaire est incisée à sa base afin de faciliter le drainage du perfusé
- l'oreillette gauche est délicatement retirée
- un cathéter non fermé et pointu est placé au travers de la paroi du ventricule gauche, au niveau de l'apex pour drainer le liquide qui arrive des veines de Thébésius
- dès lors que les battements cardiaques ont repris de façon régulière, le ballonnet en latex connecté au capteur de pression peut être introduit dans le ventricule gauche *via* les valvules mitrales. Une fois que l'on s'est assuré que l'axe du ballonnet est bien parallèle à l'axe cœur, le ballonnet est alors gonflé de façon à ce que la pression minimale régnant à l'intérieur de celui-ci soit égale à environ 15 mmHg.

Précautions particulières :

Pour un cœur de petite taille comme celui du rat, il convient de ne pas introduire trop profondément la canule dans l'aorte de façon à ne pas obstruer les artères coronaires

La période entre l'excision du cœur et l'initiation de la perfusion doit impérativement être inférieure à 40 secondes, et le temps requis pour que l'opération entière soit achevée est de 2 à 3 minutes.

Un fil de lin est utilisé pour ligaturer l'aorte sur la canule et ainsi garantir la solidité du système aorte-canule.



Introduction du ballonnet dans le  
ventricule gauche  
(Ad : atrium droit, Ag : atrium  
gauche, Vd : ventricule droit, Vg :  
ventricule gauche)

(Zimmer 1998)

**Fiche technique n°13 (2) :**  
**La technique du cœur isolé perfusé *ex vivo***

La technique de Langendorff permet d'évaluer la **contractilité** (inotropisme), la **relaxation** (lusitropisme) et la **fréquence cardiaque** (chronotropisme) par la mesure des paramètres hémodynamiques cardiaques.

Lorsque les paramètres hémodynamiques sont stabilisés (soit environ 20 minutes après le démarrage de la perfusion), les différentes solutions de perfusion peuvent être utilisées :

- L'**Isoprotérenol** est perfusé de la solution la moins concentrée ( $2 \cdot 10^{-11}$  mol/L) vers la solution la plus concentrée ( $10^{-5}$  mol/L)
- Le cœur est perfusé par chacune de ces concentrations d'Isoprotérenol durant 5 minutes.
- Entre chacune de ces solutions de perfusion, le cœur est perfusé durant 5 minutes par la **solution de Krebs** afin de lui rendre un état de fonctionnement basal.

Les mesures des paramètres hémodynamiques peuvent être enregistrées pour chacune des solutions.

**Paramètres hémodynamiques mesurés :**

- **Inotropisme :**
  - DP (mmHg) : pression développée entre la pression maximale en systole et la pression minimale en diastole
  - DP/dt max (mmHg/s) : vitesse de contraction, dérivée première de la pression du ventricule gauche en systole
- **Lusitropisme :**
  - DP/dt min (mmHg/s) : vitesse de relaxation, dérivée première de la pression du ventricule gauche en diastole
- **Chronotropisme :**
  - Fréquence cardiaque (battements/min)



Ecran de contrôle des paramètres hémodynamiques

### Fiche technique n°14 (1):

#### Etude de l'expression des protéines par la technique du Western Blot

La méthode fut mise au point dans le laboratoire de *George Stark* à Stanford. Le nom du **western blot**, donné à la technique par W. Neal Burnette (*Analytical Biochemistry*, 112:195-203, 1981), est un jeu de mot à partir de la technique du Southern blot ou buvardage de Southern, technique de détection d'ADN nommée d'après son inventeur, Edwin Southern et non d'après le point cardinal.

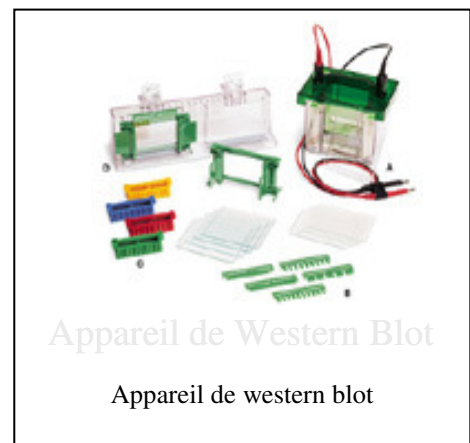
Le **western blot** ou immunoblot, est une méthode de protéomique, ayant recours à la biologie moléculaire, la biochimie et l'immunogénétique, pour détecter une **protéine spécifique** dans un échantillon donné d'extrait ou d'homogénat tissulaire. La technique utilise l'**électrophorèse sur gel de polyacrylamide** pour séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse. Les protéines sont ensuite **transférées** depuis le gel sur une membrane (typiquement en nitrocellulose), où elles sont exposées à un **anticorps spécifique** de la protéine d'intérêt. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer sa taille, sa concentration, les variations de cette concentration, effectuer des comparaisons de concentrations entre différents groupes...

#### Intérêts de la technique :

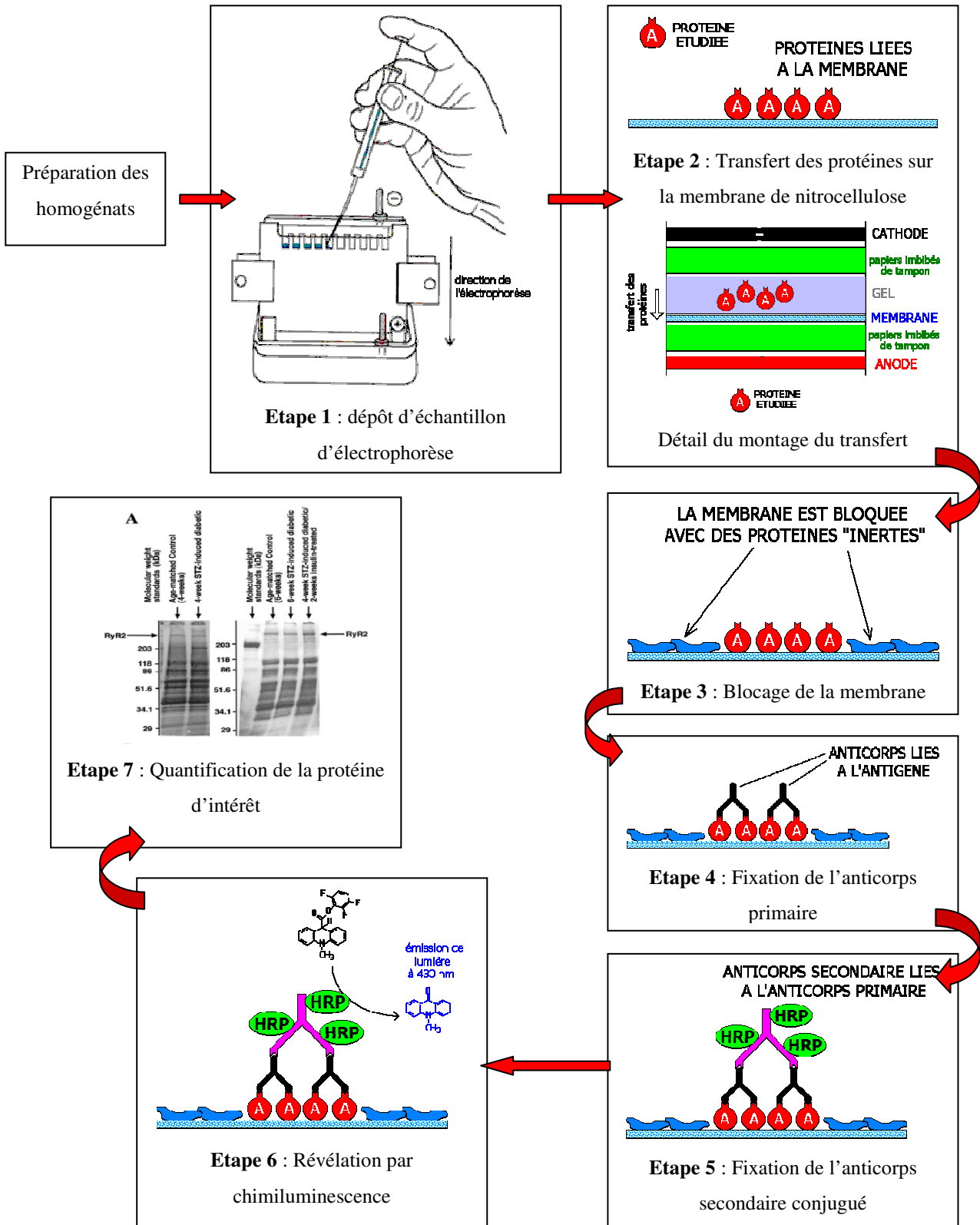
- Sensibilité :
  - Faible quantité d'antigène détectable
  - Faible quantité d'anticorps requise
- Hautement résolutif :
  - Signal facilement quantifiable
  - Fort contraste
- Sécurité de la chimiluminescence (non radioactif)

#### Limites de la technique :

- Technique semi-quantitative
- Sensibilité variable (spécificité et qualité de l'anticorps)



**Fiche technique n°14 (2):  
Etude de l'expression des protéines par la technique du Western Blot**





**Fiche technique n°16 :**  
**Dosage des protéines par la méthode de Lowry**

Cette méthode a été développée par **Lowry et al (1951)** afin de déterminer la quantité totale de protéines contenue dans un échantillon.

**Protocole :**

- Préparer le milieu réactionnel : (pour obtenir 40 mL de ce milieu)
  - Solution B : → 400 µL
  - Solution C : → 400 µL
  - QSP Solution A 40 mL → 39,2 mL
- Faire en double 1 gamme de 0 à 0,7 mg/mL de Sérum Albumine Bovine (BSA) à partir d'une solution à 1 mg/mL
- Selon la dilution choisie :
- Diluer les échantillons au 1/50 :
  - Diluer 10 µL d'homogénat dans 90 µL de tampon de reprise
  - Diluer à nouveau 20 µL dans 80 µL d'H<sub>2</sub>O distillée
  - Prévoir 3 dosages par échantillons
- Ajouter 1000 µL de milieu réactionnel dans chaque tube (gamme et échantillons)
- Ajouter 50 µL de réactif de Folin
- Mettre au bain-marie à 37°C durant 30 min
- Doser par spectrophotométrie à 660 nm (lecteur microplaque)

**Intérêt de la méthode :**

- Grande sensibilité qui peut atteindre 5-10 µg.

**Préparation des solutions stock pour****Lowry :**

- **Solution A :**
  - NaOH → 0,4 g
  - CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> → 2 g
  - QSP H<sub>2</sub>O 100 mL
- **Solution B : Sulfate de cuivre 1%**
  - CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O → 0,4 g
  - QSP H<sub>2</sub>O 10 mL
- **Solution C : Tartrate sodium 1%**
  - C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Na<sub>2</sub> → 0,4 g
  - QSP H<sub>2</sub>O 10 mL

**Références produits :**

BSA : Sigma A7906  
 Réactif de Folin : Sigma F9252  
 NaOH : Sigma 71694  
 CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> : Sigma S7795  
 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O : Fluka 61230  
 C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>, 4H<sub>2</sub>O : Sigma S2377

**Référence matériel :**

Spectrophotomètre : Lecteur microplaque 3 en 1 Biotech Synergy  
 Logiciel Gene 5

**Fiche technique n°17 (1):  
Electrophorèse – Préparation des gels**

**Principe de l'électrophorèse :** identifier les protéines selon leurs poids moléculaires

**Définition :** migration de particules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique, ceci se faisant au travers d'un gel de polyacrylamide en présence de Sodium DocéylSulfate (SDS). On parle alors de SDS-PAGE : **SDS-polyAcrylamide Gel Electrophoresis.**

**Couplage du gel de séparation entre les plaques :**

- Gel de séparation à 20% (FKBP 12.6) - 10% (SERCA2, PLB et NCX) – 7,5% (NOS1) - 5% (RyR2)
  - 4,9 mL (20%), 2,45 mL (10%), 1,225 mL (5%) Acrylamide bis à 40%
  - 2,5 mL Tris HCl à 1,5 M, pH 8,8
  - 0,1 mL SDS à 10%
  - QSP H<sub>2</sub>O 10 mL
  - Ajouter 50 µL Persulfate 10% et 5 µL Temed
- Couler le gel entre les plaques en remontant 0,5 cm en dessous du peigne
- Egaliser avec de l'H<sub>2</sub>O pour obtenir une surface plane
- Après polymérisation, enlever l'H<sub>2</sub>O

**Intérêt des gels :**

- **Le gel de concentration** ("stacking gel") est le gel dans lequel les protéines entrent dans l'acrylamide. Il sert à entasser les diverses espèces protéines en bandes très minces pour augmenter la résolution de la séparation. Dans cette section du gel les protéines ne se séparent pas, elles migrent ensemble en s'entassant dans un volume plus petit que le dépôt. L'acrylamide y est très peu concentré de sorte que toutes les protéines migrent ensemble à la même vitesse.
- **Le gel de séparation** ("separating gel") est le gel dans lequel les protéines entassées dans le gel de tassement se séparent les unes des autres. L'acrylamide y est plus concentré de sorte que les protéines se séparent puisqu'elles migrent à des vitesses différentes, étant retardées selon leur masse moléculaire.

**Fiche technique n° 17 (2) :**  
**Electrophorèse – Préparation des gels**

**Couplage du gel de concentration entre les plaques après polymérisation du gel de séparation :**

- Gel de concentration à 3%
  - 0,375 mL Acrylamide bis à 40%
  - 1,25 mL Tris HCl à 0,5 M, pH 6,8
  - 0,05 mL SDS à 10%
  - QSP H<sub>2</sub>O 5 mL
  - Ajouter 25 µL Persulfate 10% et 5 µL Temed
- Mettre en place le peigne
- Couler le gel jusqu'en haut des plaques

**Préparation du tampon d'électrophorèse :**

- Tampon d'électrophorèse (TE) (5x)
  - Tris base → 15 g
  - Glycine → 72 g
  - SDS → 5 g
  - QSP H<sub>2</sub>O 1 L
  - A diluer 5 fois, soit pour 600 mL : 120 mL de TE 5x pour 480 mL H<sub>2</sub>O

**Intérêt du tampon d'électrophorèse :**

Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu. Le support de ce champ est constitué par le tampon d'électrophorèse (le conducteur) de pH et de concentration convenables dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre.

Préparation des solutions stock :

- **Persulfate d'ammonium 10%** (durée de vie 1 semaine maximum à l'obscurité à 4°C) :
  - Dissoudre 100 mg d'APS dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O distillée
- **Tris HCl à 1,5 M, pH 8,8**
  - Tris base → 27,23 g
  - H<sub>2</sub>O distillée → 80 mL
  - Ajuster pH à 8,8 avec HCl
  - QSP H<sub>2</sub>O 150 mL
- **Tris HCl à 0,5 M, pH 6,8**
  - Tris base → 6 g
  - H<sub>2</sub>O distillée → 60 mL
  - Ajuster pH à 6,8 avec HCl
  - QSP H<sub>2</sub>O 100 mL
- **SDS à 10%**
  - SDS → 10g
  - H<sub>2</sub>O distillée → 100 mL

**Références produits :**

Ammonium Persulfate : Sigma A3678  
 Tris Base : Sigma T1503  
 SDS : Sigma L390  
 Temed : Sigma T9281  
 Glycine : Sigma G7126  
 Acrylamide bis 40% : Bio-Rad 161-0148



**Fiche technique n°18 :**

**Electrophorèse – Préparation des échantillons et migration**

**Préparation du tampon de dépôt (50 mL):**

- Tris-HCl à 0,5 M, pH 6,8 → 3,15 mL
- Glycerol → 10 mL
- SDS 20% → 5 mL
- β-mercaptoéthanol → 2,4 mL
- H<sub>2</sub>O → 29,45 mL
- Bleu de bromophénol à 1% → 50mg

(Autant de mg que de mL de tampon)

- Aliquoter et stocker à -20°C
- Bien agiter avant utilisation

**Préparation des dépôts :**

- Diluer au 1/3 les échantillons (100 µg de protéines) avec ce tampon
- Chauffez à 37 °C – 10 min ou 100°C – 4 min
- Centrifuger (30 secondes à 1000 rpm, soit 250 G)
- Rincer les puits du gel avec le tampon d'électrophorèse avant d'effectuer les dépôts
- Remplir la cuve de TE

**Migration**

- 50 V le temps que les dépôts sortent des puits
- Puis 80V pendant environ 2h en fonction des protéines d'intérêt

**Utilité du Bleu de bromophénol**

Le tampon de l'échantillon versé dans chaque puit contient un colorant ionisé, généralement le bleu de bromophénol, qui permet de suivre l'électrophorèse.

Ce colorant n'est absolument pas retardé durant la migration et indique donc le front de migration électrophorétique. Quant il atteint le bas du gel, l'électrophorèse est arrêtée.

Préparation des solutions stock :

- **Bleu de bromophénol**
  - Bleu de bromophénol → 100 mg
  - H<sub>2</sub>O distillée → 10 mL
  - Aliquoter puis conserver à -20°C

Références produits :

Bleu de bromophénol : Sigma B8026

β-mercaptoéthanol : Sigma M7154

Glycérol : Sigma G 5516

Référence matériel :

Mini-trans Blot electrophoretic transfer cell: Biorad 170-3930

**Fiche technique n°19 (1) :**

**Transfert**

**Principe du transfert :** le principe est le même que celui de l'électrophorèse. Les protéines, après séparation, sont toujours entourées de SDS et donc sous l'influence d'un champ électrique, les protéines vont migrer de l'anode vers la cathode. A la petite différence qu'ici, les électrodes sont de part et d'autres du gel et non pas dans le plan du gel.

**Définition :** sous l'influence du courant électrique, fixation des protéines, de façon non spécifique, sur la membrane de nitrocellulose :

- Interactions ioniques
- Interactions hydrophobes

**Préparation du tampon de transfert :**

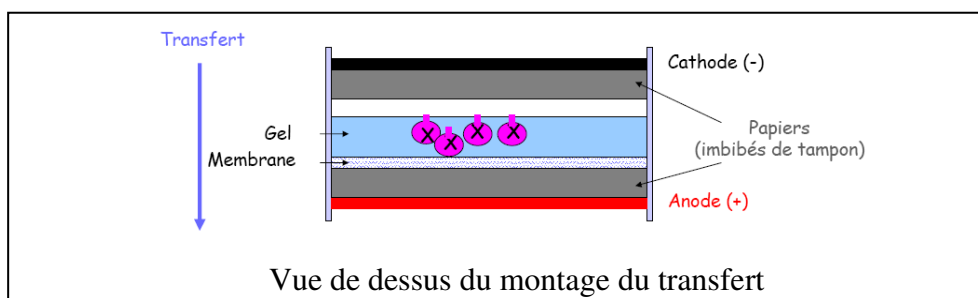
- Tampon de transfert (TT) (5x)
  - Tris base → 6 g
  - Glycine → 28,8 g
  - SDS → 0,2 g
  - QSP H<sub>2</sub>O 400 mL
  - A diluer 5 fois, soit pour 1,5 L :
    - 300 mL de TT 5x
    - 150 mL d'éthanol (10%)
    - ou 75 mL (5%)
    - QSP H<sub>2</sub>O 1,5 L
  - A conserver au frais

Pour les grosses protéines telles que RyR<sub>2</sub>, on utilise un TT à 5% d'éthanol

**Référence matériel :**

Membrane nitrocellulose 0,2 µm pour SERCA, PLB, NCX et FKBP / 0,45 µm pour RyR2 et NOs1 : Biorad 162-0112 / 162-0115

Membrane PVDF 0,2 µm pour β-AR : Biorad 162-0177



**Fiche technique n° 19 (2) :**

**Transfert**

**Préparation des membranes PVDF :**

- Tremper les éponges, les papiers filtres dans le TT
- Couper la membrane à la dimension du gel
- Passage des membranes dans de l'éthanol
- Tremper les membranes 5 minutes dans de l'H<sub>2</sub>O
- Tremper les membranes 10 minutes dans le TT

**Préparation du gel :**

- Démouler le gel
- Enlever le gel de concentration
- Couper le côté en haut à gauche, diagonalement opposé au puit n°1 (poids moléculaire)
- Tremper le gel 15 minutes dans le TT

**Préparation du sandwich :**

- Mettre la partie grise vers l'opérateur
- Placer une éponge
- Placer un papier filtre
- Placer le gel
- Placer la membrane
- Enlever les bulles en faisant rouler une pipette sur l'ensemble
- Placer un papier filtre
- Placer une éponge
- Fermer le sandwich après avoir de nouveau enlever les bulles

**Mise en place :**

- Placer le sandwich dans le support (côté gris vers le noir – anode)
- Placer le support dans la cuve contenant le TT, y ajouter le bloc de glace et un agitateur
- Laisser migrer en chambre froide 1h30 à 110V ou la nuit à 30V
- A 110V, vérifier au bout d'une heure si il n'y a pas de surchauffe et si besoin, changer le TT

**Fiche technique n°20 :**  
**Préparation des tampons de lavage**

Préparation du tampon de lavage :

- **TBS 10x, pH 7,4**
  - Tris base → 30 g
  - NaCl → 80 g
  - QSP H<sub>2</sub>O distillée 1 L
  - Ajuster le pH à 7,4 avec HCl
  
- **PBS 10x, pH 7,5**
  - NaCl → 80 g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> → 11,5 g
  - KCl → 2g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> → 2g
  - QSP H<sub>2</sub>O distillée 1 L
  - Ajuster le pH à 7,5 avec NaOH
  
- **TBS ou PBS 1x**
  - TBS ou PBS 10 x → 100 mL
  - QSP H<sub>2</sub>O à 1 L
  - Ajouter 1 mL de tween 20 pour obtenir du  
TBS – Tween 0,1% (**TTBS 0,1%**)  
ou  
du PBS – Tween 0,1% (**TPBS 0,1%**)

Références produits :

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : Prolabo 28.028.298  
KCL : Sigma P9333  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Sigma P5379  
Tween 20 : Sigma P1379

**Fiche technique n°21 :**  
**Blocage ou Saturation des membranes**

**Principe du blocage :** avant de sonder un immuno-transfert à l'aide d'un ligand spécifique, tous les sites de fixation potentiels non utilisés de la membrane doivent être bloqués. On parle de blocage de la membrane mais aussi de saturation de la membrane.

**Rinçage de la membrane : (1)**

- Pour une membrane de 40 cm<sup>2</sup>, laver avec 10 mL de TTBS 0,1% pour NCX, SERCA 2, PLB et FKBP 12 ou avec TPBS 0,1% pour RyR<sub>2</sub>, NOs1 et β-AR pendant 10 minutes en agitation

**Coloration au rouge ponceau :**

- Mettre la membrane sur du saran
- La colorer avec 6 mL environ de rouge ponceau pendant 5 minutes
- Rincer à l'H<sub>2</sub>O

**Blocage :**

- Incuber la membrane 2 heures à température ambiante ou la nuit à 4°C dans le tampon de blocage suivant : **TTBS 0,1% - Lait 5% ou TPBS 0,1% - Lait 5% :**
  - TTBS 0,1% ou TPBS 0,1% → 100 mL
  - Lait 5% → 5 g

**Rinçage de la membrane : (2) Idem (1)**

**Utilité de la coloration au rouge ponceau :**

Cette étape permet de se rendre compte si l'électrophorèse et le transfert se sont bien passés. La coloration ne sera pas spécifique de la protéine recherchée, mais en connaissant la masse molaire de cette protéine on pourra déjà dire si l'extrait cellulaire contenait ou non la protéine.

**Références produits :**

Rouge ponceau : Sigma Fluka P7170

Lait écrémé : Régilait

Tween 20 : Sigma P 1379

**Fiche technique n° 22 (1):**

**Hybridation des anticorps – Anticorps primaire**

**Principe de l'hybridation primaire:**

La membrane de nitrocellulose contient l'ensemble des protéines de l'extrait cellulaire, il faut mettre en évidence spécifiquement la protéine recherchée. La meilleure méthode pour caractériser une protéine au milieu d'autres protéines est l'immuno-marquage. La protéine joue le rôle d'un antigène face à des anticorps spécifiques (Ac primaires) de cette protéine.

**Dépôt du 1<sup>er</sup> Ac :**

- Diluer les Ac au 1/200, soit 50 µL d'Ac dans 10 mL de solution de blocage spécifique à chaque Ac (pour une membrane de 40 cm<sup>2</sup>)
- Pour HSC 70, marqueur de charge, utiliser une dilution au 1/5000, soit 2 µL d'Ac dans 10 mL de solution de blocage
- Déposer les Ac sur la membrane
- Laisser incuber 2 heures à température ambiante ou la nuit à 4°C

**Lavage de la membrane :**

- Dans la solution de lavage (TTBS 0,1% ou TPBS 0,1%) :
  - 3 lavages rapides de 1 minute dans 10 mL (pour chaque lavage)
  - 3 lavages de 5 minutes dans 10 mL

Préparation de la solution de blocage spécifique à chaque Ac:

- TTBS 0,1% - Lait 5% pour NCX, SERCA 2, PLB et FKBP 12
- TPBS 0,1% - Lait 5% pour RyR<sub>2</sub>, NOs1 et β-AR

Références produits :

Ac 1aire Goat (Tebu-Bio)

- Anti-SERCA2 (N-19) : Sc-8095
- Anti-PLB (L-15) : Sc 21923
- Anti-NCX (C-15) : Sc-30306
- Anti-β3 (M-20): Sc-1473

Ac 1aire Mousse (Affinity Bioreagents)

- Anti-RyR : MA3-916

Ac 1aire Rabbit (Tebu-Bio)

- Anti-β1 (V-19): Sc-568
- Anti-β2 (H-20): Sc-569
- Anti NOs1 (K-20) : Sc1025

Ac 1aire Rabbit (Affinity Bioreagents)

- Anti-FKBP 12: PA1-026A

Ac 1aire Mousse (Tebu-bio)

- Anti-HSC70 (B-6): Sc-7298

**Fiche technique n° 22 (2):**

**Hybridation des anticorps – Anticorps secondaire**

**Principe de l'hybridation secondaire:**

Une fois le complexe antigène-anticorps formé, il faut le détecter. Cette étape se fait grâce à un deuxième anticorps (anticorps secondaire) qui détecte les emplacements où des anticorps primaires se sont fixés sur des antigènes ancrés à la membrane. L'anticorps secondaire n'a pas besoin d'être aussi spécifique que l'anticorps primaire, mais on le choisit généralement en fonction de sa capacité à reconnaître une classe spécifique d'immunoglobulines (souvent IgG) de l'espace animale d'où provient l'anticorps primaire.

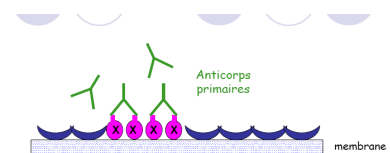
**Dépôt de l'Ac secondaire:**

- Diluer les Ac au 1/2500, soit 4 µL d'Ac dans 10mL de solution de blocage spécifique à chaque Ac (pour une membrane de 40 cm<sup>2</sup>)
- Déposer les Ac sur la membrane
- Laisser incuber 2 heures à température ambiante ou la nuit à 4°C

**Lavage de la membrane :**

- Dans la solution de lavage (TTBS 0,1% ou TPBS 0,1%) :
  - 3 lavages rapides de 1 minute dans 100 mL (pour chaque lavage)
  - 3 lavages de 5 minutes dans 100 mL

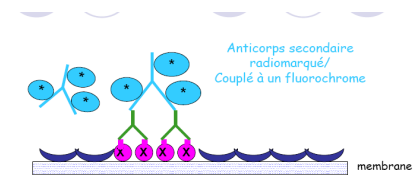
**Incubation du 1<sup>er</sup> Ac**



Lavages (excès d'Anticorps)



**Incubation de l'Ac secondaire**



Lavages (excès d'Anticorps)

**Références produits :**

Ac secondaire

- Donkey anti-goat IgG : Sc 2020 (Tebu-Bio)
- Goat anti-mousse IgG:P0447 (Dako)
- Goat anti-rabbit IgG: P0448 (Dako)

**Fiche technique n°23 (1) :**  
**Révélation par chimiluminescence**

**Principe de la chimiluminescence :**

L'anticorps secondaire anti-IgG est lié ou conjugué de manière covalente à l'enzyme HorseRadish Peroxidase (HRP) et c'est en fait l'activité enzymatique de la HRP qui sera détectée grâce à une méthode de chimiluminescence améliorée pour trouver la position des complexes antigène-anticorps.

**Préparation du mélange ECL « maison » :**

- Préparations extemporanées à température ambiante
- **Solution A :**
  - Tris 100 mM, pH 8,5 → 5 mL
  - Acide coumarique → 25 µL
  - Luminol → 50 µL
- **Solution B :**
  - Tris 100 mM, pH 8,5 → 5 mL
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) → 3 µL
- Mélanger A et B juste avant la révélation

Préparation des solutions stock :

- **Acide coumarique (90 mM):**
  - Acide coumarique → 148 mg
  - DMSO → 10 mL
  - Aliquoter puis conserver à -20°C
- **Luminol (250 mM) :**
  - Luminol → 443 mg
  - DMSO → 10 mL
  - Aliquoter puis conserver à -20°C
- **Tris 100 mM, pH 8,5 :**
  - Tris base → 1,2 g
  - QSP H<sub>2</sub>O 100 mL
  - A conserver à 4°C

Références produits :

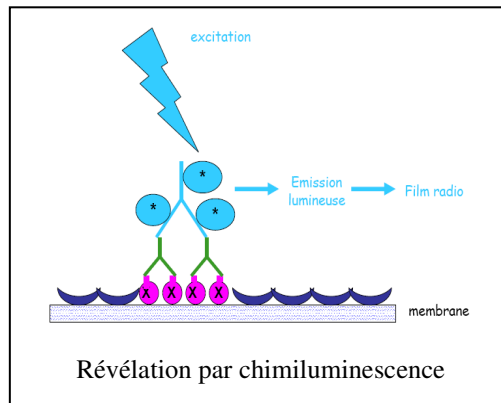
Acide coumarique : Sigma Fluka C9008  
 Luminol : Sigma Fluka O9253  
 DMSO : Sigma Fluka D5859  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) : Sigma H1009



**Fiche technique n°23 (2) :**  
**Révélation par chimiluminescence**

**Principe de la chimiluminescence (suite):**

La luminescence est l'émission de lumière résultant de l'énergie émise par une substance qui passe de l'état excité à un état fondamental. En chimiluminescence, cette excitation est provoquée par une réaction chimique. Le kit de révélation utilisé, ECL+ (Enhanced Chemiluminescence - Chimiluminescence amplifiée) permet la formation enzymatique d'un ester d'acridinium, lequel est dégradé en un composé excité qui libère son énergie sous forme lumineuse à une longueur d'onde maximale de 430 nm afin de pouvoir retourner à son état fondamental.



**Références matériels :**

Caméra Fuji LAS 3000IR CCD

Logiciel ImageGauge

**Procédure de la révélation :**

La membrane est alors incubée dans la préparation ECL pendant 30 secondes puis les anticorps liés sont détectés par chemiluminescence.

La chemiluminescence est enregistrée à l'aide d'une caméra Fuji LAS 3000IR CCD, et les signaux spécifiques sont quantifiés à l'aide du logiciel ImageGauge. Les films autoradiographiques sont développés après l'exposition optimale aux rayons X.

**Fiche technique n°24:**

**Immunomarquage**

**Préparation des coupes :**

A partir d'une coupe transversale de VG congelée sur isopentane et stockée à -80°C

- Réaliser des coupes à 7 µm au cryostat
- Laisser sécher pendant 30 mn
- Fixer à l'aide d'Acétone/Méthanol (1v/1v)
- Congeler si nécessaire

**Le jour du marquage**

- Laver la coupe à l'aide de TPBS 10min
- Perméabiliser la coupe à l'aide de PBS/SAPONINE 0,5% 30 min à température ambiante
- Rincer avec du TPBS
- Bloquer avec du sérum de Goat (5%) 20 min à température ambiante

**Marquage**

- Diluer les Ac primaires au 1/25 (RyR2, NOs1) ou au 1/20 (FKBP 12) dans du TPBS
- Déposer les Ac sur la coupe
- Laisser incuber la nuit à 4°C
- Rincer avec TPBS
- Diluer les Ac secondaires au 1/20 (pour RyR2) ou 1/200 (pour NOs1, FKBP 12)
- Déposer les Ac sur la coupe
- Laisser incuber 1h à température ambiante
- Rincer avec TPBS
- Visualiser au microscope



Cryostat

*Le cryostat est un dispositif cryogénique qui permet de réaliser des coupes à congélation d'une épaisseur de 4 à 50 µm.*

**Références produits :**

Ac 1aire Mousse (Affinity Bioreagents)

- Anti-RyR : MA3-916

Ac 1aire Rabbit (Tebu-Bio)

- Anti NOs1 (K-20) : Sc1025
- Anti FKBP12 (FL-108): Sc-28814

Ac secondaire

- Goat anti-Rabbit-TRITC: T6778 (Sigma)
- Rabbit anti-Mouse -FITC: F0261 (Dako)

**Fiche technique n°25:**

**Comarquage**

**Préparation des coupes :**

Idem que pour le marquage simple jusqu'à l'étape de fixation

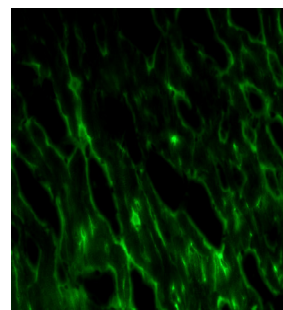
**Comarquage RyR2/FKBP 12**

- Bloquer la coupe avec du sérum de Donkey (5%) 20 min à température ambiante
- Incuber avec l'Ac primaire RyR2 dilué au 1/25 – la nuit à 4°C puis rincer avec TPBS
- Incuber avec l'Ac secondaire rabbit anti-mouse FITC dilué au 1/20 pendant 30 mn à température ambiante puis rincer avec TPBS
- Bloquer avec du sérum de Goat (5%) 20 mn à température ambiante
- Incuber avec l'Ac primaire FKBP 12 dilué au 1/50 – 1h30 à 37 °C, puis rincer avec TPBS
- Incuber avec l'Ac secondaire goat anti-mabbit TRITC dilué au 1/200 pendant 1h à température ambiante, puis rincer avec TPBS

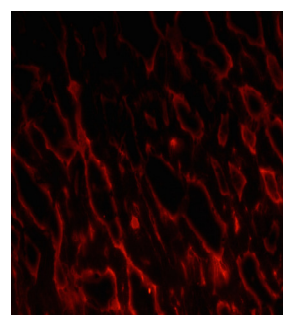
**Comarquage RyR2/NOS1**

Idem jusqu'au 2<sup>nd</sup> blocage (sérum de Goat)

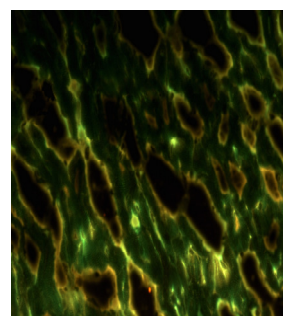
- Incuber avec l'Ac primaire NOS1 dilué au 1/20 – 1h30 à 37 °C, puis rincer avec TPBS
- Incuber avec l'Ac secondaire goat anti-mabbit TRITC dilué au 1/200 pendant 1h à température ambiante, puis rincer avec TPBS



RyR2



NOS1



NOS1 + RyR2

**Références matériels :**

Cryostat : Leica CM3050 S

Microscope classique de type epi-fluorescence : Nikon Eclipse 80i

Camera : Qimaging

Logiciel : « One Shot »



## ***PRESENTATION DES RESULTATS***



**Etude 1 : Un entraînement intense en endurance aggrave la bradycardie ainsi que la désensibilisation  $\beta$ -adrénergique malgré une amélioration de l'expression des protéines régulatrices du calcium chez le rat diabétique.**

Les résultats de cette étude sont soumis sous forme d'article au J Physiol Pharmacol (en révisions majeures).

S. Le Douairon Lahaye, A. Gratas-Delamarche, L. Malardé, S. Vincent, MS. Zguira, S. Lemoine Morel, P. Delamarche, F. Carré, F. Rannou Bekono. *In diabetic rats, high endurance training aggravates bradycardia and cardiac  $\beta$ -adrenergic desensitization despite enhancement in the calcium cycling protein expression.*

## **Introduction**

L'activité physique régulière est aujourd'hui bien reconnue comme bénéfique dans le management du diabète. Il a été démontré que certains événements cardiovasculaires hostiles survenant au cours du diabète pouvaient être prévenus par l'activité physique (Nadeau et coll. 1988, De Angelis et coll. 2000). Chez l'animal, des adaptations fonctionnelles ont été décrites grâce à des études *in vivo* (DeBlieux et coll. 1993, De Angelis et coll. 2000, Loganathan et coll. 2007, Shao et coll. 2009) ou sur cœur isolé perfusé (Broderick et coll. 2005). Ces études ont montré que l'entraînement pouvait atténuer la bradycardie et l'hypotension induites par le diabète, et améliorer le débit cardiaque, la contractilité et la relaxation. Néanmoins, certains résultats paraissent paradoxaux ou restent encore inexplicables. Pour illustrer ces propos, les effets de l'entraînement sur la bradycardie diabétique sont aujourd'hui inconsistants (Heller et coll. 1988, Bidasee et coll. 2008). Lorsque des effets sont observés, l'atténuation de la bradycardie diabétique paraît paradoxalement associée à une augmentation du tonus vagal de l'ordre de 40% (De Angelis et coll. 2000). A contrario, 3 semaines d'entraînement en endurance ne renversent pas la bradycardie diabétique *in vivo* alors qu'il limite la perte d'expression des récepteurs  $\beta$ 1-adrénrgiques (AR) et améliorent les réponses myocardiques à la stimulation  $\beta$ -AR (Bidasee et coll. 2008). Les auteurs suggèrent alors que la durée de l'entraînement en endurance, 3 semaines, est probablement insuffisante pour renverser la bradycardie. Ainsi, toutes ces divergences de résultats quant aux effets de l'entraînement sur la bradycardie diabétique pourraient en partie s'expliquer par des facteurs méthodologiques tels que le nombre limité d'animaux étudiés, le modèle animal utilisé (race, durée et modèle du diabète...) ou encore le protocole d'entraînement (durée, intensité...). Nous faisons alors l'hypothèse que la charge d'entraînement en endurance imposée au cours du diabète pourrait moduler les adaptations cardiaques au niveau moléculaire (fonction calcique et autres) et ce faisant, moduler les adaptations fonctionnelles *in vivo*. Enfin, il se doit d'être souligné qu'aucune des études antérieures n'a étudié simultanément, sur un même modèle, l'activité cardiaque et 2 des facteurs majeurs responsables de son contrôle : l'homéostasie calcique et la fonction adrénrgique myocardique.

Le but de cette étude 1 est donc de (1) mesurer la fréquence cardiaque *in vivo* et (2) d'évaluer les réponses contractiles à la stimulation  $\beta$ -adrénrgique dans des cœurs isolés perfusés de rats diabétiques soumis à 8 semaines d'un entraînement en endurance



d'intensité élevée, et (3) d'examiner l'impact de ce programme d'entraînement spécifique sur l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et (4) enfin, sur l'expression de 5 des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  (RyR2, FKBP12, SERCA2, PLB et NCX1).

### **Matériel et méthode**

L'étude 1 porte sur 125 rats mâles âgés de 8 semaines. Ils sont répartis de façon aléatoire au sein de 4 groupes : sédentaire contrôle (SC), sédentaire diabétique (SD), entraîné contrôle (EC) et entraîné diabétique (ED). Le programme d'entraînement consiste en une course progressive sur tapis roulant durant 8 semaines (5 jours par semaine, 1 heure par jour, à une vitesse finale de 25 m/min, pente de  $10^\circ$ ) (Mokhtar et coll. 1993). La fréquence cardiaque de repos *in vivo* est mesurée 2 fois, au début (T1) et à la fin du protocole (T2), chez des rats conscients (méthode du *tail cuff*). A l'issue du protocole d'entraînement, l'étude fonctionnelle sur cœurs isolés-perfusés a permis de déterminer la fréquence cardiaque intrinsèque du VG, la pression développée par le VG (PVG), l'index de contraction (+dP/dt), l'index de relaxation (-dP/dt) du VG, au repos et après perfusions successives d'Isoprotérenol ( $10^{-8}$  à  $10^{-5}$  M). Les autres rats sont sacrifiés et les ventricules gauches délicatement séparés, afin d'estimer la densité des 3 sous-unités des récepteurs  $\beta$ -AR ainsi que celles des protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  - RyR2, FKBP12, SERCA2, PLB et NCX1 – (Western blot). L'activité de la citrate synthase est mesurée dans les muscles gastrocnémiens afin d'attester de l'efficacité de l'entraînement.

Dans chacun des groupes, un minimum de 7 rats a été utilisé pour l'étude des cœurs isolés perfusés et un minimum de 7 autres rats pour l'analyse Western blot.

### **Analyse statistique**

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  la Déviation Standard. Après vérification de la distribution normale, les caractéristiques des animaux, l'activité de la citrate synthase, les densités des différents récepteurs sont comparées entre les groupes SC, SD, EC et ED par une anova à une voie. Une anova à deux voies mesures répétées est ensuite utilisée pour comparer les FC *in vivo* des animaux, entre les deux temps (avant (T1) et après (T2) le protocole d'entraînement) chez les rats sédentaires et entraînés, diabétiques ou non. Une anova à deux voies mesures répétées est également utilisée pour comparer les paramètres fonctionnels myocardiques, au repos, et à chaque concentration successive d'Isoprotérenol. Les anovas (une et deux voies) sont suivies par un test post-hoc (Fisher

LSD). Pour chaque test, le niveau de significativité est fixé pour  $p < 0,05$  (Statistica 7,1 ; StatSoft, France).

## **Résultats**

### **Caractéristiques générales**

Comme escompté, les niveaux de glucose sanguin sont plus élevés chez les rats diabétiques que chez les rats sédentaires contrôles ( $p < 0,001$ ). Comme il est observé dans le **Tableau 1.1**, l'entraînement réduit les niveaux de glucose sanguin puisque les rats diabétiques entraînés présentent des niveaux plus faibles que ceux des rats diabétiques sédentaires ( $p < 0,001$ ). A la fin de l'expérimentation, le poids du corps des rats diabétiques, qu'ils soient entraînés ou non, est significativement inférieur à celui des rats sédentaires contrôles ( $p < 0,001$ ). Le poids du corps des rats sédentaires contrôles est significativement supérieur à celui des rats entraînés contrôles ( $p < 0,05$ ) alors que celui des sédentaires diabétiques est significativement inférieur à celui de leurs homologues entraînés ( $p < 0,05$ ). De même, le diabète induit une réduction marquée du poids du ventricule gauche des rats diabétiques sédentaires, comparés aux rats contrôles sédentaires ( $p < 0,001$ ). L'entraînement ne modifie pas le poids absolu du ventricule gauche chez les rats diabétiques. Par rapport au ratio poids du ventricule gauche/poids du corps, aucune hypertrophie cardiaque ne peut être mise en évidence suite au programme d'entraînement.

Tableau 1.1. Effets du diabète et de l'entraînement sur les caractéristiques générales.

	Sédentaire contrôle (n=34)	Entraîné contrôle (n=20)	Sédentaire diabétique (n=35)	Entraîné diabétique (n=28)
PC (g)	504,1 ± 6,3	478,3 ± 10,3 *	293,1 ± 11,4 *†	330,2 ± 11,4 *†‡
PCoeur (mg)	1263,5 ± 31,3	1244,3 ± 40,7	861,8 ± 46,8*†	946,7 ± 34,5*
PVG (mg)	1106,0 ± 42,1	1104,8 ± 48,7	741,7 ± 41,1*†	878,6 ± 53,5*†‡
PCoeur/PC (mg/g)	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1*	2,9 ± 0,1*‡
PVG/PC (mg/g)	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,3	2,6 ± 0,1*†	2,6 ± 0,1*†
Glucose sanguin (mg/dl)	128,7 ± 3,7	124,3 ± 3,7	556,2 ± 13,6*†	497,4 ± 23,8*†‡

PC: Poids du corps; PCoeur: Poids du coeur; PVG: Poids du ventricule. \*= significativement différent des sédentaires contrôles ( $p < 0,05$ ), †= significativement différent des entraînés contrôles, ‡= significativement différent des sédentaires diabétiques ( $p < 0,05$ ).

### Activité de la citrate synthase

L'activité de citrate synthase mesurée à partir du muscle gastrocnémien est significativement augmentée de 24% ( $p < 0,05$ ) chez les rats entraînés contrôles et de 56% ( $p < 0,005$ ) chez les rats entraînés diabétiques comparés à leurs homologues sédentaires respectifs.

### Fréquence cardiaque *in vivo*

Comme il peut être observé dans le **Tableau 1.2**, les rats sédentaires diabétiques sont bradycardes comparés aux rats sédentaires contrôles, au début comme à la fin de l'expérimentation. L'entraînement diminue la FC *in vivo* de  $8,1 \pm 1,9\%$  chez les rats entraînés diabétiques et de  $4,4 \pm 3,4\%$  chez les rats entraînés contrôles ( $p < 0,01$ ), alors qu'aucun changement n'est observé dans les groupes sédentaires. La diminution de FC *in vivo* est similaire dans les 2 groupes entraînés. A la fin de l'expérimentation, la FC *in vivo* des rats diabétiques entraînés est plus faible que celle de leurs homologues sédentaires ( $p < 0,05$ ).

**Tableau 1.2. Fréquence cardiaque *in vivo* mesurée par la méthode du Tail cuff.**

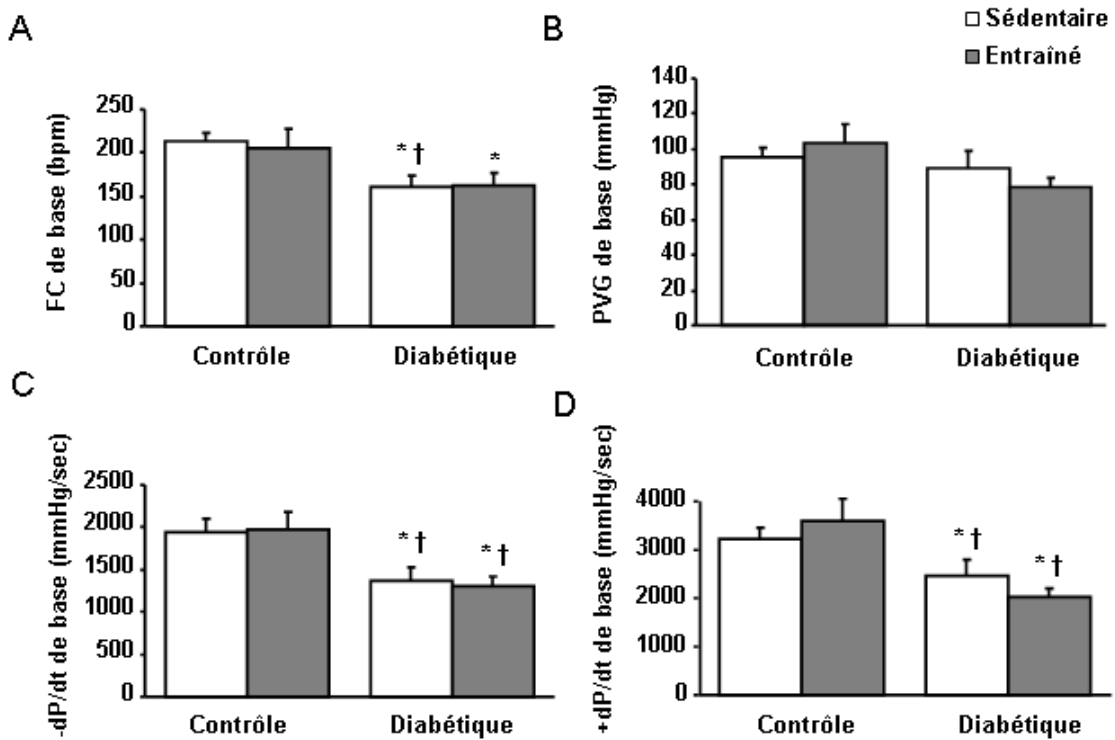
	Sédentaire		Entraîné		Sédentaire		Entraîné	
	contrôle		contrôle		diabétique		diabétique	
	(n=34)		(n=20)		(n=35)		(n=28)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
FC	412 ±	387 ± 9	423 ±	389 ± 6	340 ± 9	338 ± 8	331 ± 8	310 ± 8
	21		12	▣	*†	*†	*†	*†‡ ▣

▣= différence significative entre T1 and T2 ( $p<0,05$ ), \*= significativement différent des sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ), † = significativement différent des entraînés contrôles ( $p<0,05$ ), ‡ = significativement différent des sédentaires diabétiques ( $p<0,05$ ).

### Etude fonctionnelle du myocarde

Fonction basale – Les rats sédentaires diabétiques sont bradycardes puisque leur FC intrinsèque est inférieure de 45 bpm par rapport à celle des rats sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ) (**Figure 1.1**). La pression développée par le ventricule gauche des rats sédentaires diabétiques n'est pas significativement différente de celle développée par le ventricule gauche des rats sédentaires contrôles. Les rats sédentaires diabétiques présentent cependant une diminution significative de  $+dP/dt$  et de  $-dP/dt$  par rapport aux rats sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ). Comme il peut aussi être observé sur la **Figure 1.1**, l'entraînement n'a aucun effet sur les paramètres fonctionnels de base que ce soit chez les rats contrôles ou chez les rats diabétiques. FC, PVG et  $\pm dP/dt$  déterminés chez les rats entraînés diabétiques ne sont pas significativement différents de ceux déterminés chez leurs homologues sédentaires.

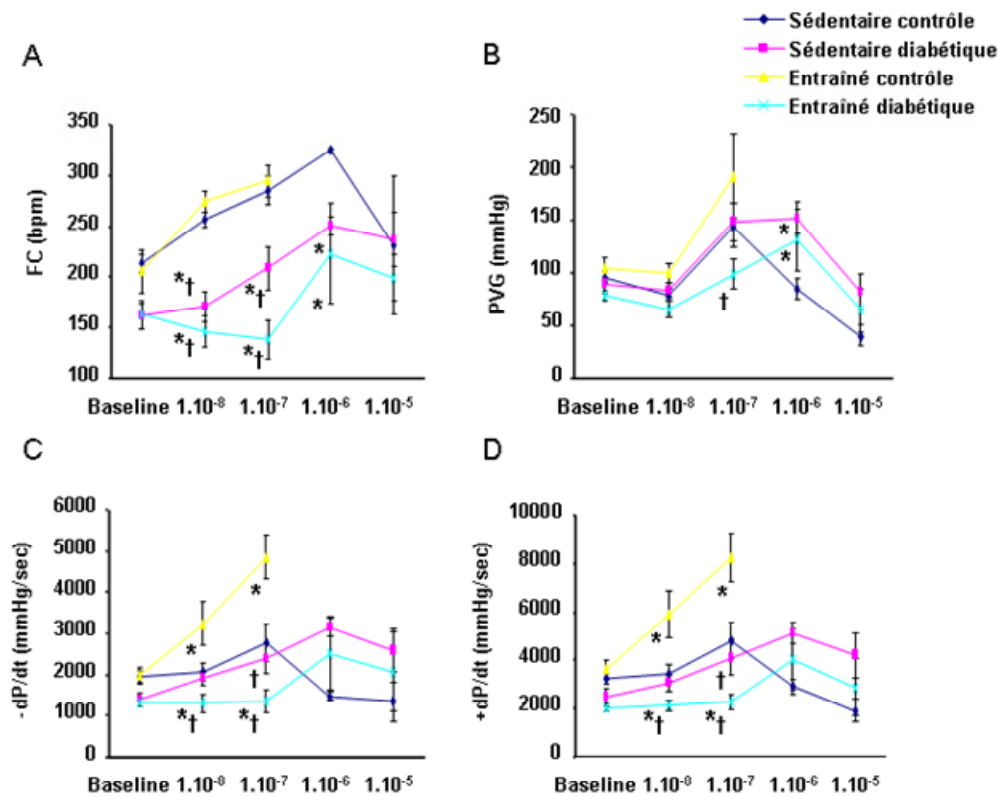
**Figure 1.1. Mesure des performances de base des coeurs isolés perfusés des rats sédentaires contrôles ( $n=21$ ), entraînés contrôles ( $n=10$ ), sédentaires diabétiques ( $n=21$ ) et entraînés diabétiques ( $n=16$ ). \*= significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ), †= significativement différent des rats entraînés contrôles ( $p<0,05$ ).**



Réponse myocardique à la stimulation par l'isoprotérenol – Comme il peut être constaté sur la **Figure 1.2**, l'isoproterenol augmente significativement la FC, PVG et  $\pm dP/dt$  dans tous les groupes, qu'il soit contrôle ou diabétique, sédentaire ou entraîné. Pour être plus précis, les réponses significatives à l'isoprotérenol sont obtenues pour des perfusions de  $10^{-7}$  M chez les rats sédentaires, contrôles ou diabétiques. L'entraînement chez les rats contrôles augmente la réponse à la stimulation  $\beta$ -AR puisque les réponses significatives à l'isoprotérenol sont obtenues pour des perfusions de  $10^{-8}$  M (contre  $10^{-7}$  M chez les rats sédentaires contrôles). De façon surprenante, chez ces rats entraînés contrôles, les perfusions de  $10^{-7}$  M d'isoprotérenol ont un effet irréversible sur la fonction myocardique, empêchant alors la perfusion des coeurs isolés avec des doses d'isoprotérenol plus concentrées. Chez les rats diabétiques, l'entraînement diminue la sensibilité  $\beta$ -AR puisque les réponses significatives des coeurs isolés à la stimulation par l'isoprotérenol sont

décalées vers la droite par rapport à leurs homologues sédentaires. En effet, les réponses significatives à l'isoprotérenol ne sont obtenues qu'à la suite des perfusions de  $10^{-6}$  M. De plus, les réponses pics à l'isoprotérenol sont également décalées de 10 fois vers la droite dans les groupes diabétiques, sédentaires ou entraînés par rapport aux groupes contrôles. Les réponses pics sont obtenues pour des perfusions de  $10^{-6}$  M chez les rats diabétiques (SD, ED) alors qu'elles sont obtenues pour des perfusions de  $10^{-7}$  M chez les rats contrôles (SC, EC).

**Figure 1.2. Réponses contractiles à la stimulation par l'isoprotérenol des cœurs isolés perfusés des rats sédentaires contrôles ( $n=13$ ), entraînés contrôles ( $n=7$ ), sédentaires diabétiques ( $n=11$ ) et entraînés diabétiques ( $n=7$ ) rats. \*= significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ), †= significativement différent des rats entraînés contrôles ( $p<0,05$ ).**

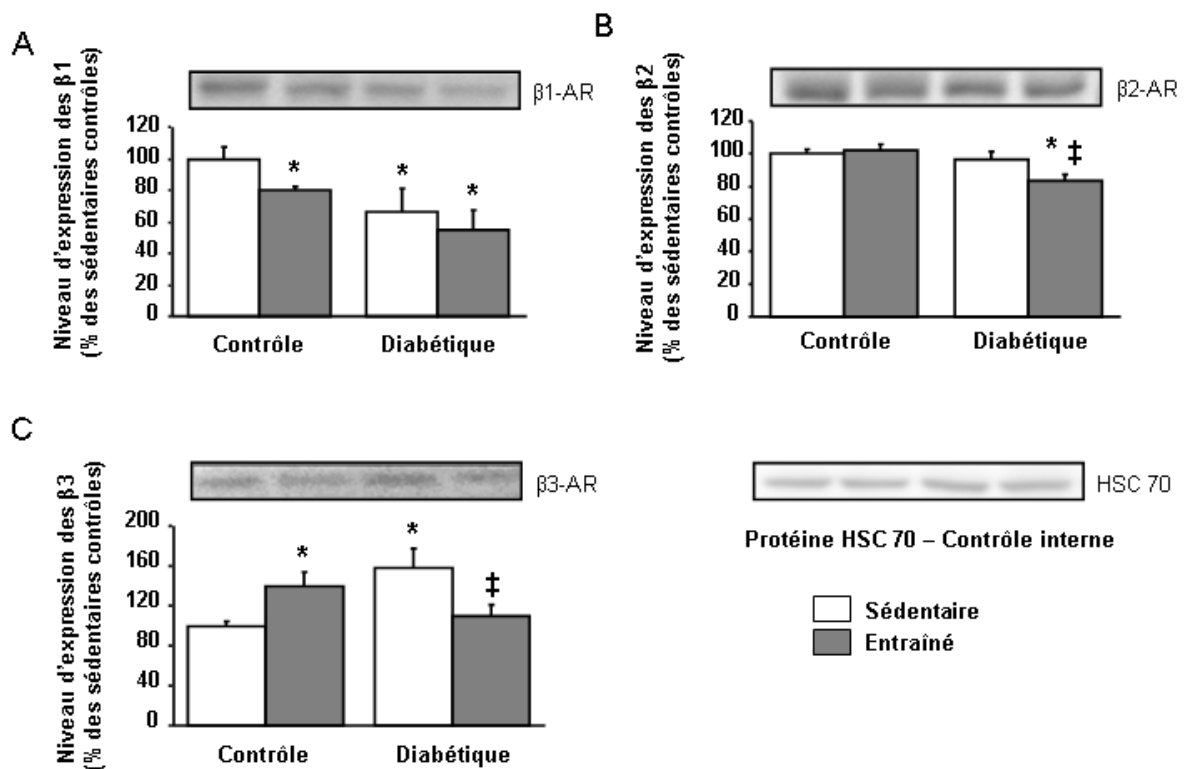


### Expression protéique des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

L'analyse par Western blot révèle que les cœurs des rats sédentaires diabétiques contiennent  $34,2 \pm 7,2\%$  de moins de récepteurs  $\beta_1$ -AR que les cœurs des rats sédentaires

contrôles ( $p < 0,05$ ). Le diabète n'altère pas significativement l'expression de la sous-unité  $\beta 2$ -AR. Par contre, les coeurs de rats sédentaires diabétiques contiennent  $57,4 \pm 17,8\%$  de plus de récepteurs  $\beta 3$ -AR que ceux des rats sédentaires contrôles ( $p < 0,005$ ). Dans les coeurs des rats contrôles, l'entraînement diminue l'expression des  $\beta 1$ -AR ( $p < 0,01$ ), n'a pas d'effet sur les  $\beta 2$ -AR et augmente les  $\beta 3$ -AR ( $p < 0,05$ ). Dans les coeurs des rats diabétiques, l'entraînement accentue la diminution d'expression des  $\beta 1$ -AR initiée par le diabète, et induit une diminution significative au niveau de l'expression des  $\beta 2$ -AR. A l'inverse, l'entraînement atténue l'augmentation induite par le diabète au niveau de l'expression des  $\beta 3$ -AR (**Figure 1.3**).

**Figure 1.3.** Niveaux d'expression protéiques des récepteurs  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ - and  $\beta 3$ -AR évalués par Western blot dans les coeurs de rats sédentaires contrôles ( $n=8$ ), entraînés contrôles ( $n=8$ ), sédentaires diabétiques ( $n=7$ ) et entraînés diabétiques ( $n=9$ ). \*= significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p < 0,05$ ), ‡= significativement différent des rats sédentaires diabétiques ( $p < 0,05$ ).



### Expression des protéines myocardiques régulatrices du calcium

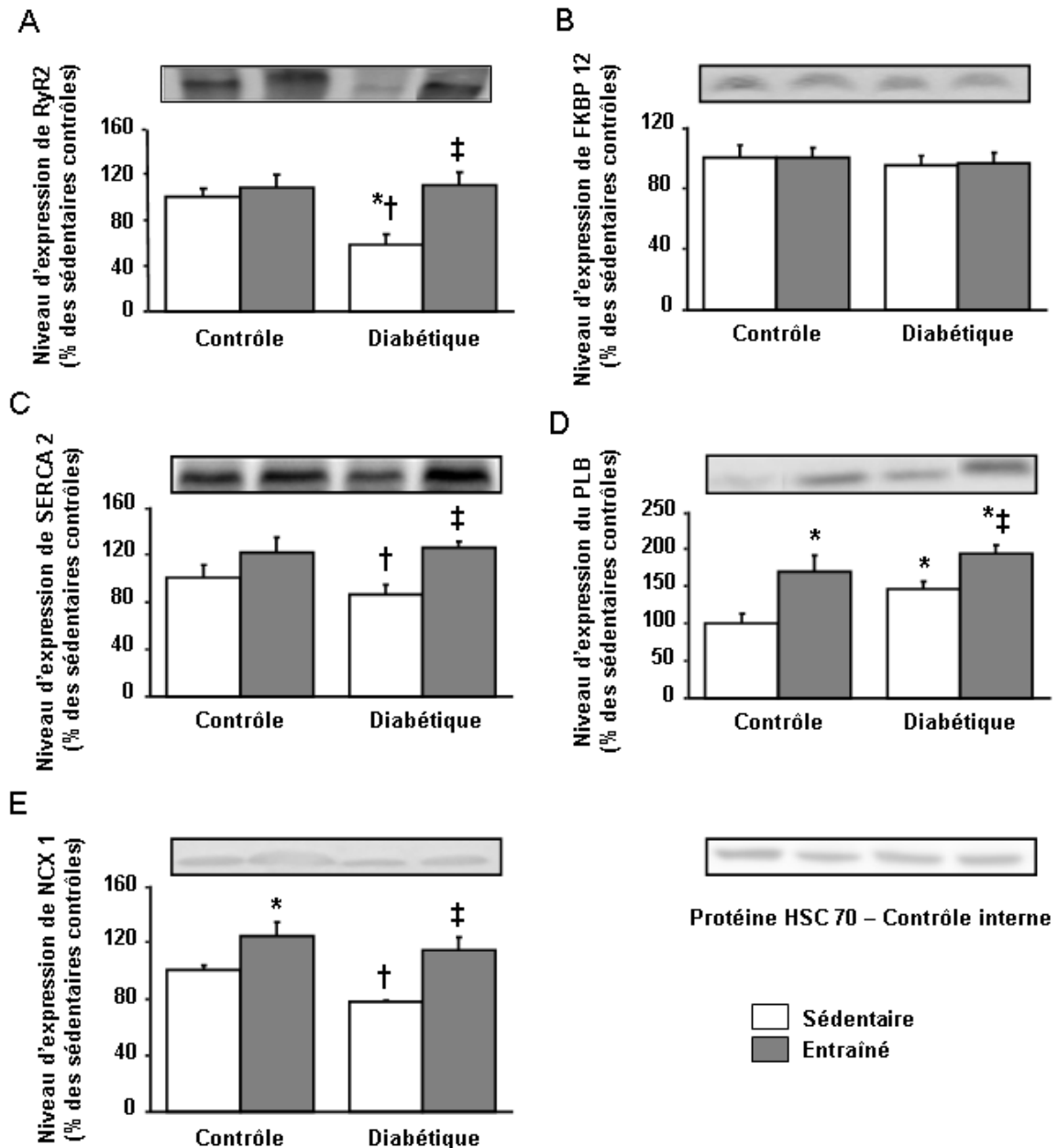
Le diabète comme l'entraînement altère indépendamment l'expression des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figures 1.4 et 1.5**). Comparés aux rats sédentaires contrôles, les sédentaires diabétiques présentent une diminution significative du ratio des 2 protéines impliquées dans la capacité de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique – RyR2/FKBP12 – ( $p < 0,001$ ) (**Figure 1.5**). Cette diminution résulte uniquement d'une réduction de l'expression protéique de RyR2 (**Figure 1.4**). Le diabète induit également une diminution significative du ratio des 2 protéines impliquées dans la capacité de captage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum – SERCA2/PLB – ( $p < 0,001$ ) (**Figure 1.5**). Cette diminution est due à une tendance vers une réduction de l'expression de SERCA2 associée à une augmentation significative de l'expression du PLB. De plus, le diabète tend à réduire le niveau d'expression du NCX1, protéine impliquée dans l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule (**Figure 1.4**).

Dans les coeurs de rats contrôles, alors que l'entraînement n'a pas d'effet sur l'expression de RyR2, de FKBP12 et sur le ratio correspondant, il réduit le ratio SERCA2/PLB ( $p < 0,05$ ) en augmentant l'expression du PLB ( $p < 0,05$ ). Chez ces mêmes rats contrôles, l'entraînement augmente également l'expression du NCX1 ( $p < 0,01$ ).

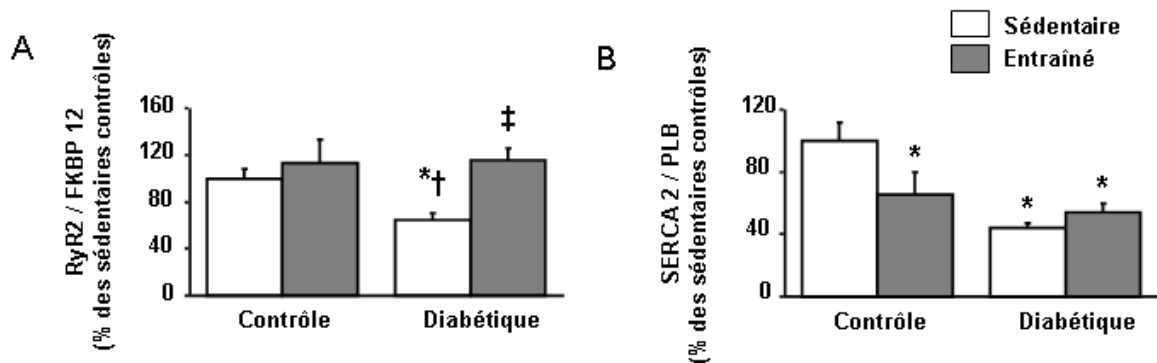
Dans les coeurs de rats diabétiques, l'entraînement restaure l'expression de 3 des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ , RyR2, SERCA2 et NCX1, jusqu'à des valeurs proches des valeurs contrôles. Le ratio RyR2/FKBP12 est également normalisé. Cependant, l'entraînement n'a pas d'effet sur le ratio SERCA2/PLB.



**Figure 1.4.** Niveau d'expression des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ , évalués par Western blot dans les coeurs de rats sédentaires contrôles ( $n=9$ ), entraînés contrôles ( $n=8$ ), sédentaires diabétiques ( $n=10$ ) et entraînés diabétiques ( $n=9$ ). \*= significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ), †= significativement différent des rats entraînés contrôles ( $p<0,05$ ), ‡= significativement différent des rats sédentaires diabétiques ( $p<0,05$ ).



**Figure 1.5. Ratios de RyR2/FKBP 12 et SERCA2/PLB des coeurs de rats sédentaires contrôles ( $n=9$ ), entraînés contrôles ( $n=8$ ), sédentaires diabétiques ( $n=10$ ) et entraînés diabétiques ( $n=9$ ). \*= significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ), †= significativement différent des rats entraînés contrôles ( $p<0,05$ ), ‡= significativement différent des rats sédentaires diabétiques ( $p<0,05$ ).**



## Discussion

Cette étude montre pour la 1<sup>ère</sup> fois qu'un entraînement en endurance d'intensité élevée pour des rats diabétiques (1) aggrave la bradycardie *in vivo* sans pour autant affecter la fréquence cardiaque mesurée sur coeurs isolés perfusés, (2) accentue la diminution des réponses myocardiques à la stimulation  $\beta$ -AR induite par le diabète, cette réduction étant associée à une down-régulation des récepteurs  $\beta$ 1-et  $\beta$ 2-AR et (3) restaure totalement l'expression de 3 des principales protéines régulatrices du  $Ca^{2+}$ , RyR2, SERCA2 et NCX1.

**Effets du diabète** – comme retrouvé dans la littérature (Feins et coll. 1980, Penpargkul et coll. 1980, Pierce et Dhalla 1985), le diabète induit par injection de streptozotocine induit une diminution de la fonction cardiaque hémodynamique. Nous avons trouvé chez les animaux diabétiques une bradycardie à la fois mesurée *in vivo* et dans les coeurs isolés perfusés. Ces mêmes animaux diabétiques se caractérisent également par une dépression des réponses myocardiques à la stimulation  $\beta$ -AR, comme le démontre le décalage vers la droite de la courbe dose-réponse des paramètres  $\pm dP/dt$ . De manière cohérente avec des études antérieures, nous avons noté que le diabète induit une down-régulation des récepteurs  $\beta$ 1-AR et une up-régulation des  $\beta$ 3-AR (Dinçer et coll. 2001, Bidasee et coll. 2008). Le diabète n'a cependant pas d'effet sur les  $\beta$ 2-AR. La réponse contractile altérée à

la stimulation  $\beta$ -adrénergique est associée avec d'importantes altérations dans l'expression des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ . Comme précédemment démontré (Takeda et coll. 1996, Zhong et coll. 2001, Choi et coll. 2001, Bidasee et coll. 2003c, Yaras et coll. 2005, Ligeti et coll. 2006, Zhao et coll. 2006.), l'expression de la protéine RyR2 est significativement réduite dans les cœurs diabétiques, de même que le ratio RyR2/FKBP12, reflétant une diminution de la capacité de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS (Ai et coll. 2005). Dans notre étude, comme dans les études antérieures (Kim et coll. 2001, Netticadan et coll. 2001, Zhong et coll. 2001, Choi et coll. 2002), nous observons une légère diminution du niveau d'expression de la protéine SERCA2 et une diminution significative du ratio SERCA2/PLB, reflétant, là aussi, une diminution de la capacité de captage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. Enfin, comme dans d'autres études, une légère diminution du niveau d'expression de la protéine NCX1 est également retrouvé dans les cœurs de nos rats diabétiques, suggérant une diminution de la capacité d'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule (Takeda et coll. 1996, Choi et coll. 2002).

**Effets de l'entraînement** – Chez les rats contrôles, l'augmentation d'activité de la citrate synthase, un index de la capacité oxydative du muscle squelettique, nous permet de juger de l'efficacité de notre programme d'entraînement (Takeda et coll. 1985). D'après Tarricone et coll. (2008), un tel programme d'entraînement peut être considéré comme modéré pour des rats sains. D'ailleurs, il n'a pas eu d'effet significatif sur la FC de base ou sur les performances myocardiques évaluées sur cœurs isolés perfusés. Cependant, notre programme d'entraînement a été suffisant pour induire une bradycardie *in vivo* qui peut principalement s'expliquer par une augmentation du tonus vagal (De Angelis et coll. 2004), même si nous ne l'avons pas investigué dans cette étude. Notre entraînement spécifique a également résulté en une augmentation des réponses myocardiques à la stimulation  $\beta$ -AR chez les rats contrôles. Comme précédemment démontré (Barbier et coll. 2004), ces adaptations sont associées à une diminution de l'expression des récepteurs  $\beta$ 1-AR et une augmentation des  $\beta$ 3-AR.

Après analyse de la littérature, chez les rats sains, les effets de l'entraînement en endurance sur l'expression des protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  paraissent assez variables, celle-ci étant quelque fois diminuée, augmentée ou inchangée (Moore et coll. 1999). Dans notre étude, l'entraînement en endurance n'affecte pas de manière significative l'expression des protéines RyR2, SERCA2 et FKBP12, mais augmente celle de NCX1 et PLB. Il est bien

admis que les adaptations induites par l'entraînement dépendent fortement des modalités du protocole d'entraînement (intensité, durée...), ce qui pourrait expliquer les disparités relatives aux effets de l'entraînement sur les protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  chez le rat sain. D'ailleurs, il est fort probable que ce même programme d'entraînement ait été plus intense pour les rats diabétiques que pour les rats contrôles. En effet, il est aujourd'hui bien admis que le diabète déprime sévèrement l'aptitude physique (Gratas-Delamarche et coll. 2006). Cette notion d'intensité relative est certainement la raison pour laquelle les rats diabétiques ont une plus importante augmentation d'activité de la citrate synthase dans le muscle gastrocnémien que les rats contrôles.

A notre connaissance, cette étude démontre pour la 1<sup>ère</sup> fois qu'un entraînement en endurance d'intensité élevée pour des rats diabétiques aggrave la bradycardie *in vivo* induite par le diabète, sans affecter pour autant la fréquence cardiaque intrinsèque et les performances myocardiques. Dans les études antérieures où la bradycardie *in vivo* a été reversé (Harthmann et coll. 2007, Shao et coll. 2009), la charge d'entraînement était nettement plus faible. Par exemple, dans l'étude récente de Shao et coll. (2009), les rats ont couru durant seulement 4 semaines sur un tapis roulant incliné de 5-10% (ce qui correspond à 6°) à une vitesse progressivement augmentée jusqu'à 25 m/min. Dans notre étude, les rats ont couru durant 8 semaines sur un tapis incliné de 10° et à une vitesse également progressivement augmentée jusqu'à 25 m/min.

Ainsi, il se doit d'être souligné qu'en fonction de la charge, l'entraînement affecte différemment les réponses myocardiques à la stimulation  $\beta$ -AR. Ceci a pu être observé dans un modèle de lapins obèses entraînés à différente intensité (Carroll et coll. 2005). Alors qu'un entraînement en endurance modéré ne parvient pas à atténuer la diminution des réponses myocardiques à la stimulation par l'isoprotérenol induite par l'obésité, un entraînement intense induit au contraire une diminution de ces réponses (Carroll et coll. 2005). Un résultat similaire est observé dans notre modèle puisque notre entraînement en endurance intense pour les rats diabétiques induit un décalage vers la droite de la courbe dose-réponse des paramètres  $\pm\text{dP}/\text{dt}$  chez ces animaux. Cet effet spécifique est associé à une accentuation de la perte d'expression des récepteurs  $\beta$ 1-AR et à l'apparition d'une réduction de l'expression des  $\beta$ 2-AR. Ces adaptations pourraient résulter d'une augmentation des niveaux de catécholamines plasmatiques avec l'entraînement, comme suggéré par Zouhal et coll. (2008). Chez les chiens présentant une sensibilité accrue aux

fibrillations ventriculaires, Billman et coll. (2006) ont également trouvé que l'entraînement en endurance atténue les réponses  $\beta$ 2-AR à la stimulation  $\beta$ -AR. Ces auteurs suggèrent que cette réponse  $\beta$ 2-AR atténuée pourrait constituer une adaptation spécifique visant à prévenir la survenue de fibrillations ventriculaires chez des animaux susceptibles de mort subite. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que l'accentuation des réponses  $\beta$ -AR myocardiques atténuées, combinée à une down-régulation de l'expression des récepteurs  $\beta$ 2-AR suite à un entraînement en endurance intense pourrait protéger les animaux diabétiques contre la survenue de fibrillations ventriculaires et ce faisant, de mort subite.

Concernant les effets correcteurs de notre programme d'entraînement sur l'expression des récepteurs  $\beta$ 3-AR chez les rats diabétiques, nous ne pouvons avancer que des hypothèses spéculatives pour en expliquer les conséquences fonctionnelles. Actuellement, il existe peu de données quant aux voies de signalisation médiées par les récepteurs  $\beta$ 3-AR. Cependant, ils sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique, et selon Zhou et coll. (2006), dans le risque d'arythmie et de mort subite. De nouvelles expérimentations paraissent néanmoins nécessaires pour clarifier les effets, médiés par les récepteurs  $\beta$ 3-AR, d'un tel entraînement sur la fonction cardiaque diabétique.

Un des intérêts majeurs de cette étude est d'avoir étudié, sur un même modèle, 2 des principaux facteurs responsables du contrôle de l'activité cardiaque : l'homéostasie calcique et la fonction adrénérgique. Nous avons démontré, pour la 1<sup>ère</sup> fois, qu'un entraînement en endurance intense pour des rats diabétiques restaure largement l'expression des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ , RyR2, SERCA2 et NCX1, dans le cœur de ces animaux. Dans la mesure où le système  $\beta$ -AR contrôle le niveau de phosphorylation du complexe protéique régulateur du  $\text{Ca}^{2+}$ , nous faisons l'hypothèse que la réduction induite par l'entraînement dans les réponses  $\beta$ -AR modifie très certainement le niveau de phosphorylation des protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ , et ce faisant la transitoire calcique *in vivo*. De telles altérations pourraient contribuer à expliquer la concomitante bradycardie diabétique *in vivo* alors même que l'expression des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  est restaurée avec l'entraînement.

**Conclusion :**

Cette étude démontre pour la 1<sup>ère</sup> fois qu'un entraînement en endurance intense pour des animaux diabétiques induit une down-régulation des récepteurs  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-AR, ce qui pourrait altérer le niveau de phosphorylation ainsi que l'intégrité fonctionnelle des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, cet entraînement en endurance intense aggrave la bradycardie *in vivo* induite par le diabète et réduit les réponses myocardiques à la stimulation par l'isoprotérenol malgré une amélioration de l'expression des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nous suggérons que ces adaptations visent à protéger les animaux diabétiques contre le risque d'arythmie et de mort subite.

Cette 1<sup>ère</sup> étude apporte des données supplémentaires sur les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels l'entraînement physique améliore la fonction du myocarde au cours du diabète non traité à l'insuline. Cependant, aujourd'hui, la prise en charge thérapeutique du diabète de type 1 passe tout d'abord par la mise en place d'un traitement à l'insuline dès son diagnostic. Néanmoins avec le temps et malgré le traitement insulinique, un bon contrôle glycémique peut-être difficile à obtenir et un certain nombre de complications, notamment cardiovasculaires, apparaissent. Ainsi, pour une meilleure prise en charge, il est fortement conseillé aux patients de pratiquer une activité physique régulière. Les données de la littérature mettent en avant une diminution des complications cardiovasculaires chez les patients diabétiques pratiquant une activité physique régulière. Cependant, à l'heure actuelle, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces adaptations bénéfiques induites par le traitement à l'insuline combiné à l'entraînement physique ne sont pas connus.

Ainsi, nous avons, dans l'étude 2, mené une analyse moléculaire et fonctionnelle des adaptations myocardiques du cœur diabétique en réponse à un traitement bi-dimensionnel combinant le traitement à l'insuline et l'entraînement physique.

**Etude 2 : Un entraînement en endurance au cours du diabète potentialise les effets du traitement à l'insuline sur la fonction contractile cardiaque médiée par les protéines régulatrices du calcium**

Les résultats de cette étude sont soumis sous forme d'article au journal Nutr Metab Cardiovasc Dis.

S. Le Douairon Lahaye, A. Gratas-Delamarche, L. Malardé, MS. Zguira, S. Vincent, S. Lemoine Morel, F. Carré, F. Rannou Bekono. *Exercise training during diabetes potentiates insulin effect on cardiac contractile function mediated by Ca<sup>2+</sup>-cycling proteins.*

## **Introduction**

A l'heure actuelle, le traitement à l'insuline est largement reconnue comme la principale stratégie thérapeutique du diabète de type 1. Paradoxalement, très peu d'études se sont intéressées aux effets spécifiques du traitement à l'insuline sur les performances myocardiques au cours du diabète. Des études chez l'animal ont montré que des traitements à l'insuline relativement courts (2 à 3 semaines) normalise la fonction contractile étudiée *in vivo* (Litwin et coll. 1990, Netticadan et coll. 2001, Bidasee et coll. 2004) ou sur cœur isolé perfusé (Zhong et coll. 2001) ainsi que l'expression des principales protéines régulatrices du calcium (Choi et coll. 2001, Bidasee et coll. 2001, Netticadan et coll. 2001, Zhong et coll. 2001, Bidasee et coll. 2003a). Néanmoins, le traitement à l'insuline chez les patients diabétiques n'empêche pas, à long terme, le développement de nombreuses complications telles que la cardiomyopathie diabétique, suggérant alors que de sévères altérations apparaissent malgré le traitement (Flaim et coll. 1983, Fallow et Singh 2004, Acar et coll. 2009). Ainsi, avec le traitement à l'insuline, un régime alimentaire spécifique et une certaine éducation, la pratique sportive régulière est considérée comme un élément majeur de la prise en charge thérapeutique du diabète de type 1. De nombreuses études chez des patients diabétiques ont trouvé que l'entraînement physique diminue les facteurs de risques cardiovasculaires associés au diabète (Lehmann et coll. 1997, Ridell et Iscoe 2006, Heyman et coll. 2007). Cependant, jusqu'à aujourd'hui, les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents ne sont pas totalement élucidés. D'après une récente étude (Shao et coll. 2009), les bénéfices de l'entraînement physique sur la fonction cardiaque semblent être liés à une diminution des altérations induites par le diabète au niveau du système myocardique de régulation du calcium intracellulaire. Si le traitement à l'insuline et l'entraînement physique paraissent efficaces au moins à court terme dans le traitement du diabète, les effets respectifs de l'un et de l'autre n'ont jamais été discriminés. Enfin, bien que constituant avec l'alimentation, les pierres angulaires de la prise en charge thérapeutique du diabète, les effets combinés du traitement à l'insuline et de l'entraînement physique n'ont jamais été étudiés ensemble chez l'homme comme chez l'animal. Ainsi, nous faisons l'hypothèse qu'à long terme, le traitement à l'insuline et l'entraînement physique peuvent agir de façon synergique et ce faisant améliorer les performances myocardiques médiées par les protéines régulatrices du calcium.

Le but de cette étude 2 est donc d'étudier les effets respectifs et combinés du traitement à l'insuline et de l'entraînement physique (1) sur la fonction cardiaque de rats diabétiques (à



la fois *in vivo* et sur cœur isolé perfusé) et (2) sur l'expression de 5 des principales protéines régulatrices du calcium intracellulaire (RyR2, FKBP12, SERCA2, PLB, NCX1).

### **Matériel et méthode**

L'étude 2 porte sur 115 rats mâles âgés de 8 semaines. Ils sont aléatoirement répartis au sein de 6 groupes: sédentaire contrôle, sédentaire diabétique, sédentaire diabétique traité à l'insuline, entraîné contrôle, entraîné diabétique, et enfin, entraîné diabétique traité à l'insuline. Le traitement à l'insuline est ajusté quotidiennement durant les 8 semaines du protocole en fonction de l'état glycémique des animaux. Le programme d'entraînement consiste en une course progressive sur tapis roulant durant 8 semaines (5 jours par semaine, 1 heure par jour, à une vitesse finale de 25 m/min, pente de 10°) (Mokhtar et coll. 1993). La fréquence cardiaque de repos *in vivo* est mesurée, 2 fois au début et à la fin du protocole, chez des rats conscients (méthode du *tail cuff*). A l'issue du protocole d'entraînement, l'étude fonctionnelle sur cœurs isolés-perfusés a permis de déterminer les valeurs basales de fréquence cardiaque intrinsèque du VG, de pression développée par le VG (PVG), de l'index de contraction (+dP/dt) et de l'index de relaxation (-dP/dt) du VG. Les autres rats sont sacrifiés et les ventricules gauches ainsi que les muscles gastrocnémiens prélevés et pesés. La mesure de la citrate synthase est alors réalisée sur ces derniers muscles squelettiques, afin d'attester de l'efficacité de l'entraînement en endurance. Puis, des Western blot sont effectués sur les muscles ventriculaires afin d'analyser la densité des protéines régulatrices du Ca<sup>2+</sup> - RyR2, FKBP12, SERCA2, PLB et NCX1. 8 à 9 rats par groupe ont été utilisés pour l'étude des cœurs isolés perfusés et 7 à 10 autres rats pour l'analyse Western blot.

### **Analyse statistique**

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne ± la Déviation Standard. Après vérification de la distribution normale, les caractéristiques des animaux, l'activité de la citrate synthase, les densités des différentes protéines sont comparées entre les groupes par une anova à une voie. Une anova à deux voies mesures répétées est ensuite utilisée pour comparer les FC *in vivo* des animaux, entre les deux temps (avant (T1) et après (T2) le protocole d'entraînement) chez les rats des différents groupes. Une anova à une voie est utilisée pour comparer les paramètres fonctionnels myocardiques de base. Les anovas (une

et deux voies) sont suivies par un test post-hoc (Fisher LSD). Pour chaque test, le niveau de significativité est fixé pour  $p < 0,05$  (Statistica 7,1 ; StatSoft, France).

## **Résultats**

### **Caractéristiques générales**

*Au début de l'expérimentation* (après l'induction du diabète mais avant le début du traitement à l'insuline et du protocole d'entraînement) – le glucose sanguin est significativement plus élevé dans les groupes de rats diabétiques que chez les rats contrôles ( $390,9 \pm 7,6$  vs  $133,4 \pm 6,8$  mg.dL<sup>-1</sup>,  $p < 0,001$ ). L'induction du diabète a également induit une perte de poids significative chez les rats ( $321,8 \pm 3,3$  g pour les rats diabétiques vs  $360,5 \pm 3,9$  g pour les rats contrôles ;  $p < 0,001$ ).

*A la fin de l'expérimentation* – les caractéristiques générales des animaux sont répertoriées dans le **Tableau 2.1**.

Niveau de glucose sanguin – comme escompté, l'entraînement en endurance réduit les niveaux de glucose sanguin des rats diabétiques ( $p < 0,001$ ). La diminution est modérée mais similaire à celle observée dans des études antérieures (Bidasee et coll. 2008, Shao et coll. 2009). Dans les groupes diabétiques traités à l'insuline, les doses d'insuline sont quotidiennement ajustées en fonction de l'état glycémique des rats. Elles sont du même ordre que celles utilisées dans les études de Bidasee et coll. (2001) ou Zhong et coll. (2001). Les effets de l'insuline seule ou combinée à l'entraînement sont similaires mais plus importants que ceux de l'entraînement appliqué seul ( $p < 0,001$ ). Cependant, à la fin du protocole, les niveaux de glucose restent élevés chez les animaux diabétiques traités à l'insuline, entraînés ou non comparés aux rats contrôles. Ceci peut s'expliquer par le fait que les niveaux de glucose ont été mesurés le jour du sacrifice, au moins 18h après la dernière injection d'insuline.

Poids du corps – le poids du corps est nettement diminué chez les rats sédentaires diabétiques comparés aux rats sédentaires contrôles ( $p < 0,001$ ). Le traitement à l'insuline minimise cette perte de poids induite par le diabète. L'entraînement en endurance n'a pas d'effet significatif sur le poids du corps des rats contrôles. L'entraînement en endurance augmente le poids des rats diabétiques ( $p < 0,05$ ), mais celui des rats diabétiques traités à l'insuline.

Poids du cœur et poids du ventricule gauche – le poids du cœur ainsi que le poids du ventricule gauche sont significativement diminués chez les rats sédentaires

diabétiques comparés aux rats sédentaires contrôles ( $p < 0,001$ ). Cependant, les ratios Pcoeur/Pcorps et PVG/Pcorps sont significativement plus élevés chez les rats sédentaires diabétiques que chez les rats sédentaires contrôles ( $p < 0,001$  et  $p < 0,005$ , respectivement). De tels résultats reflètent l'hypertrophie cardiaque diabétique bien connue (Bidasee et coll. 2001, Netticadan et coll. 2001). Le traitement à l'insuline normalise tous ces paramètres. L'entraînement en endurance n'a pas d'effet significatif sur le poids du cœur, du VG et les ratios correspondants chez les rats contrôles. A contrario, l'entraînement atténue l'hypertrophie cardiaque diabétique comme en atteste la diminution significative du ratio Pcoeur/Pcorps chez les rats diabétiques entraînés comparés aux rats sédentaires diabétiques ( $p < 0,001$ ). Chez les rats diabétiques traités à l'insuline, l'entraînement en endurance n'a pas d'effet additionnel sur le poids du cœur et du VG. Le ratio Pcoeur/Pcorps plus important chez les rats entraînés diabétiques traités à l'insuline comparés à leur homologues sédentaires est uniquement du à la perte de poids du cœur induite par l'entraînement.

### **Activité de la citrate synthase**

Comme il peut être observé dans le **Tableau 2.1**, l'activité de la citrate synthase est significativement augmentée chez les rats entraînés comparés à leurs homologues sédentaires respectifs ( $p < 0,001$ ). L'augmentation d'activité de la citrate synthase est plus importante chez les rats diabétiques entraînés, traités ou non à l'insuline que chez les rats entraînés contrôles ( $p < 0,05$ ). De tels résultats pourraient s'expliquer par l'intensité relative de l'entraînement en endurance. Rodriguez et coll. (2007) ont montré que la  $VO_2$  max est sévèrement déprimée chez les rats diabétiques. Ainsi, une même vitesse de course absolue reflète certainement une intensité relative plus élevée pour les animaux diabétiques.

### **Fréquence cardiaque *in vivo***

*Au début de l'expérimentation* (après l'induction du diabète mais avant le début du traitement à l'insuline et du protocole d'entraînement) – comme dans les études antérieures (Golfmann et coll. 1999, Bidasee et coll. 2004), tous les rats diabétiques sont bradycardes comparés aux rats contrôles ( $348 \pm 4$  vs  $417 \pm 10$  bpm,  $p < 0,001$ ).

*A la fin de l'expérimentation* – le traitement à l'insuline normalise la FC *in vivo* chez les animaux diabétiques (sédentaires diabétiques insuline :  $371 \pm 3$ , sédentaires contrôles :  $384 \pm 8$  bpm). Chez les animaux contrôles, diabétiques et diabétiques traités à l'insuline,

l'entraînement en endurance diminue significativement la FC *in vivo* (entraînés contrôles : -6,6%,  $p < 0,001$ ; entraînés diabétiques : -8,2%,  $p < 0,01$ ; entraînés diabétiques traités à l'insuline : -5,8%,  $p < 0,05$ ). Les facteurs responsables sont certainement multiples mais l'un des plus incriminés est l'augmentation du tonus vagal induite par l'entraînement chez les animaux sains (De Angelis et coll. 2004) et diabétiques (De Angelis et coll. 2000).

### **Etude fonctionnelle du myocarde**

Fréquence cardiaque intrinsèque – à notre connaissance, aucune donnée sur les effets spécifiques de l'entraînement sur la FC intrinsèque durant le diabète n'est disponible dans la littérature. Dans cette présente étude, l'entraînement en endurance n'a pas d'effet significatif sur bradycardie diabétique. Avec le traitement à l'insuline, seule ou associé à l'entraînement en endurance, la FC intrinsèque est augmentée chez les rats diabétiques et tend vers des valeurs proches des valeurs contrôles (**Figure 2.1A**).

Pression développée par le ventricule gauche – la PVG est similaire dans les différents groupes. Ni le diabète, ni le traitement à l'insuline, ni l'entraînement en endurance n'a d'effet sur la PVG (**Figure 2.1B**).

-dP/dt – comme le montre la **Figure 2.1C**, les valeurs plus faibles de -dP/dt observées chez les rats diabétiques comparés aux rats contrôles ( $p < 0,05$ ), s'accordent bien avec les données antérieures (Zhong et coll. 2001). Elles reflètent une altération de la fonction de la relaxation induite par le diabète. Alors que l'entraînement en endurance seul ne parvient pas à normaliser cette fonction, le traitement à l'insuline seul ou associé à l'entraînement est capable d'augmenter -dP/dt chez les rats diabétiques jusqu'à des valeurs proches des valeurs contrôles.

+dP/dt – comme décrite par Zhong et coll. (2001), la diminution de +dP/dt observée chez les rats diabétiques ( $p < 0,05$ ) reflète une altération de la fonction contractile (**Figure 2.1D**). Ni l'insuline seule, ni l'entraînement en endurance seul ne parviennent à augmenter significativement ce paramètre chez les rats diabétiques. C'est seulement la combinaison du traitement à l'insuline et de l'entraînement en endurance qui y parvient, de telle sorte que +dP/dt observé chez les rats entraînés diabétiques traités à l'insuline devient plus élevé que chez les rats diabétiques sédentaires ( $p < 0,05$ ). Ces résultats indiquent que le traitement à l'insuline et l'entraînement en endurance exercent des effets additifs sur la fonction intrinsèque contractile.

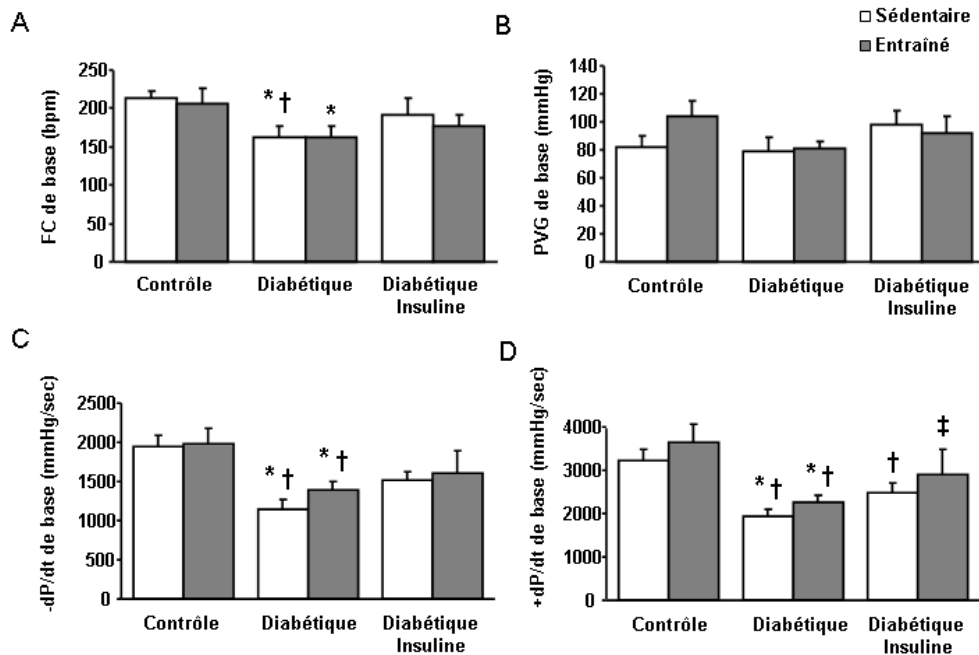
Tableau 2.1. Effets du diabète, du traitement à l'insuline et de l'entraînement sur les caractéristiques générales.

	Sédentaire contrôle <i>n</i> =18	Entraîné contrôle <i>n</i> =18	Sédentaire diabétique <i>n</i> =20	Entraîné diabétique <i>n</i> =19	Sédentaire diabétique insuline <i>n</i> =15	Entraîné Diabétique insuline <i>n</i> =15
Glucose sanguin (mmol.L <sup>-1</sup> )	7,6 ± 0,6	6,8 ± 0,2	30,9 ± 0,7 ▪	27,3 ± 1,3 ▪	11,8 ± 0,8 †‡¤	12,6 ± 0,8 †‡¤
PC (g)	505,3 ± 6,4	480,8 ± 10,5	286,2 ± 10,6*†	329,5 ± 11,8*†‡	419,2 ± 15,7 *†‡¤	395,2 ± 14,6*†‡¤
Pcoeur (mg)	1257,3 ± 33,9	1256,6 ± 44,8	854,1 ± 49,6*†	947,6 ± 34,6*†	1129,56 ± 55,3‡¤	1124,7 ± 56,3‡¤
PVG(mg)	1113,2 ± 43,3	1118,8 ± 49,5	722,8 ± 38,6*†	873,8 ± 34,6*†‡	999,2 ± 56,4‡	938,7 ± 57,9*†‡
Pcoeur/PC (mg/g)	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,0	3,4 ± 0,1*†	2,9 ± 0,1 *‡	2,7 ± 0,1‡	2,9 ± 0,1*‡
PVG/PC (mg/g)	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1*†	2,6 ± 0,1*†	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1
CS (µmol.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> .gTissu <sup>-1</sup> )	56,5 ± 1,7	69,6 ± 4,3*	61,3 ± 6,7	100,1 ± 9,7‡	74,1 ± 10,2	116,2 ± 7,7\$

• = significantly different from all other groups ( $p < 0,05$ ).

**PC**: Poids du corps; **PCoeur**: Poids du Coeur; **PVG**: Poids du ventricule ; **CS** : activité de la citrate synthase. \* = significativement différent des sédentaires contrôles ( $p < 0,05$ ), ‡ = significativement différent des sédentaires diabétiques ( $p < 0,05$ ), \$ = significativement différent des sédentaires diabétiques traités à l'insuline ( $p < 0,05$ ), † = significativement différent des entraînés contrôles, ¤ = significativement différent des entraînés diabétiques ( $p < 0,05$ ), • = significativement différent de tous les autres groupes ( $p < 0,05$ ).

**Figure 2.1. Mesure des performances de base des coeurs isolés perfusés des rats sédentaires contrôles ( $n=9$ ), entraînés contrôles ( $n=10$ ), sédentaires diabétiques ( $n=10$ ), entraînés diabétiques ( $n=10$ ), sédentaires diabétiques traités à l'insuline ( $n=7$ ) et entraînés diabétiques traités à l'insuline ( $n=7$ ). \*= significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ), †= significativement différent des rats entraînés contrôles ( $p<0,05$ ), ‡= significativement différent des sédentaires diabétiques ( $p<0,05$ ).**



### Expression des protéines myocardiques régulatrices du calcium

De façon cohérente avec des études antérieures (Netticadan et coll. 2001, Zhong et coll. 2001, Choi et coll. 2001, Bidasee et coll. 2001, 2003, 2004), le diabète produit des altérations significatives sur l'expression des principales protéines régulatrices du  $Ca^{2+}$  (**Figure 2.2**). RyR2, SERCA2 et NCX1 sont significativement diminués et PLB est significativement augmenté dans les coeurs des rats diabétiques sédentaires comparés aux coeurs sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ,  $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ,  $p<0,005$ , respectivement). Aucune différence significative dans l'expression de FKBP12 ne résulte du diabète.

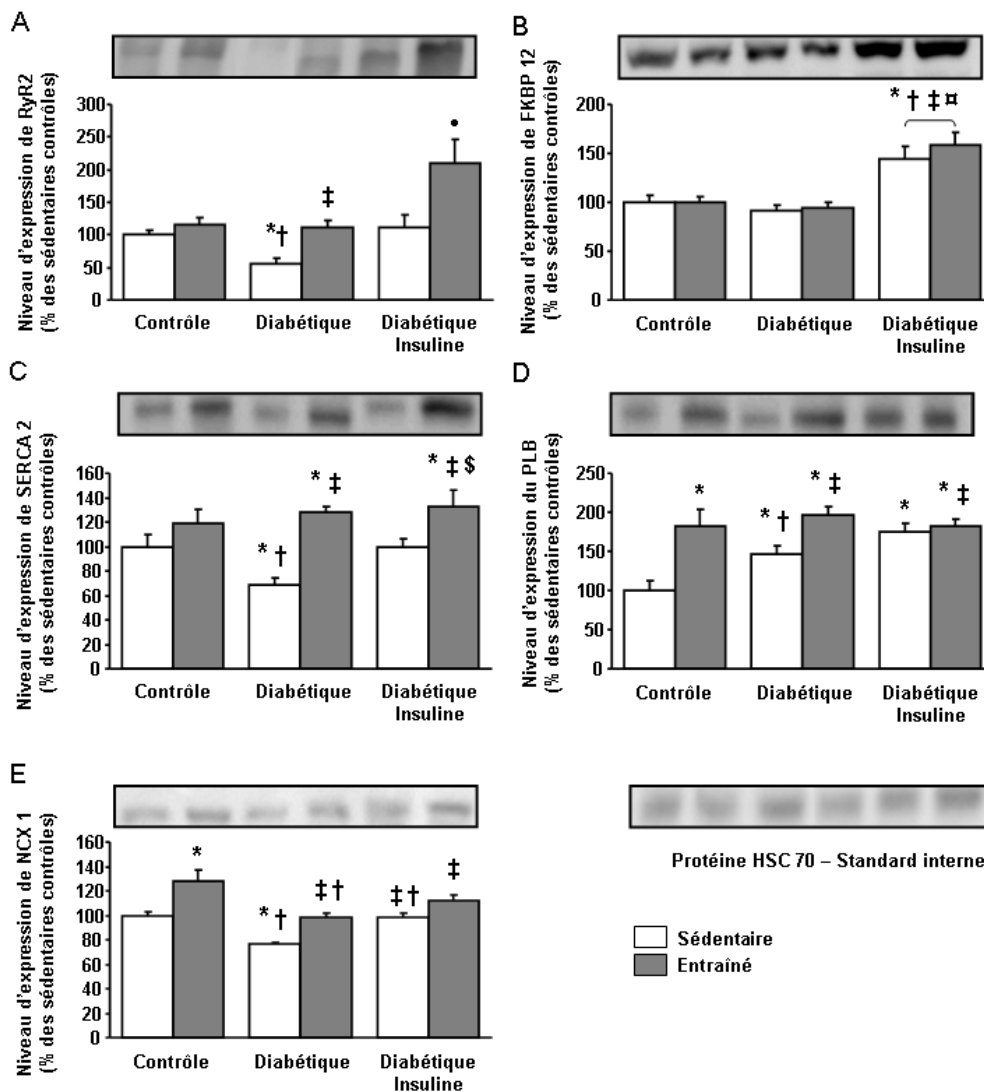
Le traitement à l'insuline des animaux diabétiques induit des changements significatifs dans l'expression des protéines régulatrices du  $Ca^{2+}$ . Comme l'illustre la **Figure 2.2**, le traitement à l'insuline résulte en une complète normalisation de RyR2, SERCA2 et NCX1. Le traitement à l'insuline surexprime significativement FKBP12 dans les coeurs de rats

sédentaires diabétiques traités à l'insuline puisque le niveau d'expression de la protéine devient significativement supérieur à celui des rats sédentaires contrôles ( $p < 0,005$ ). Cependant, avec le traitement à l'insuline seul, le ratio RyR2/FKBP12 reste inchangé (**Figure 2.3**).

Comme l'insuline, l'entraînement seul induit une complète normalisation de l'expression de RyR2 et NCX1. L'entraînement seul surexprime SERCA2 et PLB dont l'expression devient significativement supérieure à celle des rats sédentaires contrôles et diabétiques. A l'inverse de l'insuline, l'entraînement seul n'a pas d'effet sur l'expression du FKBP12. En conséquence, l'entraînement en endurance parvient à normaliser le ratio RyR2/FKBP12 mais pas le ratio SERCA2/PLB (**Figure 2.3**).

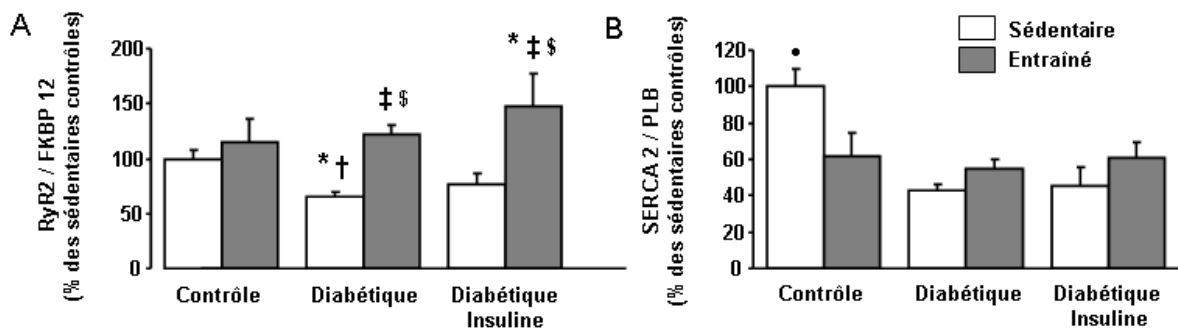
Enfin, lorsque le traitement à l'insuline et l'entraînement en endurance sont associés, ce traitement bi-dimensionnel induit une légère mais significative augmentation de l'expression de la protéine SERCA2 dans les cœurs des rats diabétiques. Par ailleurs, l'association de l'insuline et de l'entraînement résulte en une surexpression significative de la protéine RyR2 et en une nette augmentation du ratio RyR2/FKBP12 dont les valeurs deviennent significativement supérieures à celles observées dans les cœurs des animaux sédentaires, contrôles, diabétiques et diabétiques traités à l'insuline. Ces résultats indiquent que le traitement à l'insuline et l'entraînement en endurance ont des effets additifs sur les principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  impliquées dans la fonction contractile du myocarde.

**Figure 2.2.** Niveau d'expression des principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ , évalués par Western blot dans les coeurs de rats sédentaires contrôles ( $n=9$ ), entraînés contrôles ( $n=8$ ), sédentaires diabétiques ( $n=10$ ), entraînés diabétiques ( $n=9$ ), sédentaires diabétiques traités à l'insuline ( $n=8$ ) et entraînés diabétiques traités à l'insuline ( $n=8$ ). \* = significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p < 0,05$ ), † = significativement différent des rats entraînés contrôles ( $p < 0,05$ ), ‡ = significativement différent des rats sédentaires diabétiques ( $p < 0,05$ ), § = significativement différent des sédentaires diabétiques traités à l'insuline ( $p < 0,05$ ), • = significativement différent de tous les autres groupes ( $p < 0,05$ ).





**Figure 2.3. Ratios de RyR2/FKBP 12 et SERCA2/PLB des coeurs de rats sédentaires contrôles ( $n=9$ ), entraînés contrôles ( $n=8$ ), sédentaires diabétiques ( $n=10$ ), entraînés diabétiques ( $n=9$ ), sédentaires diabétiques traités à l'insuline ( $n=8$ ) et entraînés diabétiques traités à l'insuline ( $n=8$ ). \*= significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ), †= significativement différent des rats entraînés contrôles ( $p<0,05$ ), ‡= significativement différent des rats sédentaires diabétiques ( $p<0,05$ ), \$= significativement différent des sédentaires diabétiques traités à l'insuline ( $p<0,05$ ), • = significativement différent de tous les autres groupes ( $p<0,05$ ).**



## Discussion

Cette étude est la 1<sup>ère</sup> analyse moléculaire et fonctionnelle des adaptations myocardiques du cœur diabétique en réponse à un traitement bi-dimensionnel combinant le traitement à l'insuline et l'entraînement physique. Pour la 1<sup>ère</sup> fois, nous avons étudié les effets respectifs et combinés du traitement à l'insuline et de l'entraînement physique sur les performances myocardiques médiées par les protéines régulatrices du  $Ca^{2+}$ . Nos résultats majeurs montrent que 8 semaines de traitement à l'insuline ou d'entraînement physique ne parviennent ni l'un, ni l'autre à améliorer les performances myocardiques ; cependant, l'association du traitement à l'insuline et de l'entraînement physique parvient à normaliser la fonction contractile. Cet effet additif est très certainement médié par des adaptations dans la voie de signalisation impliquant les protéines régulatrices du  $Ca^{2+}$  puisque ce traitement bi-dimensionnel augmente nettement le ratio RyR2/FKBP12 considéré comme un index de la capacité de libération du  $Ca^{2+}$  par le RS (Ai et coll. 2005), et ainsi étroitement lié à la fonction contractile.

Comme dans les études antérieures, le diabète induit par injection de STZ engendre une bradycardie (Golfman et coll. 1999) et une altération des performances myocardiques

(Penpargkul et coll. 1980). Les effets respectifs du traitement à l'insuline et de l'entraînement physique sur la fréquence cardiaque *in vivo* et intrinsèque sont opposés. Le traitement à l'insuline augmente la fréquence cardiaque *in vivo* et intrinsèque chez les rats diabétiques, jusqu'à normalisation comme démontré précédemment (Zhong et coll. 2001, Bidasee et coll. 2004). A contrario, les effets de l'entraînement physique sur la bradycardie diabétique sont moins consistants. En effet, la bradycardie diabétique est soit renversée (Harthmann et coll. 2007, Shao et coll. 2009), soit inchangée (Bidasee et coll. 2008). Dans notre étude, l'entraînement physique diminue la fréquence cardiaque *in vivo* mais n'a pas d'effet sur la fréquence cardiaque intrinsèque des rats diabétiques. Ces divergences de résultats peuvent résulter de différences substantielles dans le protocole expérimental incluant la durée et l'intensité du protocole d'entraînement, la souche de rat... Les effets combinés du traitement à l'insuline et de l'entraînement physique n'ont jamais été étudiés que ce soit chez l'homme ou chez l'animal. Cette étude démontre pour la 1<sup>ère</sup> fois que lorsque le traitement à l'insuline et l'entraînement physique sont couplés, les effets bradycardisants de l'entraînement sont camouflés indiquant que le rôle de l'entraînement sur la fréquence cardiaque est moins important que celui exercé par le traitement à l'insuline.

De courtes expositions (moins de 3 semaines) à un traitement à l'insuline ou à un entraînement physique normalisent la fonction de relaxation évaluée par les changements de  $-dP/dt$  (Zhong et coll. 2001, Bidasee et coll. 2004, Bidasee et coll. 2008, Shao et coll. 2009). Dans cette présente étude, les effets respectifs de 8 semaines de traitement à l'insuline ou d'entraînement physique sur  $-dP/dt$  sont complètement différents : alors que l'entraînement physique n'a aucun effet significatif sur ce paramètre, le traitement à l'insuline est capable de l'améliorer légèrement. Ces données suggèrent fortement que de sévères altérations myocardiques de la fonction de relaxation apparaissent au cours du temps avec le diabète chronique malgré le traitement à l'insuline ou l'entraînement physique. Combinés, le traitement à l'insuline et l'entraînement physique n'ont pas d'effet additif sur  $-dP/dt$ . Parallèlement, le ratio SERCA2/PLB, un index de la capacité de captage du  $Ca^{2+}$  par le RS (Bidasee et coll. 2004), reste significativement diminué chez les animaux diabétiques traités ou non à l'insuline, et entraînés ou non. De façon surprenante, une diminution significative de ce ratio est aussi induite par l'entraînement physique chez les rats contrôles. Il est à noter que l'entraînement augmente significativement l'expression de la protéine NCX1 chez les rats contrôles comme chez les rats diabétiques. Lorsqu'elle est

combinée à l'entraînement physique, l'effet de l'insuline est davantage prononcé même si il n'est pas significatif. Ainsi, nous pouvons supposer que l'augmentation observée dans l'expression de la protéine NCX1, en favorisant une augmentation de l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule, constitue un mécanisme compensateur visant à contrebalancer la diminution de la capacité de captage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. Des études supplémentaires s'avèrent donc nécessaires pour clarifier ce point. Il semble particulièrement important d'explorer les caractéristiques fonctionnelles de ces protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Il a été démontré qu'une courte exposition (moins de 3 semaines) à un traitement à l'insuline ou à un entraînement physique normalise la fonction contractile évaluée par des changements de  $+dP/dt$  (Zhong et coll. 2001, Shao et coll. 2009). Dans notre étude, 8 semaines de traitement à l'insuline ou 8 semaines d'entraînement physique n'améliorent pas significativement ce paramètre suggérant que des altérations de la fonction contractile apparaissent également avec le développement du diabète à long terme. Cependant, cette présente étude démontre pour la 1<sup>ère</sup> fois que le traitement à l'insuline et l'entraînement physique appliqués de manière combinée ont un effet additif. En effet, le paramètre  $+dP/dt$  mesuré sur les cœurs provenant d'animaux diabétiques à la fois traités à l'insuline et entraînés n'est pas significativement différent de celui des animaux sédentaires contrôles. Cet effet additif est associé avec une nette augmentation du ratio RyR2/FKBP12, lequel devient même supérieur à celui observé chez les animaux contrôles sédentaires et entraînés. Ainsi, nous pouvons supposer que l'augmentation de l'expression de la protéine FKBP12 induite par le traitement à l'insuline pourrait contribuer à stabiliser la protéine RyR2. Celle-ci est, en effet, surexprimée de façon significative en réponse au traitement à l'insuline et principalement à l'entraînement physique. Le traitement bi-dimensionnel permettrait alors une plus forte stabilisation du complexe RyR2/FKBP12 assurant ainsi une meilleure intégrité fonctionnelle à la protéine RyR2 (Wehrens et coll. 2005). En conséquence, les effets du traitement à l'insuline et de l'entraînement physique sur la fonction contractile, médiés par les principales protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ , semblent totalement synergiques et complémentaires. Cependant, de façon surprenante, il est nécessaire de surexprimer les protéines RyR2 et FKBP12 pour seulement normaliser le paramètre  $+dP/dt$ . Ces données suggèrent que certaines protéines restent non fonctionnelles malgré le traitement bi-dimensionnel. Il est important de noter que les protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  sont susceptibles de subir des modifications post-translationnelles telles que des phosphorylations, des nitrosylations ou la formation d'AGE au cours du

diabète (Bidasee et coll. 2003a, 2003b, 2003c, 2004). Ces modifications peuvent en retour compromettre l'intégrité fonctionnelle des protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  et ainsi la fonction cardiaque. Ainsi, nous pouvons supposer qu'au fil du temps, des altérations post-translationnelles persistent malgré le traitement à l'insuline et l'entraînement physique. Les mécanismes sous-jacents sont certainement multiples et restent encore à clarifier. Toutefois, la difficulté de réaliser un contrôle glycémique complet pourrait être l'un d'entre eux. Chez les patients diabétiques, il est bien connu que l'hémoglobine glyquée, un index à long terme de la glycémie, reste difficile à normaliser (Lehmann et coll. 1997, Heyman et coll. 2007).

**Conclusion :**

Notre étude montre pour la 1<sup>ère</sup> fois qu'à long terme, le traitement à l'insuline ne normalise pas les performances myocardiques au cours du diabète. L'entraînement physique est également insuffisant. Cependant, nous avons démontré que combinés, le traitement à l'insuline et l'entraînement physique agissent de façon synergique et complémentaire sur la fonction contractile médiée par la voie de signalisation des protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, cette étude apporte de nouveaux éléments quant au rôle bénéfique de ce traitement bi-dimensionnel, l'insuline associée à l'entraînement, dans la prévention et le traitement de la cardiomyopathie diabétique.

Cependant, puisqu'il est nécessaire de surexprimer RyR2 et FKBP12 pour seulement normaliser la fonction contractile, nous faisons l'hypothèse que l'intégrité fonctionnelle de certaines protéines reste compromise malgré le traitement bi-dimensionnel. Les protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  sont susceptibles de subir des modifications post-translationnelles telles que des phosphorylations, des glycations, des nitrosylations, des dissociations de leur protéine régulatrice...C'est pourquoi, dans l'étude 3 nous nous sommes attachés à explorer les différences éventuelles, liées au diabète, au traitement à l'insuline et/ou à l'entraînement, dans l'expression de la protéine NO synthase neuronale (NOs1 ou nNOS), responsable du niveau de nitrosylation de la protéine RyR2. Nous avons également débuté une étude tissulaire sur coupes de ventriculaires gauches, afin de localiser les protéines NOs1 et RyR2 au sein de la cellule et d'identifier les effets spécifiques du diabète, du traitement à l'insuline et/ou de l'entraînement, sur la colocalisation RyR2/NOs1.

**Etude 3 : Effets d'un entraînement en endurance au cours du diabète sur la NO synthase neuronale (NOS1) : implication pour le récepteur de la ryanodine (étude complémentaire).**

## **Introduction**

La cardiomyopathie diabétique se caractérise notamment par des performances contractiles altérées en réponse à la stimulation  $\beta$ -AR (Buijs et coll. 2005, étude 1). Ces performances contractiles altérées sont généralement associées à une down-régulation des récepteurs  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-AR et à une up-régulation des récepteurs  $\beta$ 3-AR (Dinçer et coll. 2001, Bidasee et coll. 2008, étude 1). Amour et coll. (2007) ont montré que la surexpression des récepteurs  $\beta$ 3-AR associée au diabète est fortement impliquée dans ces dysfonctions  $\beta$ -AR via l'induction de monoxyde d'azote (NO) par la NO synthase neuronale (NOs1). Dans des conditions physiologiques, la NOs1 localisée au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS) participe à la S-nitrosylation de RyR2 favorisant ainsi la libération systolique de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Xu et coll. 1998). Cependant, dans les conditions pathologiques telles que la cardiomyopathie diabétique et l'insuffisance cardiaque (Damy et coll. 2004, Bendall et coll. 2004, Amour et coll. 2007), il se produit une augmentation de l'expression de la NOs1 associée à une translocation de cette protéine du RS vers le sarcolemme (SL) où elle va interagir avec la cavéoline-3 (cav3). En effet, dans les cœurs insuffisants cardiaques (Bendall et coll. 2004) ou diabétiques (Amour et coll. 2007), il a été démontré une augmentation du nombre de complexe NOs1-cav3 et une diminution du nombre de complexe NOs1-RyR2 suggérant bien une translocation de la NOs1. Cette translocation de la NOs1 pouvant alors conduire à une hyponitrosylation de RyR2, et à une dysfonction de la protéine (Gonzalez et coll. 2007). Ainsi, dans les cœurs diabétiques, l'augmentation de l'expression de la NOs1, sa translocation vers le SL et l'hyponitrosylation résultante du RyR2 associée à l'up-régulation des récepteurs  $\beta$ 3-AR contribuent aux altérations de la fonction myocardique associées au diabète.

Les résultats de notre étude 1 ont montré qu'un entraînement physique parvient à normaliser l'expression des récepteurs  $\beta$ 3-AR chez des rats diabétiques. Parallèlement, nous avons montré dans l'étude 2 qu'il est nécessaire de surexprimer RyR2 et sa protéine stabilisante, FKBP12.6, pour seulement normaliser la fonction contractile des rats diabétiques traités à l'insuline et entraînés. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que l'intégrité fonctionnelle de RyR2 reste compromise malgré les traitements, ceci du fait d'une hyponitrosylation persistante de RyR2 lié à une modification de l'expression et /ou de la localisation de la NOs1.

Le but de cette 3<sup>ème</sup> étude est donc (1) d'examiner l'impact spécifique de l'entraînement en endurance sur la protéine NOs1 et sur le récepteur  $\beta$ 3-AR dans le cœur de rats diabétiques

traités ou non à l'insuline grâce à des analyses Western blot (2) de déterminer les effets de cet entraînement sur la colocalisation RyR2/NOS1 à partir d'une étude tissulaire sur coupes de ventricules gauches.

### **Matériel et méthode**

L'étude 3 porte sur 55 rats mâles âgés de 8 semaines. Ils sont répartis de façon aléatoire au sein de 6 groupes : sédentaire contrôle (SC), sédentaire diabétique (SD), sédentaire diabétique traité à l'insuline (SIns), entraîné contrôle (EC) entraîné diabétique (ED) et entraîné diabétique traité à l'insuline (EIns). Le programme d'entraînement consiste en une course progressive sur tapis roulant durant 8 semaines (5 jours par semaine, 1 heure par jour, à une vitesse finale de 25 m/min, pente de 10°) (Mokhtar et coll. 1993). A la fin de la dernière session d'entraînement, les rats sont sacrifiés et les ventricules gauches sont prélevés puis pesés. Des westerns blot sont effectués sur les muscles ventriculaires afin d'analyser la densité de la NOS1 et du récepteur  $\beta$ 3-AR. Une étude histologique est actuellement en cours afin de déterminer la localisation de RyR2 et NOS1 sur coupes de ventricules gauches à partir d'immunofluorescence. Une colocalisation de RYR2 et NOS1 est également réalisée par double marquage.

### **Analyse statistique**

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  la Déviation Standard. Après vérification de la distribution normale, la densités des 2 protéines est comparées entre les groupes par une anova à une voie. Les anovas sont suivies par un test post-hoc (Fisher LSD). Pour chaque test, le niveau de significativité est fixé pour  $p < 0,05$  (Statistica 7,1 ; StatSoft, France).

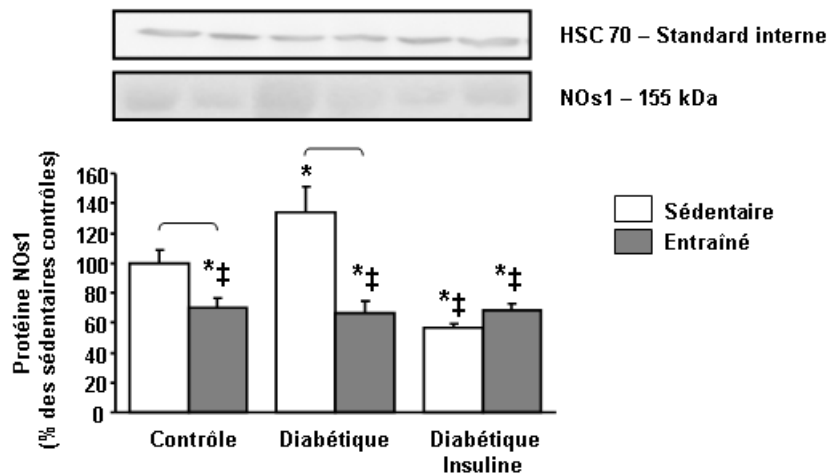
### **Résultats**

#### **Expression de la protéine NOS1**

Le diabète induit une augmentation significative de 34% de la protéine NOS1 ( $p < 0,01$ ). Le traitement à l'insuline diminue de manière significative ( $p < 0,001$ ) le niveau d'expression de la NOS1, en deçà du niveau contrôle (-44%) (**Figure 3.1**). Comme l'insuline, l'entraînement chez les animaux contrôles et chez les animaux diabétiques diminue de manière significative le niveau d'expression de la NOS1, de sorte que les rats entraînés, contrôles ou diabétiques, présentent significativement moins de protéine NOS1 que les rats

contrôles ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ , respectivement). Chez rats diabétiques traités à l'insuline, l'entraînement n'a pas d'effet additif sur le niveau d'expression de la protéine NOs1.

**Figure 3.1.** Niveau d'expression de la protéine NOs1, évalués par Western blot dans les coeurs de rats sédentaires contrôles ( $n=9$ ), entraînés contrôles ( $n=8$ ), sédentaires diabétiques ( $n=10$ ), entraînés diabétiques ( $n=9$ ), sédentaires diabétiques traités à l'insuline ( $n=10$ ) et entraînés diabétiques traités à l'insuline ( $n=8$ ). \*= significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p < 0,05$ ), ‡= significativement différent des rats sédentaires diabétiques ( $p < 0,05$ ).

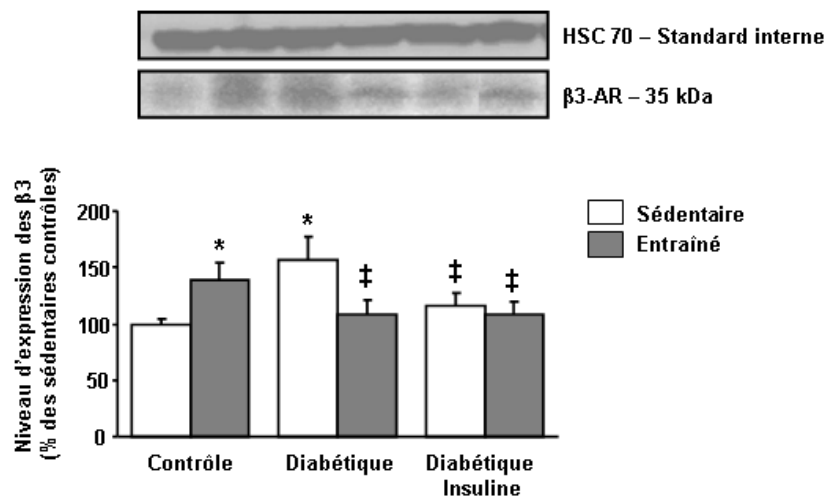


### Expression des récepteurs $\beta$ 3-AR

Le diabète induit une augmentation significative de 57% des récepteurs  $\beta$ 3-AR ( $p < 0,01$ ) (Figure 3.2). Le traitement à l'insuline ou l'entraînement appliqués isolément diminuent de manière significative ( $p < 0,05$ ) le niveau d'expression des  $\beta$ 3-AR, jusqu'à normalisation. Chez les rats diabétiques traités à l'insuline, l'entraînement n'a pas d'effet additif sur le niveau d'expression des  $\beta$ 3-AR.



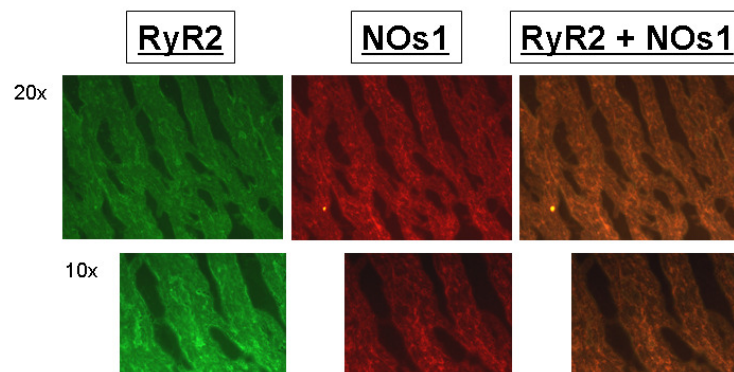
**Figure 3.2.** Niveau d'expression des récepteurs  $\beta 3$ -AR, évalués par Western blot dans les coeurs de rats sédentaires contrôles ( $n=9$ ), entraînés contrôles ( $n=8$ ), sédentaires diabétiques ( $n=10$ ), entraînés diabétiques ( $n=9$ ), sédentaires diabétiques traités à l'insuline ( $n=10$ ) et entraînés diabétiques traités à l'insuline ( $n=8$ ). \*= significativement différent des rats sédentaires contrôles ( $p<0,05$ ), ‡= significativement différent des rats sédentaires diabétiques ( $p<0,05$ ).



### Immunofluorescence

La mise au point des marquages d'immunofluorescence venant d'aboutir, nous n'avons pas à ce jour suffisamment de données pour conclure.

**Figure 3.3.** Marquage de RyR2 (en vert), NOs1 (en rouge) et comarquage RyR2/NOs1 (en orange)



## **Discussion**

Les résultats préliminaires de cette 3<sup>ème</sup> étude démontrent pour la 1<sup>ère</sup> fois que 8 semaines de traitement à l'insuline ou d'entraînement physique normalisent le niveau d'expression des récepteurs  $\beta$ 3-AR et induisent une down-régulation de la protéine NOs1. Combinés, le traitement à l'insuline et l'entraînement physique ne parviennent pas à normaliser l'expression de NOs1 et n'ont pas d'effet additif sur l'expression des récepteurs  $\beta$ 3-AR.

Il a été démontré que la surexpression des récepteurs  $\beta$ 3-AR joue un rôle important dans la diminution des réponses inotropes à la stimulation  $\beta$ -AR associée au diabète (Amour et coll. 2007). Les auteurs considèrent que cet effet est médié par l'induction de NO liée à la surexpression de la NOs1, isoforme largement majoritaire dans le cardiomyocyte diabétique. Le rôle de la NOs1 dans les dysfonctions cardiaques a également été mis en évidence dans un modèle expérimental de souris transgéniques. En effet, une diminution de la contractilité et des réponses contractiles du myocarde à la dobutamine ont été retrouvée *in vivo* chez les souris transgéniques surexprimant la NOs1 (Burkard et coll. 2007). Dans des conditions physiologiques, la NOs1 localisée au niveau du RS participe à la S-nitrosylation de RyR2 favorisant ainsi la libération systolique de  $Ca^{2+}$  (Xu et coll. 1998). Cependant, dans les conditions pathologiques telles que la cardiomyopathie diabétique et l'insuffisance cardiaque (Damy et coll. 2004, Bendall et coll. 2004, Amour et coll. 2007), l'augmentation de l'expression de la NOs1 est associée à une translocation de cette protéine du RS vers le SL où elle va interagir avec la cav3. Il peut alors en résulter une hyponitrosylation de RyR2, un dysfonctionnement de la protéine et donc des altérations de la fonction contractile (Gonzalez et coll. 2007). Ainsi, la surexpression de la NOs1 retrouvée chez nos rats diabétiques, associée d'une part à la surexpression des récepteurs  $\beta$ 3-AR et d'autre part à la down-régulation des récepteurs  $\beta$ 1-AR (étude 1), pourrait donc en partie expliquer la diminution de la fonction contractile de base et la diminution de sensibilité myocardique à la stimulation  $\beta$ -AR mises en évidence dans le cadre de l'étude 1.

Les effets respectifs du traitement à l'insuline et de l'entraînement physique sur les récepteurs  $\beta$ 3-AR et sur la protéine NOs1 n'ont jamais été étudiés. Dans cette étude, nous avons démontré que chez les animaux diabétiques, le traitement à l'insuline, l'entraînement physique ainsi que le traitement bi-dimensionnel associant l'insuline et l'entraînement induisent une normalisation de l'expression des récepteurs  $\beta$ 3-AR et de façon surprenante, une down-regulation de la protéine NOs1. Cette down-regulation de la NOs1 reste à ce

jour inexplicée, ce d'autant plus que les données de la littérature mettent en évidence une augmentation de l'expression de la NOS1 suite à un entraînement physique chez des animaux sains (Zeng et coll. 2005, Danson et coll. 2003, Tatchum-Talom et coll. 2000). Ces divergences de résultats quant aux effets de l'entraînement sur l'expression de la NOS1 pourraient en partie s'expliquer par des facteurs méthodologiques tels que le modèle animal utilisé (rat, souris, animaux sains, pathologiques), le protocole d'entraînement (course, nage, durée, intensité...), ou encore le tissu étudié (tissu musculaire ventriculaire, auriculaire, squelettique...).

Néanmoins, l'hypothèse d'un déséquilibre nitroso-redox (Hare et Stamler 2005) résultant de cette déficience en NOS1 pourrait en partie expliquer la dépression persistante de la fonction contractile de base malgré les traitements. En effet, la déficience en NOS1 induite par le traitement à l'insuline ou l'entraînement pourrait altérer l'activité de RyR2 du fait d'une hyponitrosylation et d'une augmentation de l'oxydation du canal liée à une diminution de la disponibilité du NO nécessaire pour neutraliser l' $O_2^-$  produit par la xanthine oxydo-reductase (XOR) (Xu et coll. 1998). Ces modifications post-translationnelles de RyR2 pourraient donc être responsables d'une activation irréversible de la protéine, et de fuites calciques diastoliques malgré les traitements (Gonzalez et coll. 2007). Ainsi, cette déficience en NOS1 pourrait expliquer le fait que ni le traitement à l'insuline, ni l'entraînement ne parviennent à normaliser complètement la fonction contractile myocardique malgré des modifications positives au niveau des récepteurs  $\beta_3$ -AR, et de l'expression du complexe RyR2/FKBP 12.

De façon surprenante, le traitement à l'insuline et l'entraînement physique appliqués de manière combinée ont un effet additif et positif sur la contractilité (étude 2) alors même que ce traitement bi-dimensionnel ne parvient pas à corriger la down-regulation de la NOS1 chez les rats diabétiques. Il est possible que cette amélioration de la fonction contractile de base malgré la déficience en NOS1 soit liée à des modifications du confinement spatial de cette protéine suite au traitement bi-dimensionnel (Bendall et coll. 2004). Une diminution du nombre de complexe NOS1-cav3 associée à une augmentation des complexes NOS1-RyR2 pourrait en effet jouer un rôle fondamental dans l'amélioration de la contractilité. Notre étude tissulaire actuellement en cours devrait nous apporter des données complémentaires quant à la localisation cellulaire de la protéine NOS1 et à sa colocalisation avec RyR2.

**Conclusion :**

Les résultats préliminaires de cette 3<sup>ème</sup> étude démontrent pour la 1<sup>ère</sup> fois que le traitement à l'insuline ou l'entraînement physique induisent une down-régulation de la protéine NOs1 au cours du diabète. Cette déficience en NOs1 n'est pas corrigée lorsque le traitement à l'insuline est combiné à l'entraînement physique alors même que ce traitement bi-dimensionnel améliore la contractilité du myocarde (étude 2). Notre étude tissulaire actuellement en cours devrait nous apporter de nouveaux éléments quant au confinement spatial de la NOs1, et à son implication dans les modifications de la fonction contractile.

## ***CONCLUSION DES RESULTATS***

Le traitement à l'insuline n'empêchant pas à long terme le développement de la cardiomyopathie, l'activité physique régulière est aujourd'hui proposée comme complément à la prise en charge médicamenteuse du diabète. De nombreuses études expérimentales ont montré qu'une courte exposition à un traitement à l'insuline ou à un entraînement physique parvient à normaliser la fonction myocardique au cours du diabète, en atténuant les désordres occasionnés par le diabète au niveau de la fonction  $\beta$ -adrénergique et de l'homéostasie calcique, 2 facteurs essentiels pour le contrôle de cette fonction myocardique. Cependant, jusqu'à présent, si le traitement à l'insuline et l'entraînement physique paraissent efficaces au moins à court terme dans le traitement du diabète, leurs effets respectifs ainsi que leurs effets combinés à plus long terme n'avaient jamais été étudiés. Nous avons donc fait l'hypothèse qu'à long terme, le traitement à l'insuline et l'entraînement physique pouvaient agir synergiquement et ce faisant améliorer les performances myocardiques médiées plus particulièrement par la fonction  $\beta$ -adrénergique et le système de régulation du calcium intracellulaire.

Au cours de mes travaux de thèse nous avons montré qu'à long terme le traitement à l'insuline et l'entraînement physique que nous avons appliqués ne parviennent ni l'un, ni l'autre à améliorer les performances myocardiques chez les rats diabétiques. De plus, si notre entraînement en endurance n'a pas permis d'améliorer les performances myocardiques dans notre modèle de rat diabétique non traité à l'insuline, il a même accentué la bradycardie et la désensibilisation  $\beta$ -adrénergique induites par le diabète. Par ailleurs, dans notre modèle d'étude, associés le traitement à l'insuline et l'entraînement en endurance parviennent à normaliser la fonction contractile. Cet effet additif semble médié au moins en partie par des adaptations dans la voie de signalisation impliquant les protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nous montrons donc ici le rôle crucial de l'activité physique régulière dans la prise en charge thérapeutique de la cardiomyopathie diabétique. Néanmoins, nous démontrons également l'importance de la charge d'entraînement qui doit être adaptée à la pathologie pour induire les effets bénéfiques escomptés.

En conclusion, nos travaux révèlent l'intérêt majeur d'un traitement bi-dimensionnel – traitement à l'insuline, activité physique adaptée – dans la prise en charge thérapeutique quotidienne de la cardiomyopathie diabétique. Ils ouvrent donc de nouvelles

perspectives dans cette prise en charge thérapeutique pouvant déboucher sur l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques dans lesquelles l'activité physique ne serait plus proposée comme simple complément au traitement à l'insuline mais intégrée comme constituant essentiel de la thérapie.





## ***DISCUSSION ET PERSPECTIVES***

*Le but de la discussion ne doit pas être la victoire, mais l'amélioration*

*J. Joubert*

L'objectif de ce travail était de déterminer au cours de la cardiomyopathie diabétique, les effets respectifs d'un traitement à l'insuline et d'un programme d'entraînement en endurance sur la fonction myocardique médiée par 2 de ses systèmes de contrôle, le système  $\beta$ -adrénergique et le système de régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire au cours de la cardiomyopathie diabétique.

Nos résultats suggèrent qu'une pratique sportive bien adaptée constitue avec le traitement à l'insuline un élément majeur de la prise en charge thérapeutique de la cardiomyopathie diabétique.

Cependant, ils soulèvent un certain nombre de questions, ouvrent un certain nombre de perspectives et appellent un prolongement de certains travaux afin de:

- (1) pouvoir définir précisément des modalités d'entraînement adaptées pour la prévention et le traitement des complications cardiovasculaires chez le patient diabétique.
- (2) pouvoir approfondir la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les adaptations cardiaques induites par l'entraînement au cours du diabète.

## **1. EFFET DE LA CHARGE D'ENTRAÎNEMENT SUR LES ADAPTATIONS MYOCARDIQUES AU COURS DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABÉTIQUE**

Les résultats de la 1<sup>ère</sup> étude ont confirmé l'influence de la charge d'entraînement sur les adaptations myocardiques. Il en ressort qu'un programme d'entraînement modéré pour des animaux sains ne l'est pas pour des animaux diabétiques. En effet, l'augmentation plus importante de la citrate synthase, l'accentuation de la bradycardie et de la désensibilisation  $\beta$ -adrénergique sont autant de preuves en faveur d'un entraînement intense pour ces animaux diabétiques. De même, la 2<sup>ème</sup> étude a mis en évidence des effets mitigés du traitement bi-dimensionnel (insuline/entraînement) sur la fonction cardiaque médiée par les protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$ . Alors que ce traitement bi-dimensionnel a eu des effets bénéfiques sur la fonction contractile et sur les protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  impliquées dans cette fonction, il n'a pas permis de normaliser la fonction de relaxation et les protéines qui lui sont associées. Dans la mesure où les dysfonctions de la relaxation

précèdent celles de la contractilité (Mahgoub et coll. 1998), nous pouvons émettre 2 hypothèses : soit la durée totale de notre entraînement n'était pas suffisante pour restaurer la fonction de relaxation, soit le caractère progressif de notre programme d'entraînement limite son efficacité sur cette fonction de relaxation. Les 1<sup>ères</sup> semaines d'entraînement, faibles en intensité comme en durée sont peut être insuffisantes pour prévenir le déclin de la fonction de relaxation qui est la 1<sup>ère</sup> atteinte. Il serait donc intéressant de débiter le programme d'entraînement avant le début du diabète pour déterminer si celui-ci peut prévenir les désordres occasionnés par le diabète sur cette fonction de relaxation. Quoiqu'il en soit, il apparaît clairement que les modalités du programme d'entraînement conditionnent les adaptations cardiovasculaires. Ceci a d'ailleurs été démontré chez l'animal pour la fonction endothéliale altérée par le risque cardiovasculaire (diabète, obésité, hypertension artérielle...) (Pellegrin et coll. 2008). Concernant la durée, l'amélioration de la vasorelaxation endothélium-dépendante (EDV) (adaptation fonctionnelle de l'endothélium) à l'exercice surviendrait dès les 1ers jours de l'entraînement (Maiorana et coll. 2003). Un entraînement de moyenne durée (quelques semaines) permettrait un bénéfice encore plus important (Haram et coll. 2006). En revanche, à long terme (plusieurs mois), l'exercice provoquerait non plus une adaptation de la fonction endothéliale mais une adaptation structurale artérielle qui normaliserait l'EDV (Maiorana et coll. 2003). La fréquence de l'effort serait également une composante majeure pour stimuler la fonction endothéliale. Cette hypothèse est issue d'une récente étude menée chez le rat sain, qui a montré que l'amélioration de l'EDV est d'autant plus importante que la fréquence d'entraînement est élevée (comparaison de 2, 3 ou 5 séances de course/semaine) (Heylen et coll. 2008). Enfin, il est suggéré chez l'homme sain que l'exercice doit être pratiqué à une intensité modérée (50% de la capacité maximale de travail) pour obtenir une amélioration de l'EDV. L'entraînement de faible intensité (25%) n'induit aucune adaptation alors que l'entraînement d'intensité élevée (75%) induit au contraire une diminution des réponses vasorelaxantes avec en plus un stress oxydant (Goto et coll. 2003). Ces données pourraient d'ailleurs expliquer l'absence d'effet de notre entraînement sur la fonction de relaxation chez nos animaux diabétiques qu'ils soient traités ou non à l'insuline. Bien que des effets bénéfiques d'un entraînement comparable à celui que nous avons utilisé aient été mis en évidence sur la fonction myocardique et plus particulièrement sur l'utilisation myocardique de glucose (Broderick et coll. 2005), l'ensemble de ces données nous permettent d'incriminer l'intensité de l'entraînement pour

expliquer nos résultats. En effet, en se basant uniquement sur la vitesse du tapis, la consommation d'oxygène de nos animaux diabétiques serait supérieure à 80% de leur consommation maximale d'oxygène (Rodrigues et coll. 2007). Une telle intensité nous permettrait donc de qualifier d'intense notre entraînement pour nos animaux diabétiques. De plus, chez des animaux sains, l'inclinaison du tapis est connue pour affecter de manière significative la consommation d'oxygène (Wisloff et coll. 2001). Ainsi, bien que des précautions soient nécessaires quant à l'interprétation de l'intensité de l'exercice, il semble raisonnable de conclure sur le caractère intense de notre entraînement pour nos animaux diabétiques et donc sur l'importance d'appliquer un entraînement adapté pour cette population pathologique. Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à vérifier les effets de la durée, de la fréquence et de l'intensité de l'exercice sur l'optimisation de la fonction myocardique au cours du diabète. L'effet préventif éventuel d'un entraînement réalisé avant l'installation du diabète reste également à confirmer dans le cadre de la cardiomyopathie diabétique. Compte-tenu de nos résultats et des données de la littérature, une étude chez l'animal s'attachant à déterminer les modalités optimales en termes de durée, de fréquence et d'intensité de l'exercice permettant d'améliorer la fonction myocardique au cours du diabète de type 1 nous semble intéressante à mener. Une récente étude chez des souris diabétiques de type 2 (db/db) lance des pistes sur l'intérêt d'un entraînement de type intermittent (Stolen et coll. 2009). Suite à 13 semaines d'entraînement constitué de sessions de 80 minutes alternant 4 minutes de course à 85-90% de  $VO_2$  max suivies de 2 minutes à 50% de  $VO_2$  max, les auteurs ont obtenu des résultats très encourageants sur la fonction myocardique. En effet, il est démontré que l'entraînement restaure la fonction contractile des souris diabétiques, adaptation qui est associée à une normalisation de la synchronicité du relargage de  $Ca^{2+}$  par le RS, de l'amplitude de la transitoire calcique, des activités ATPase du RS et de l'activité du NCX. Ainsi, une étude visant à comparer les effets d'un programme d'entraînement de type intermittent vs continu serait également très intéressante dans le but de déterminer les modalités optimales de l'exercice permettant d'améliorer la fonction myocardique au cours du diabète de type 1.

A l'heure actuelle, curieusement, aucune étude ne s'est attachée à déterminer précisément les effets d'un entraînement sur la fonction cardiaque du patient diabétique de type 1. Parallèlement à ces études complémentaires qui pourront être réalisées chez le rat, il

---

apparaît primordial de réaliser des études chez le patient diabétique afin de déterminer si les effets bénéfiques de l'entraînement en endurance sur la fonction contractile de nos animaux diabétiques traités à l'insuline se retrouvent également chez l'humain. De plus, comme chez l'animal, il apparaît primordial de déterminer les modalités optimales d'entraînement permettant de prévenir et de traiter les complications métaboliques et cardiovasculaires associées au diabète, de diminuer les doses d'insuline et enfin, d'améliorer la qualité de vie du patient diabétique. L'objectif de ce type d'études serait de renforcer l'intérêt de l'activité physique dans la prise en charge thérapeutique du patient diabétique et d'identifier la meilleure adéquation possible entre le traitement à l'insuline et l'activité physique. Ces travaux pourraient être réalisés en étroite collaboration avec le CHU de Rennes et plus spécifiquement avec le service d'Endocrinologie Pédiatrique (Pr De Kerdanet) et le service d'explorations fonctionnelles (Pr Carré).

De plus, ces travaux pourraient faire partie intégrante du programme APAD BRET (Activité Physique, Alimentation, Diabète, Bretagne) piloté par l'équipe « Exercice et Dysfonctions Métaboliques » de notre laboratoire. Ce programme a pour objectif de sensibiliser les sujets diabétiques à l'activité physique et à l'alimentation. Pour ce faire, il vise la conception et la réalisation de supports d'information efficaces pour les diabétiques en matière d'activité physique et d'alimentation. Plus spécifiquement, par l'intermédiaire du Réseau Diabète 35, ce programme a pour but de proposer, aux personnes diabétiques, des recommandations nutritionnelles et d'activité physique par l'intermédiaire de fiches recettes et de fiches d'activité physique adaptée. Ainsi, des travaux chez l'homme ayant pour but de déterminer les modalités d'exercice les plus adaptées à la population diabétique pourraient jouer un rôle fondamental dans la conception des fiches d'activité physique.

Néanmoins, une compréhension approfondie des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les adaptations cardiaques induites par l'activité physique au cours du diabète s'avère nécessaire et même indispensable pour la conception des fiches de recommandations en termes d'activité physique. Ainsi, dans les paragraphes suivants, nous allons discuter nos résultats d'un point de vue purement cellulaire et moléculaire et proposer des perspectives de travail qui pourraient permettre de mieux comprendre ces adaptations cardiaques à l'entraînement.

## **2. LE SYSTEME B-ADRENERGIQUE AU COURS DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABETIQUE : IMPACT DE L'ENTRAINEMENT**

Il est bien établi que la régulation du système  $\beta$ -adrénergique ne se borne pas uniquement à la simple régulation des récepteurs  $\beta$ -AR. En effet, tous les effecteurs en amont ou en aval de ces récepteurs peuvent être impliqués dans la modulation des réponses myocardiques liées au diabète et/ou à l'entraînement. Les mécanismes d'action des récepteurs  $\beta$ 3-AR ainsi que les voies de signalisation impliquées sont encore loin d'être clairement définis. Cependant, cette voie est de plus en plus explorée car elle ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes dans le cadre de pathologies comme l'insuffisance cardiaque et la cardiomyopathie diabétique. Ainsi, des études chez l'homme (Moniotte et coll. 2001) comme chez l'animal (Cheng et coll. 2001) ont montré, comme dans la cardiomyopathie diabétique, une surexpression du récepteur  $\beta$ 3-AR dans les cœurs insuffisants. Cependant, le rôle des  $\beta$ 3-AR, en particulier les effets de leur activation chronique, dans la pathogénèse de l'insuffisance cardiaque reste encore à déterminer. Bien que la relation de cause à effet entre la surexpression des  $\beta$ 3-AR et les dysfonctions ventriculaires gauches reste toujours à clarifier, en s'appuyant sur l'effet inotrope négatif de la stimulation  $\beta$ 3-AR, Gauthier et coll. (1996) ont fait l'hypothèse que ce sous type de récepteur joue un rôle critique dans la pathogénèse et la progression de l'insuffisance cardiaque chronique. Néanmoins, Moniotte et coll. (2001) suggèrent que l'activation chronique des  $\beta$ 3-AR pourrait potentiellement induire des effets bénéfiques tels qu'un antagonisme fonctionnel des effets inotropes positifs médiés par l'activation des  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-AR ainsi qu'une amélioration de la fonction diastolique médiée par la voie de signalisation impliquant la guanylate cyclase et le NO. L'effet compensateur de la surexpression des récepteurs  $\beta$ 3-AR peut alors être vu comme un mécanisme de prévention des dommages au niveau des cardiomyocytes. De plus, la protection cardiaque médiée par la stimulation  $\beta$ 3-AR pourrait résulter (1) d'une réduction de l'activation des canaux calciques de type L, et ainsi de la surcharge calcique, (2) d'une moindre libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS en diastole lié à la production de NO et à la nitrosylation du RyR2 (3) d'une meilleure fonction diastolique liée à la production de NO et à l'activation de la SERCA2, (4) à la préservation du contenu en ATP et en créatine phosphate liées à l'effet inotrope négatif. De la même façon, dans les cœurs sains, l'effet inotrope négatif induit par la stimulation  $\beta$ 3-AR pourrait jouer le rôle de « soupape de sécurité » durant une stimulation adrénérergique intense (situation de

stress, effort physique important,...). Zhou et coll. (2008) ont démontré que le BRL 37344 (un agoniste sélectif  $\beta_3$ -AR) réduit significativement la probabilité de survenue de tachycardie dans un modèle canin d'infarctus du myocarde, présentant donc un état hyperadrénergique. En effet, la stimulation  $\beta_3$ -AR dans ce modèle minimise l'hypertrophie cardiaque après l'infarctus du myocarde, laquelle est un des facteurs de risque de tachyarythmie ventriculaire et de mort subite. De plus, les auteurs ont estimé l'utilité potentielle des agonistes  $\beta_3$ -AR dans la thérapie des arythmies post-infarctus du myocarde. Ils ont reporté une diminution de l'intervalle QT par la stimulation  $\beta_3$ -AR, ce qui dans ce modèle aide à prévenir la survenue des facteurs arythmogènes. Ainsi, la stimulation sélective  $\beta_3$ -AR exerce des effets antiarythmiques et les  $\beta_3$ -AR pourraient constituer une nouvelle cible thérapeutique contre les arythmies (Zhou et coll. 2008).

La surexpression des  $\beta_3$ -AR associée à la sous-expression des  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR semble donc constituer un mécanisme adaptatif de protection contre les arythmies. Cependant, dès lors que l'insuffisance cardiaque progresse, il semble que ce mécanisme et plus particulièrement l'activation des récepteurs  $\beta_3$ -AR puisse être mal adapté et devenir délétère, du fait d'un effet inotrope négatif persistant déprimant davantage la fonction myocardique (Gauthier et coll. 2000, Rozec et coll. 2006). En utilisant un modèle de rat insuffisant cardiaque induit par de l'isoprotérenol, Kong et coll. (2004) ont montré que le BRL 37344 aggrave fortement l'altération de la fonction cardiaque et stimule l'apoptose des cardiomyocytes. Le blocage des récepteurs  $\beta_3$ -AR a d'ailleurs été suggéré dans le traitement des patients en phase finale d'insuffisance cardiaque dont la fonction systolique est déjà sévèrement compromise (Gauthier et coll. 2000).

Dans le cas de la cardiomyopathie diabétique, très peu d'études se sont intéressées aux effets fonctionnels de la surexpression des récepteurs  $\beta_3$ -AR. Amour et coll. (2007) ont néanmoins montré que la surexpression des récepteurs  $\beta_3$ -AR associée au diabète est fortement impliquée dans les dysfonctions  $\beta$ -AR myocardiques via l'induction de NO par la NOS1. Ainsi, sur la base de ces données complétées par celles relatives à l'insuffisance cardiaque, nous pouvons faire l'hypothèse que la surexpression des récepteurs  $\beta_3$ -AR associée au diabète constitue dans un 1<sup>er</sup> temps un mécanisme adaptatif et protecteur pour faire face à l'état hyperadrénergique puis dans un 2<sup>nd</sup> temps, un mécanisme maladaptatif se traduisant par la dépression de la fonction myocardique observée chez nos animaux diabétiques. Quant à l'effet correctif de notre entraînement sur l'expression du récepteur  $\beta_3$ -AR, nous pouvons suggérer qu'il vise à contrebalancer l'effet inotrope négatif

persistant lié à l'état hyperadrénergique induit à la fois par le diabète (Ganguly et coll. 1986) et l'entraînement (Zouhal et coll. 2008). En parallèle, les modifications induites par l'entraînement sur l'expression des  $\beta$ 2-AR chez les rats diabétiques non traités à l'insuline semblent également constituer un mécanisme protecteur. En effet, la stimulation  $\beta$ 2-AR, notamment en favorisant le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RS, présente un caractère arythmogène dans les cœurs de lapins et d'humains souffrant d'insuffisance cardiaque (DeSantiago et coll. 2008). Dans notre modèle de cardiomyopathie diabétique, la diminution de l'expression des  $\beta$ 2-AR sous l'effet de l'entraînement peut donc être interprétée comme un mécanisme de protection anti-arythmogénique.

Pour tester ces hypothèses, il serait intéressant de mener une étude *in vivo*, sur animaux conscients visant à déterminer par télémetrie, l'impact de l'entraînement sur le rythme cardiaque et plus précisément sur la fréquence des arythmies dans notre modèle de rat diabétique traité ou non à l'insuline. Il semble également important de clarifier les effets de l'entraînement intense en endurance sur la fonction myocardique liés aux récepteurs  $\beta$ 3-AR. Le but de cette étude serait de déterminer, sur cœur isolé perfusé avec un agoniste (BRL 37344) ou un antagoniste (SR 59230A) sélectifs des  $\beta$ 3-AR, le rôle fonctionnel de ces récepteurs  $\beta$ 3-AR chez des animaux diabétiques entraînés ou non. Parallèlement, en utilisant des inhibiteurs ou des donneurs de NO, il serait également possible de mieux appréhender le rôle de cet intermédiaire important de la signalisation  $\beta$ 3-AR. Dans ce sens, il serait également enrichissant d'étudier plus précisément la cascade de signalisation liée aux récepteurs  $\beta$ 3-AR afin de déterminer si des variations de transduction du signal sont dues à des changements d'activité post-récepteurs (au niveau de la protéine G, des protéines kinases, des seconds messagers (NO, GMPc, AMPc), ou des effecteurs finaux comme les canaux calciques liés au diabète et/ou à l'entraînement. Ceci a d'ailleurs été amorcé dans le cadre de notre étude 3 puisque la NOs1 est un élément important dans la signalisation intracellulaire induite par la stimulation  $\beta$ 3-AR. En effet, par l'intermédiaire du NO qu'elle produit, la NOs1 module l'activité de plusieurs canaux calciques impliqués dans le couplage excitation-contraction. Du fait de sa localisation au niveau du RS, la NOs1 joue un rôle fondamental dans la régulation de RyR2 et donc de la contractilité (Xu et coll. 1998).



### **3. NITROSYLATION ET PHOSPHORYLATION DE LA PROTEINE RYR2 AU COURS DE LA CARDIOMYOPATHIE DIABETIQUE : IMPACT DE L'ENTRAÎNEMENT**

Le NO est reconnu comme un important régulateur de la contractilité cardiaque. En effet, il interagit avec les protéines régulatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  impliquées dans le couplage excitation-contraction par l'intermédiaire d'au moins 2 voies de signalisation : une voie GMPc-dépendante et l'autre voie GMPc-indépendante via des nitrosylations. Pour accomplir cette régulation, différentes isoformes de NOs sont spatialement confinées dans des microdomaines cellulaires impliqués dans le couplage excitation-contraction. Plus spécifiquement, la NOs1 (NOs neuronale) est localisée au niveau du RS à proximité des protéines RyR2 et SERCA2 et la NOs3 (NOs endothéliale) est localisée au niveau de la caveole sarcolemmale où elle est compartimentalisée avec les récepteurs membranaires (notamment les  $\beta$ -AR) et avec les canaux calciques de type L. Ainsi, dans des conditions physiologiques, la NOs1 localisée au niveau du RS participe à la S-nitrosylation de RyR2 favorisant ainsi la libération systolique de  $\text{Ca}^{2+}$  et la contractilité (Xu et coll. 1998). Cependant, la NOs1 apparaît co-localisée avec la xanthine oxydo-reductase (XOR) au niveau du RS, suggérant alors une interaction protéine-protéine (Khan et coll. 2004). La XOR, une enzyme impliquée dans le métabolisme des purines et constituant une source importante d'anions superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), joue un rôle essentiel dans le système cardiovasculaire. L'activité de la XOR est connue pour être augmentée dans la cardiomyopathie diabétique (Desco et coll. 2002), induisant alors un stress oxydant (SO) et des dysfonctions myocardiques. Khan et coll. (2004) ont démontré qu'une déficience en NOs1 stimule la production d' $\text{O}_2^-$  médiée par la XOR sans qu'il y ait pour autant une augmentation de l'expression de la protéine (protéine et ARNm). Ils ont alors conclu que la NOs1 cardiaque de part sa production de NO a pour rôle d'exercer une inhibition tonique sur la XOR, afin de protéger le coeur contre des dépressions de la fonction contractile liées à un SO. Cependant, dans les conditions pathologiques telles que la cardiomyopathie diabétique et l'insuffisance cardiaque (Damy et coll. 2004, Bendall et coll. 2004, Amour et coll. 2007), il se produit une augmentation de l'expression de la NOs1 associée à une translocation de cette protéine du RS vers le SL où elle va interagir avec la cavéoline-3 et moduler l'activité des canaux calciques de type L. De plus, la translocation de la NOs1 vers le SL a également pour effet de réduire le NO produit au niveau du complexe RyR2.

Ceci va avoir pour conséquence, d'une part d'induire une hyponitrosylation de RyR2 (Gonzalez et coll. 2007) et d'autre part de diminuer la disponibilité du NO nécessaire pour neutraliser l' $O_2^-$  produit par la XOR (Xu et coll. 1998). Ces adaptations vont alors conduire à une oxydation de RyR2 qui déclenche une activation irréversible de la protéine et des fuites calciques diastoliques (Gonzalez et coll. 2007). Ces fuites peuvent favoriser l'apparition de perturbations électriques et donc d'arythmies.

Nous avons montré qu'avec le traitement à l'insuline, l'entraînement, ou les deux combinés, l'expression de la protéine NOs1 est diminuée si bien que les cœurs des rats diabétiques présentent paradoxalement moins de NOs1 que ceux des animaux contrôles. Cette déficience en NOs1 induite par le traitement à l'insuline et/ou l'entraînement pourrait altérer l'activité de RyR2 du fait d'une hyponitrosylation et d'une augmentation de l'oxydation du canal. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer le degré de S-nitrosylation et d'oxydation du canal calcique par spectrométrie de masse. De plus, au cours des expérimentations sur cœur isolé perfusé, un inhibiteur de la xanthine oxydase (l'allopurinol) a été injecté. Le traitement des données est actuellement en cours par Ludivine Malardé, étudiante en 3<sup>ème</sup> année de thèse, au sein du laboratoire. Ces données devraient déjà nous donner des informations quant à l'implication de la XOR sur la fonction myocardique des animaux diabétiques traités ou non à l'insuline et entraînés ou non.

Curieusement, si le traitement bi-dimensionnel ne parvient pas à corriger la déficience en NOs1 chez les rats diabétiques, il induit tout de même une amélioration de la contractilité. Si les mécanismes responsables sont certainement multiples, des modifications du confinement spatial de la NOs1 suite au traitement bi-dimensionnel pourraient être impliquées (Bendall et coll. 2004). Selon ces auteurs, le fait que la NOs1 soit spatialement confinée a des conséquences sur les effecteurs avec lesquels elle interagit et notamment sur le RyR2. En effet, la spécificité de la voie de signalisation impliquant le NO découle d'interactions spécifiques protéine-protéine entre la NOs1 et ses effecteurs, et de l'activation localisée de ces derniers (SL, RS). Selon cette théorie, une répartition différentielle des NOs1 entre le SL et le RS sous l'effet combiné de l'insuline et de l'entraînement peut être envisagée dans les cardiomyocytes de rats diabétiques. Ainsi, une diminution du nombre de complexe NOs1-cav3 au niveau du SL associée en parallèle à une augmentation des complexes NOs1-RyR2 pourrait jouer un rôle fondamental dans

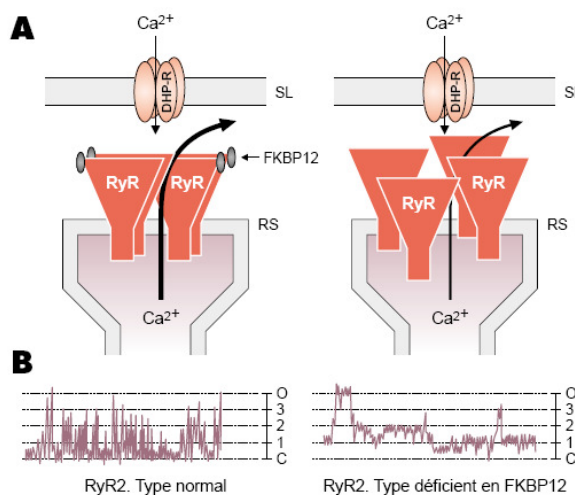
l'amélioration de la contractilité suite au traitement bi-dimensionnel. Une diminution de la NOs1 au niveau de la caveole sarcolemmale pourrait donc être responsable d'une activation contrôlée des canaux calciques de type L et donc d'une amélioration de la contractilité, du fait d'une moindre production de NO. Parallèlement à cette diminution de la NOs1 au niveau du SL, une augmentation d'activité de la NOs1 au niveau du RS pourrait également contribuer à l'amélioration de la contractilité en modifiant positivement l'activité du RyR2. Pour vérifier cette hypothèse, une étude tissulaire est actuellement en cours. Elle devrait nous apporter des données complémentaires quant à la localisation cellulaire de la protéine NOs1 et à sa colocalisation avec RyR2.

Parallèlement à la NOs1, la NOs3 est également exprimée au niveau cardiaque. Dans le ventricule de furet sain, il a été démontré que l'expression de la NOs1 est approximativement inverse à celle de la NOs3 (Brahmajothi et coll. 1999). Cette contre-régulation chez l'animal sain a également été mise en évidence dans un modèle de rats sénescents après infarctus du myocarde (Damy et coll. 2003). Dans ce modèle, il a été démontré que la surexpression des NOs1 vise à compenser la diminution d'expression et d'activité des NOs3, ceci a été révélé par des concentrations en nitrite similaires ainsi qu'une activité NOs-dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  similaire chez les animaux âgés ayant subi l'infarctus comparés aux animaux sham. Ainsi, l'amélioration de la contractilité chez les rats diabétiques ayant suivi le traitement bi-dimensionnel pourrait s'expliquer en partie par une augmentation de l'expression de la NOs3 visant à contrebalancer la déficience en NOs1. Une augmentation de l'expression et de la fonction de la NOs3 totale et surtout dimérique a d'ailleurs été mise en évidence dans le myocarde de rats diabétiques Goto-Kakizaki entraînés (modèle de diabète de type 2) (Grijalva et coll. 2008). Les auteurs concluent sur le caractère bénéfique de cette adaptation qui permet de réduire le SO lié au diabète et en conséquence de limiter les complications cardiovasculaires associées. En effet, la forme dimérique de la NOs3 est responsable de la synthèse de NO alors que la forme monomérique est responsable de la production d' $\text{O}_2^-$ . De plus, si la surexpression de la NOs3 permet de réduire le SO lié au diabète, Wang et coll. (2008) ont également démontré que la NOs3 permet de limiter la survenue d'arythmies liée à une activation sympathique élevée. Selon ces auteurs, la signalisation de la NOs3 passerait par une modulation du courant calcique de type L visant à protéger le myocarde contre l'activation  $\beta$ -AR « toxique ». La NOs3 agirait donc comme un  $\beta$ -bloquant endogène. Grâce à ses

effets anti-oxydant, anti-adrénergique et anti-arythmique, il est possible que la NOs3 soit surexprimée chez les rats diabétiques ayant suivi le traitement bi-dimensionnel ce qui aurait alors un effet positif sur la fonction cardiaque. Une analyse Western Blot du niveau d'expression de la protéine NOs3 (forme totale et dimérique) permettrait simplement de tester cette hypothèse.

Il semble également important de souligner le fait que le NO peut moduler l'activité calcique et donc l'activité de la protéine RyR2 en réponse à une stimulation  $\beta$ -AR via un effet indirect sur le niveau d'activation de la PKA (Ziolo et coll. 2008). En effet, à des niveaux faibles d'activation de la PKA, le NO a un effet inotrope positif en augmentant les réponses à la stimulation  $\beta$ -AR via une augmentation des étincelles calciques (index de l'activité de la RyR2). A l'inverse, lorsque l'activation de la PKA est élevée, comme cela peut être le cas dans notre modèle de rat diabétique, le NO diminue les étincelles calciques et donc les réponses  $\beta$ -AR. Cet effet dual du NO pourrait donc en partie expliquer la diminution de sensibilité à la stimulation  $\beta$ -AR observée chez nos animaux diabétiques entraînés. En effet, selon Zouhal et coll. (2008), notre entraînement a pu générer un état hyperadrénergique ce qui est d'ailleurs suggéré par la diminution d'expression des récepteurs  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-AR chez nos animaux diabétiques entraînés. Face à l'activation importante de la PKA résultant de cet état hyperadrénergique, il est donc probable que la diminution de sensibilité  $\beta$ -AR constitue un mécanisme protecteur impliquant la voie du NO visant à protéger le cœur des animaux diabétiques entraînés contre le risque d'arythmie. Là encore une étude visant à évaluer l'effet anti-arythmogénique de notre modèle serait intéressant.

Au vu de ces données, il est également primordial d'étudier la voie de signalisation impliquant la PKA et de déterminer son action sur ses effecteurs en particulier le RyR2 dans le cadre d'un traitement bi-dimensionnel chez les rats diabétiques. En effet, l'intégrité fonctionnelle du RyR2 est fortement influencée par son niveau de phosphorylation PKA-dépendante et sa liaison avec sa protéine régulatrice FKBP12.6 (**Figure 11**).



**Figure 11 :** Rôle possible de FKBP12.6 sur l'organisation (A) et l'activité (B) du RyR2 dans le couplage excitation-contraction.

A. En présence de FKBP12.6, le tétramère de RyR2 serait stabilisé, conférant une activité maximum au canal avec un état de conductance maximum (O) et un temps d'ouverture prolongé. En l'absence de FKBP12, l'organisation du tétramère deviendrait plus instable et l'activité du canal varierait : états intermédiaires de conductance (1, 2, 3) et temps d'ouverture réduits (adapté de Marks 1997). B. Analyse par voltage-clamp de l'activité du canal RyR2 de souris de type normal ou déficientes en FKBP12.6. L'activité est mesurée après reconstitution dans des bicouches lipidiques. SL: sarcolemme; RS : réticulum sarcoplasmique; RyR : récepteur de la ryanodine (canal calcique du réticulum)

(tiré de *médecine/sciences* 1998)

Dans des conditions physiologiques, la phosphorylation PKA-dépendante de RyR2 induit une dissociation d'un FKBP12.6 du complexe, augmentant alors la sensibilité de RyR2 à l'activation calcique ainsi que la probabilité d'ouverture du canal. Il en résulte une augmentation de la libération systolique de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS et une augmentation de la contractilité (Marx et coll. 2000). Néanmoins, ces auteurs ont montré que dans les cœurs défaillants, l'hyperphosphorylation PKA-dépendante de RyR2 altère la fonction canal du fait d'une déplétion en unités régulatrices FKBP12.6 à proximité. Le défaut de stabilisation de RyR2 en résultant altère l'ouverture du canal, induit des fuites diastoliques de  $\text{Ca}^{2+}$ , une diminution des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS et donc une diminution de la contractilité. Il est donc important de définir l'impact du traitement bi-dimensionnel à la fois sur l'activation de la

PKA, sur le niveau de phosphorylation du RyR2 et sur son couplage avec la protéine FKBP12.6.

Notre étude d'immuno-fluorescence actuellement en cours devrait déjà nous donner certaines indications quant à la colocalisation de RyR2 avec sa protéine stabilisante FKBP12.6. Il serait également intéressant de compléter ces données en réalisant des études de co-immunoprécipitation entre RyR2 et FKBP12.6 en fonction de l'activation de la PKA. Il serait donc envisageable de co-immunoprécipiter RyR2 avec FKBP12.6 afin de déterminer si le niveau de phosphorylation par la PKA dépendant du statut de l'animal a un effet sur la fixation de FKBP12.6 à RyR2. Les sites de fixation de FKBP12.6 pouvant être identifiés par double hybride.

Le niveau de phosphorylation jouant sur la stabilité du complexe et donc sur la probabilité d'ouverture du canal RyR2, il est également important de déterminer l'état de phosphorylation du RyR2 et ses conséquences sur la probabilité d'ouverture du canal calcique. Actuellement, nous n'avons pas encore pu déterminer le contenu phosphorylé de la protéine RyR2, faute d'avoir un anticorps anti-phospho-RyR2 efficace. Par ailleurs, nous avons pris contact avec le Dr Benoît-Gilles Kerfant (Inserm UMR-915, Nantes) afin de nous initier à la technique de cardiomyocytes isolés permettant d'étudier les flux calciques dans notre modèle.

**Tout au long de cette discussion, nous avons suggéré que les adaptations induites par l'entraînement pourraient constituer un mécanisme protecteur visant à protéger du risque d'arythmie le cœur des animaux diabétiques entraînés. Ainsi, même si l'entraînement, combiné ou non au traitement à l'insuline, n'a pas permis de restaurer la fonction myocardique, l'effet anti-arythmogène potentiel de notre modèle ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes dans le cadre de pathologies comme la cardiomyopathie diabétique.**

*Toute avancée des connaissances génère autant d'interrogations qu'elle apporte de réponses.*

*Pierre Joliot*

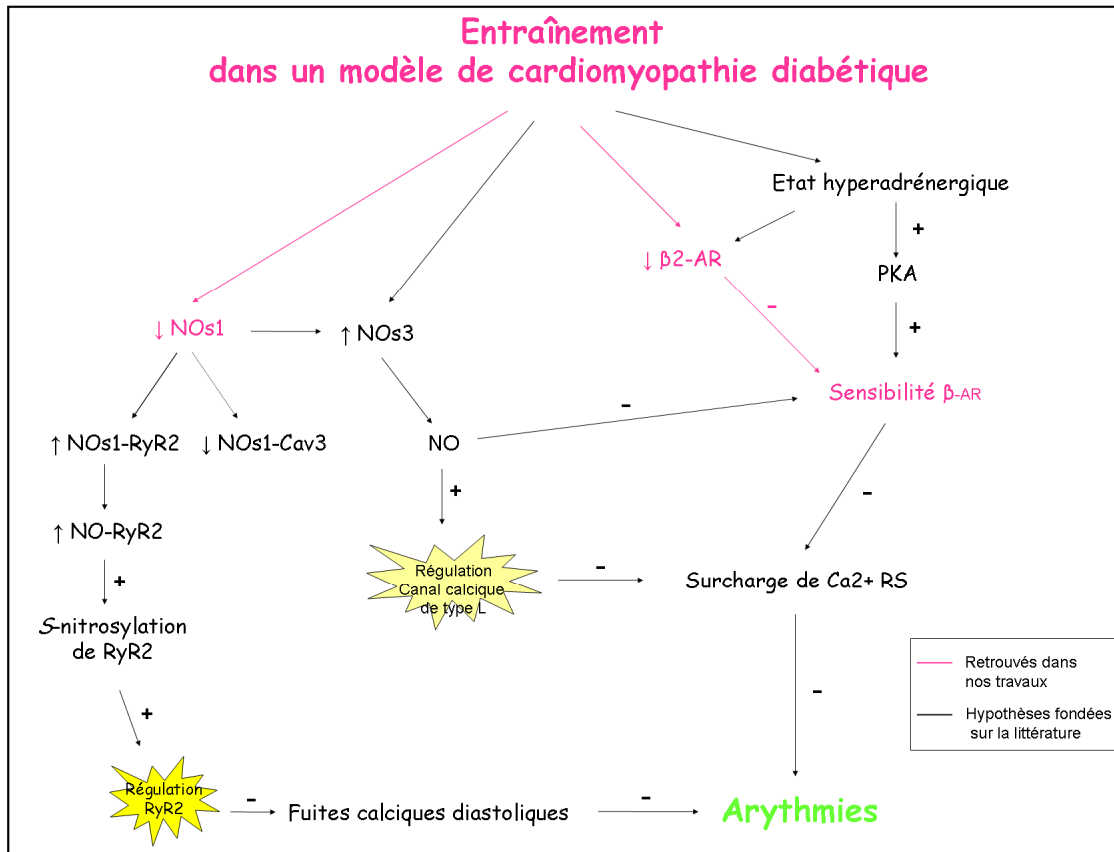


Figure 12: Modèle théorique hypothétique des mécanismes cellulaires et moléculaires susceptibles d'expliquer un effet anti-arythmogène de l'entraînement en endurance dans le cadre de la cardiomyopathie diabétique.





## ***APPORTS AU DOMAINE***

---

Nous avons pu mettre en évidence l'importance d'un programme d'entraînement adapté dans la prise en charge thérapeutique du diabète, pour induire les effets bénéfiques escomptés sur la fonction myocardique. Il faut alors ajouter que l'activité physique adaptée (APA) relève d'un intérêt particulier dans le domaine des STAPS dans lequel la composante « activité physique adaptée et santé » prend une place de plus en plus importante. Les études développées dans le cadre de cette thèse permettent d'identifier les effets respectifs et combinés d'un traitement à l'insuline et d'un entraînement en endurance sur la fonction myocardique au cours de la cardiomyopathie diabétique. Le diabète et plus largement les maladies métaboliques constituent une problématique récurrente dans le domaine des APA. Cependant, les programmes d'entraînement mis en place pour les populations présentant des troubles métaboliques tels que le diabète sont encore trop souvent calqués sur ceux des personnes saines sans connaître les impacts physiologiques sur ces organismes particuliers. Bien que les résultats obtenus chez l'animal ne soient pas directement transférables à l'homme, ces travaux de thèse apportent de nouveaux éléments dans la connaissance et la compréhension des impacts physiologiques de l'entraînement sur la fonction myocardique au cours de cette maladie métabolique qu'est le diabète. L'utilisation des résultats de cette thèse, associée à des études futures chez l'homme, peut donc être envisagée dans le cadre de la conception, la conduite et l'évaluation de programmes de prévention et de réadaptation par l'APA auprès de personnes présentant des troubles métaboliques. En collaboration avec le secteur médical et les professionnels des APA, ces travaux pourraient servir à élaborer un outil à destination des entraîneurs intervenants auprès de personnes présentant des troubles métaboliques. Cet outil viserait à proposer aux entraîneurs des orientations fondées scientifiquement pour les aider dans l'élaboration des programmes d'entraînement adaptés aux caractéristiques de la population pathologique.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

**Acar G**, Akcay A, Sokmen A, Ozkaya M, Guler E, Sokmen G, Kaya H, Nacar AB, Tuncer C (2009) Assessment of atrial electromechanical delay, diastolic functions, and left atrial mechanical functions in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Am Soc Echocardiogr* 22(6):732-8.

**Ai X**, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005)  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak in heart failure. *Circ Res* 97: 1314-22.

**Akiyama N**, Okumura K, Watanabe Y, Hashimoto H, Ito T, Ogawa K, Satake T (1989) Altered acetylcholine and norepinephrine concentrations in diabetic rat hearts. Role of parasympathetic nervous system in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 38: 231-236.

**Altan VM**, Arioglu E, Guner S, Ozcelikay AT (2007) The influence of diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes. *Heart Fail Rev* 12(1):58-65.

**Altszuler N**, Steele R, Rathgeb I, De Bodo RC (1967) Glucose metabolism and plasma insulin level during epinephrine infusion in the dog. *Am J Physiol* 212(3):677-82.

**Ambepityia G**, Kopelman PG, Ingram D, Swash M, Mills PG, Timmis AD (1990) Exertional myocardial ischemia in diabetes: a quantitative analysis of anginal perceptual threshold and the influence of autonomic function. *J Am Coll Cardiol* 15(1):72-7.

**Amour J**, Loyer X, Le Guen M, Mabrouk N, David JS, Camors E, Carusio N, Vivien B, Andriantsitohaina R, Heymes C, Riou B (2007) Altered contractile response due to increased beta3-adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: the role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology* 107(3):452-60.

**Anversa P**, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J (1998) Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 3:8-12.

**Anversa P**, Leri A, Beltrami CA, Guerra S, Kajstura J (1998) Myocyte death and growth in the failing heart. *Lab Invest* 78(7):767-86.

**Arai M**, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 74(4):555-64.

**Asano T**, Kamiya N, Semba R, Kato K (1988) Ontogeny of the GTP-binding protein Go in rat brain and heart. *J Neurochem* 51(6):1711-6.

**Atkins FL**, Dowell RT, Love S (1985)  $\beta$ -adrenergic receptors, adenylate cyclase activity, and cardiac dysfunction in the diabetic rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 7: 66-70.

- Balshaw D**, Gao L, Meissner G (1999) Luminal loop of the ryanodine receptor: a pore-forming segment? *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7):3345-7.
- Barbier J**, Rannou-Bekono F, Marchais J, Berthon PM, Delamarche P, Carré F (2004) Effect of training on  $\beta_1$   $\beta_2$   $\beta_3$  adrenergic and M2 muscarinic receptors in rats heart. *Med Sci Sports Exerc* 36(6): 949-54.
- Battista AF**, Goldstein M, Freedman LS, Campbell JB, Ransohoff J, Roffman M (1973) Dopamine-beta-hydroxylase in experimental spinal cord injury. *Trans Am Neurol Assoc* 98:255-6.
- Baynes JW** (2003) Chemical modification of proteins by lipids in diabetes. *Clin Chem Lab Med* 41(9):1159-65.
- Bendall JK**, Damy T, Ratajczak P, Loyer X, Monceau V, Marty I, Milliez P, Robidel E, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2004) Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. *Circulation* 110(16):2368-75.
- Berger M**, Berchtold P (1979) The role of physical exercise and training in the management of diabetes mellitus. *Bibl Nutr Dieta* (27):41-54.
- Bergh CH**, Hjalmarson A, Sjögren KG, Jacobsson B (1988) The effect of diabetes on phosphatidylinositol turnover and calcium influx in myocardium. *Horm Metab Res* 20(7):381-6.
- Berkowitz BA**, Head R, Joh T and Hempstead J (1980) Experimental diabetes: alterations in circulating dopamine- $\beta$ -hydroxylase and norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 213 (1): 18-23.
- Berlin I**, Grimaldi A, Bosquet F and Puech AJ (1986) Decreased  $\beta$ -adrenergic sensitivity in insulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 63(1): 262-265.
- Bers DM** (2000) Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* 87(4):275-81.
- Bers DM** (2002) Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Front Biosci* 7:d1697-711.
- Bers DM** (2004) Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 37(2):417-29.
- Bidasee KR**, Dincer ÜD, Besch HR (2001) Ryanodine receptor dysfunction in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Pharmacol* 60(6): 1356-1364.

**Bidasee KR**, Nallani K, Yu Yongqi, Cocklin RR, Zhang Y, Wang M, Dincer ÜD, Besch HR (2003a) Chronic Diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium release channels. *Diabetes*. 52: 1825-1836.

**Bidasee KR**, Nallani K, Besch HR, Dincer ÜD (2003b) Streptozotocin-induced diabetes increases disulfite bond formation on cardiac ryanodine receptor (RyR2). *J Pharmacol Exp Ther* 305: 989-998.

**Bidasee KR**, Nallani K, Henry B, Dincer D, Besch HR (2003c) Chronic diabetes alters function and expression of ryanodine receptor calcium-release channels in rat hearts. *Mol Cell Biochem* 249: 113-123.

**Bidasee KR**, Zhang Y, Shao CH, Wang M, Patel KP, Dincer ÜD, Besch HR (2004) Diabetes increases formation of advanced glycation end products on sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Diabetes* 53: 463-473.

**Bidasee KR**, Zheng H, Shao CH, Parbhu SK, Rozanski GJ, Patel KP (2008) Exercise training initiated after the onset of diabetes preserves myocardial function: effects on expression of  $\beta$ -adrenoceptors. *J Appl Physiol* 105(3):907-14.

**Billman GE**, Kukielka M, Kelley R, Moustafa-Bayoumi M, Altschuld RA (2006) Endurance exercise training attenuates cardiac  $\beta_2$ -adrenoceptor responsiveness and prevents ventricular fibrillation in animals susceptible to sudden death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H2590-H2599.

**Booth FW**, Thomason DB (1991) Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* 71(2):541-85.

**Bouchard RA**, Bose D (1991) Influence of experimental diabetes on sarcoplasmic reticulum function in rat ventricular muscle. *Am J Physiol* 260: H341-H354.

**Bracken NK**, Woodall AJ, Howarth FC, Singh J (2004) Voltage-dependence of contraction in streptozotocin-induced diabetic myocytes. *Mol Cell Biochem* 261: 235-243.

**Brahmajothi MV**, Campbell DL (1999) Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart : implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circ Res* 85(7):575-87.

**Broderick TL**, St-Laurent R, Rousseau-Migneron S, Tancrede G, Nadeau A (1990) Beneficial effect of exercise training on cardiac long-chain acylcarnitine levels in diabetic rats. *Diabetes Res* 14: 33-36.

**Broderick TL**, Poirier P, Gillis M (2005) Exercise training restores abnormal myocardial glucose utilization and cardiac function in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 21: 44-50.

**Buijs JOD**, Miklos Z, Van Riel NAW, Prestia CM, Szenczi O, Toth A, Van der Vusse GJ, Szabo C, Ligeti L, Ivanics T (2005)  $\beta$ -adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes. *Life Sciences* 76: 1083-1098.

**Burkard N**, Rokita AG, Kaufmann SG, Hallhuber M, Wu R, Hu K, Hofmann U, Bonz A, Frantz S, Cartwright EJ, Neyses L, Maier LS, Maier SK, Renné T, Schuh K, Ritter O (2007) Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. *Circ Res* 100(3):e32-44.

**Bushfield M**, Griffiths SL, Murphy G, Pyne NJ, Knowler JT, Milligan G, Parker PT, Mollner S, Houslay MD (1990) Diabetes-induced alterations in the expression, functioning and phosphorylation state of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi-2 in hepatocytes. *Biochem J* 271: 365-372.

**Cai L**, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ (2002) Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 51(6):1938-48.

**Cannell MB**, Cheng H, Lederer WJ (1994) Spatial non-uniformities in  $[Ca^{2+}]_i$  during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Biophys J* 67(5):1942-56.

**Carré F** (2006) What is the athlete's heart? *Arch Mal Coeur Vaiss* 99(11):951-4.

**Carroll JF**, Thaden JJ, Wright AM (2005) A comparison of two exercise training programs on cardiac responsiveness to  $\beta$ -stimulation in obesity. *Exp Biol Med* 230: 180-188.

**Catterall WA** (2000) Structure and regulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-55.

**Carter S**, Colyer J, Sitsapesan R (2006) Maximum phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine-2809 by protein kinase a produces unique modifications to channel gating and conductance not observed at lower levels of phosphorylation. *Circ Res* 98(12):1506-13.

**Chattou S**, Diacono J, Feuvray D (1999) Decrease in sodium-calcium exchange and calcium currents in diabetic rat ventricular myocytes. *Acta Physiol Scand* 166: 137-144.

**Chen V**, Ianuzzo CD, Fong BC, Spitzer JJ (1984) The effects of acute and chronic diabetes on myocardial metabolism in rats. *Diabetes* 33(11):1078-84.

**Cheng H**, Lederer WJ, Cannell MB (1993) Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 1993 Oct 29;262(5134):740-4.

**Cheng H**, Lederer MR, Xiao RP, Gómez AM, Zhou YY, Ziman B, Spurgeon H, Lakatta EG, Lederer WJ (1996) Excitation-contraction coupling in heart: new insights from Ca<sup>2+</sup> sparks. *Cell Calcium* 20(2):129-40.

**Cheng HJ**, Zhang ZS, Onishi K, Ukai T, Sane DC, Cheng CP (2001) Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ Res* 89(7):599-606.

**Choi KM**, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, Guatimosim S, Lederer WJ, Matlib MA (2002) Defective intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 283: H1398-1408.

**Christensen NJ** (1972) Plasma catecholamines in long-term diabetics with and without neuropathy and in hypophysectomized subjects. *J Clin Invest* 51(4):779-87.

**Christensen NJ** (1973) Plasma epinephrine and plasma norepinephrine concentrations in early diabetes. *Adv Metab Disord* 2:Suppl 2:227-34.

**Christensen NJ** (1974) Plasma norepinephrine and epinephrine in untreated diabetics, during fasting and after insulin administration. *Diabetes* 23(1):1-8.

**Christensen NJ**, Galbo H, Hansen JF, Hesse B, Richter EA, Trap-Jensen J (1979) Catecholamines and exercise. *Diabetes* 28 Suppl 1:58-62.

**Clarke DM**, Loo TW, Inesi G, MacLennan DH (1989) Location of high affinity Ca<sup>2+</sup>-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Nature* 339(6224):476-8.

**Dall'Ago P**, Fernandes TG, Machado UF, Belló AA, Irigoyen MC (1997) Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 30(1):119-24.

**Damy T**, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2004) Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 363(9418):1365-7.



**Danson EJ**, Paterson DJ (2003) Enhanced neuronal nitric oxide synthase expression is central to cardiac vagal phenotype in exercise-trained mice. *J Physiol* 546(Pt 1):225-32.

**Davidoff AJ**, Pinault FM, Rodgers RL (1990) Ventricular relaxation of diabetic spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 15(6 Pt 1):643-51.

**Davis BA**, Schwartz A, Samaha FJ, Kranias EG (1983) Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 258(22):13587-91.

**De Angelis KLD**, Oliveira AR, Dall Ago P, Peixoto LRA, Gadonski G, Lacchini S, Fernandes TG, Erigoyen MC (2000) Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian J Med Biol Res* 33: 635-641.

**De Angelis KLD**, Schaan BD, Macda CY, Dall Ago P, Wichi RB, Erigoyen MC (2002) Cardiovascular control in experimental diabetes. *Brazilian J Med Biol Res* 35: 1091-1100.

**De Angelis K**, Wichi RB, Moreira ED, Morris M, Krieger E, Irigoyen MC (2004) Exercise training changes autonomic cardiovascular control balance in mice. *J Appl Physiol* 96(6): 2174-2178.

**DeBlieux PMC**, Barbee RW, McDonough KH, Shepherd RE (1993) Exercise training improves cardiac performance in diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 203(2): 209-213.

**De Lean A**, Stadel JM, Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255(15):7108-17.

**Depre C**, Young ME, Ying J, Ahuja HS, Han Q, Garza N, Davies PJA, Taegtmeyer H (2000) Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 32: 985-996.

**DeSantiago J**, Ai X, Islam M, Acuna G, Ziolo MT, Bers, Pogwizd SM (2008) Arrhythmogenic Effects of  $\beta$ 2-Adrenergic stimulation in the failing heart are attributable to enhanced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> load. *Circ Res* 102:1389-1397.

**Desco MC**, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV, Sastre J, Viña J (2002) Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes* 51(4):1118-24.

---

**Dinçer UD**, Bidasee KR, Güner S, Tay A, Özçelikay T, Altan MV (2001) The effect of diabetes on expression of  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-, and  $\beta$ 3-adrenoreceptors in rats hearts. *Diabetes* 50: 455-461.

**Dinçer UD**, Güner S, Tay A, Arioglu E, Tasdelen A, Aslamaci S, Bidasee KR (2003) Decreased expression of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptors in huma diabetic atrial appendage. *Cardiovasc diabetol* 20: 2-6.

**Dhalla NS**, Pierce GN, Innes IR, Beamish RE (1985) Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can J Cardiol* 1985 1(4):263-81.

**Dutta K**, Carmody MW, Cala SE, Davidoff AJ (2002) Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 34: 985-996.

**Eckberg DL**, Harkins SW, Fritsch JM, Musgrave GE, Gardner DF (1986) Baroreflex control of plasma norepinephrine and heart period in healthy subjects and diabetic patients. *J Clin Invest* 78(2):366-74.

**Eckel J**, Reinauer H (1990) Insulin action on glucose transport in isolated cardiac myocytes: signalling pathways and diabetes-induced alterations. *Biochem Soc Trans*18(6):1125-7.

**Ewing DJ**, Campbell IW, Clarke BF (1980) Assessment of cardiovascular effects in diabetic autonomic neuropathy and prognostic implications. *Ann Intern Med* 92(2 Pt 2):308-11.

**Ewing DJ**, Campbell IW, Clarke BF. Heart rate changes in diabetes mellitus. *Lancet*. 1981 Jan 24;1(8213):183-6.

**Fabiato A**, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249(3):469-95.

**Fabiato A**, Fabiato F (1978) Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann N Y Acad Sci* 307:491-522.

**Fabiato A** (1982) Calcium release in skinned cardiac cells: variations with species, tissues, and development. *Fed Proc* 41(7):2238-44.

**Fabiato A** (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245 (Cell Physiol 14): C1-C14.

---

**Fallow GD**, Singh J (2004) The prevalence, type and severity of cardiovascular disease in diabetic and non-diabetic patients: a matched-paired retrospective analysis using coronary angiography as the diagnostic tool. *Mol Cell Biochem* 261(1-2): 263-9.

**Fang ZY**, Prins JB, Marwick TH (2004) Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev* 25(4):543-67.

**Fein FS**, Kornstein LB, Strobeck JE, Capasso JM, Sonnenblick EH (1980) Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ Res* 47: 922-933.

**Fein FS**, Aronson RS, Nordin C, Miller-Green B, Sonnenblick (1983) Altered myocardial response to ouabain in diabetic rats: mechanics and electrophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 15(11): 769-784.

**Feuvray D**, Idell-Wenger JA, Neely JR (1979) Effects of ischemia on rat myocardial function and metabolism in diabetes. *Circ Res* 44: 322-329.

**Fischer VW**, Leskiw ML, Barner HB (1981) Myocardial structure and capillary basal laminar thickness in experimentally diabetic rats. *Exp Mol Pathol* 35(2):244-56.

**Flaim KE**, Kochel PC, Kira Y, Kobayashi K, Fossel ET, Jefferson LS (1983) Insulin effects on protein synthesis are independent of glucose and energy metabolism. *Am J Physiol* 245: C133-143.

**Foster KA**, McDermott PJ, Robishaw JD (1990) Expression of G proteins in rat cardiac myocytes: effect of KCl depolarization. *Am J Physiol* 259(2 Pt 2):H432-41.

**Franzini-Armstrong C**, Protasi F, Tijssens P (2005) The assembly of calcium release units in cardiac muscle. *Ann N Y Acad Sci* 1047:76-85.

**Fredersdorf S**, Thumann C, Ulucan C, Griese DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J (2004) Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol* 13(1):11-9.

**Frustaci A**, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B, Anversa P (2000) Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 87(12):1123-32.

**Fushimi H**, Inoue T, Kishino B, Nishikawa M, Tochino Y, Funakawa S, Yamatodani A, Wada H (1984) Abnormalities in plasma catecholamine response and tissue catecholamine accumulation in streptozotocin diabetic rats: a possible role for diabetic autonomic neuropathy. *Life Sciences* 35(10): 1077-1081.

**Galbo H**, Richter EA, Holst JJ, Christensen NJ (1977) Diminished hormonal responses to exercise in trained rats. *J Appl Physiol* 43(6):953-8.

**Gando S**, Hattori Y, Akaishi Y, Nishihira J, Kanno M (1997) Impaired contractile response to beta adrenoceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in beta adrenoceptors-G protein-adenylate cyclase system and phospholamban phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 475-484.

**Ganguly PK**, Pierce GN, Dhalla KS, Dhalla NS (1983) Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 244: E528-535.

**Ganguly PK**, Dhalla KS, Innes IR, Beamish RE, Dhalla NS (1986) Altered norepinephrine turnover and metabolism in diabetic cardiomyopathy. *Circ Res* 59(6): 684-693.

**Ganguly PK**, Beamish RE, Dhalla KS, Innes IR and Dhalla NS (1987) Norepinephrine storage, distribution, and release in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 252: E 734-739.

**Garvey WT**, Hardin D, Juhaszova M, Dominguez JH (1993) Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rat: implications for diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 264: H837-844.

**Gauthier C**, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H (1996) Functional  $\beta_3$ -adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 98: 556-62.

**Gauthier C**, Langin D, Balligand JL (2000)  $\beta_3$ -adrenoceptors in the cardiovascular system. *TiPS* 21: 426-430.

**Gawler D**, Milligan G, Spiegel AM, Unson CG and Houslay MD (1987) Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein  $G_i$  activity in diabetes. *Nature* 327 (21): 229-232.

**Golfman LS**, Takeda N and Dhalla NS (1996) Cardiac membrane  $Ca^{2+}$ -transport in alloxan-induced diabetes in rats. *Diabetes Res Clin Pract* 31 suppl.: S73-77.

**Golfman L**, Dixon IMC, Takeda N, Lukas A, Dakshinamurti K, Dhalla NS (1998) Cardiac sarcolemmal  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchange and  $Na^+$ - $K^+$  ATPase activities and gene expression in alloxan-induced diabetes in rats. *Mol Cell Biochem* 188: 91-101.

**Golfman L**, Dixon IMC, Takeda N, Chapman D, Dhalla NS (1999) Differential changes in cardiac myofibrillar and sarcoplasmic reticular gene expression in alloxan-induced diabetes. *Mol Cell Biochem* 200: 15-25.

**Gonzalez DR**, Beigi F, Treuer AV, Hare JM (2007) Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51):20612-7.

---

**Gordon AM**, Homsher E, Regnier M (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80(2):853-924.

**Goto C**, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I (2003) Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation* 108(5):530-5.

**Gotzsche O** (1983) The adrenergic  $\beta$ -receptor adenylate cyclase system in heart and lymphocytes from streptozotocin-diabetic rats. In vivo and in vitro evidence for a desensitized myocardial  $\beta$ -receptor. *Diabetes* 32: 1110-1116.

**Gratas-Delamarche A**, Heyman E (2006) Effects of type 1 diabetes and of training on physical fitness. *Science & Sports* 21: 57-61.

**Green A**, Johnson JL (1991) Evidence for impaired coupling of receptors to Gi protein in adipocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 40: 88-94.

**Griffiths SL**, Knowler JT, Houslay MD (1990) Diabetes-induced changes in guanine-nucleotide-regulatory-protein mRNA detected using synthetic oligonucleotide probes. *Eur J Biochem* 193: 367-374.

**Grijalva J**, Hicks S, Zhao X, Medikayala S, Kaminski PM, Wolin MS, Edwards JG (2008) Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Cardiovasc Diabetol* 7: 34.

**Guner S**, Arioglu E, Tay A, Tasdelen A, Aslamaci S, Bidasee KR and Dincer UD (2004) Diabetes decreases mRNA levels of calcium-release channels in human atrial appendage. *Mol Cell Biochem* 263: 143-150.

**Ha T**, Kotsanas G, Wendt I (1999) Intracellular  $Ca^{2+}$  and adrenergic responsiveness of cardiac myocytes in streptozotocin-induced diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(4): 347-353.

**Hall JL**, Sexton WL, Stanley W (1995) Exercise training attenuates the reduction in myocardial GLUT-4 in diabetic rats. *J Appl Physiol* 78(1): 76-81.

**Hamby RI**, Zoneraich S, Sherman L (1974) Diabetic cardiomyopathy. *JAMA* 229(13):1749-54.

**Haram PM**, Adams V, Kemi OJ, Brubakk AO, Hambrecht R, Ellingsen O, Wisløff U (2006) Time-course of endothelial adaptation following acute and regular exercise. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 13(4):585-91.

**Hare JM**, Stamler JS (2005) NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest* 115: 509-517.

**Harthmann AD**, De Angelis K, Costa LP, Senador D, Schaan BD, Krieger EM (2007) Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 133: 115-120.

**Hattori Y**, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, Kemmotsu O, Kanno M (2000) Diminished function and expression of the cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in diabetic rats: implication in  $\text{Ca}^{2+}$  overload. *J Physiol* 527: 85-94.

**Haunstetter A**, Izumo S (1998) Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 82(11):1111-29.

**Heller BA**, Paulson DJ, Kopp S, Peace DG, Tow JP (1988) Depressed in vivo myocardial reactivity to dobutamine in streptozotocin diabetic rats: influence of exercise training. *Cardiovasc Research* 22: 417-424.

**Heylen E**, Guerrero F, Mansourati J, Theron M, Thioub S, Saïag B (2008) Effect of training frequency on endothelium-dependent vasorelaxation in rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008 Feb;15(1):52-8.

**Heyliger CE**, Pierce GN, Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS (1982) Cardiac alpha- and beta-adrenergic receptor alterations in diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 77: 610-618.

**Heyman E**, Toutain C, Delamarche P, Berthon P, Briard D, Youssef H, Dekerdanet M, Gratas-Delamarche A (2007) Exercise training and cardiovascular risk factors in type 1 diabetic adolescent girls. *Pediatr Exerc Sci* 19(4):408-19.

**Hicks KK**, Seifen E, Stimers JR, Kennedy RH (1998) Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure and cardiac autonomic nervous control. *J Auton Nerv Syst* 69(1):21-30.

**Hilsted J** (1979) Decreased sympathetic vasomotor tone in diabetic orthostatic hypotension. *Diabetes* 28(11):970-3.

**Hilsted J**, Galbo H, Christensen NJ (1979) Impaired cardiovascular responses to graded exercise in diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes.* 28(4):313-9.

**Horackova H**, Murphy MG (1988) Effects of chronic diabetes mellitus on the electrical and contractile activities,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  transport, fatty acid profiles and ultrastructure of isolated rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 411: 564-572.

---

**Howarth FC**, Almugaddum FA, Qureshi MA, Ljubisavijevic M (2008) Effects of varying intensity exercise on shortening and intracellular calcium in ventricular myocytes from streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2008 Oct;317(1-2):161-7.

**Howarth FC**, Almugaddum FA, Qureshi MA, Ljubisavljevic M (2009) The effects of heavy long-term exercise on ventricular myocyte shortening and intracellular Ca(2+) in streptozotocin-induced diabetic rat. *J Diabetes Complications.*

**Ingebretsen WR**, Peralta C, Monsher M, Wagner LK, Ingebresten CG (1981) Diabetes alters the myocardial cAMP-protein kinase cascade system. *Am J Physiol* 240: H375-382.

**Ingebretsen CG**, Hawelu-Johnson C, Ingebretsen WR (1983) Alloxan-induced diabetes reduces  $\beta$ -adrenergic receptor number without affecting adenylate cyclase in rat ventricular membranes. *J Cardiovasc Pharmacol* 5: 454-461.

**Ishikawa T**, Kajiwara H, Kurihara S (1999) Alterations in contractile properties and Ca<sup>2+</sup> handling in streptozotocin-induced diabetic rat myocardium. *Am J Physiol* 277: H2185-2194.

**Jobidon C**, Nadeau A, Tancrede G, Nguyen MH, Rousseau-Mignerone S (1985) Plasma, adrenal, and heart catecholamines in physically trained normal and diabetic rats. *Diabetes* 34: 532-535.

**Jourdon P**, Feuvray D (1993) Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J Physiol* 470: 411-429.

**Kainulainen H**, Virtanen P, Ruskoaho H, Takala TES (1989) Training increases cardiac glucose uptake during rest and exercise in rats. *Am J Physiol* 257 (Heart Circ Physiol 26): H839-H845.

**Kargacin ME**, Ali Z, Kargacin G (1998) Anti-phospholamban and protein kinase A alter the Ca<sup>2+</sup> sensitivity and maximum velocity of Ca<sup>2+</sup> uptake by the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 331 ( Pt 1):245-9.

**Karliner JS**, Barnes P, Brown M, Dollery C (1980) Chronic heart failure in the guinea pig increases cardiac alpha 1- and beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 67(1):115-8.

**Kashiwagi A**, Nishio Y, Saeki Y, Kida Y, Kodama M, Shigeta Y (1989) Plasma membrane-specific deficiency in cardiac  $\beta$ -adrenergic receptor in streptozocin-diabetic rats. *Am J Physiol* 257: E127-E132.

**Kaul CL**, Grewal RS (1980) Increased urinary excretion of catecholamines and their metabolites in streptozotocin diabetic rat. *Pharmacology* 21: 223-228.

**Khan SA**, Lee K, Minhas KM, Gonzalez DR, Raju SV, Tejani AD, Li D, Berkowitz DE, Hare JM (2004) Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(45):15944-8.

**Kim HW**, Cho YS, Lee HR, Park SY, Kim YH (2001) Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and phospholamban protein expression. *Science Life* 70: 367-379.

**Kiriazis H**, Kranias EG (2000) Genetically engineered models with alterations in cardiac membrane calcium-handling proteins. *Annu Rev Physiol* 2000;62:321-51.

Kofuji P, Hadley RW, Kieval RS, Lederer WJ, Schulze DH (1992) Expression of the Na-Ca exchanger in diverse tissues: a study using the cloned human cardiac Na-Ca exchanger. *Am J Physiol* 263(6 Pt 1):C1241-9.

**Koss KL**, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res.* 1996 Dec;79(6):1059-63.

**Kotsanas G**, Delbridge LMD, Wendt IR (2000) Stimulus interval-dependent differences in  $\text{Ca}^{2+}$  transients and contractile responses of diabetic rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 46: 450-462.

**Kranias EG**, Schwartz A, Jungmann RA (1982) Characterization of cyclic 3',5'-amp-dependent protein kinase in sarcoplasmic reticulum and cytosol of canine myocardium. *Biochim Biophys Acta* 709(1):28-37.

**Kranias EG** (1985) Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by cyclic 3',5'-AMP-dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Feb 21;844(2):193-9.

**Laaksonen DE**, Atalay M, Niskanen LK, Mustonen J, Sen CK, Lakka TA, Uusitupa MI (2000) Aerobic exercise and the lipid profile in type 1 diabetic men: a randomized controlled trial. *Med Sci Sports Exerc* 32(9):1541-8.

**Lagadic-Gossmann D**, Feuvray D (1990) Decreased sensitivity of contraction to changes of intracellular pH in papillary muscle from diabetic rat hearts. *J Physiol* 422:481-97.



**Lagadic-Gossmann D**, Buckler KJ, Le Prigent K and Feuvray D (1996) Altered Ca<sup>2+</sup> handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am J Physiol* 270: H1529-1537.

**Lakatta EG**, Talo A, Capogrossi MC, Spurgeon HA, Stern MD (1992) Spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release leads to heterogeneity of contractile and electrical properties of the heart. *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 2:93-104.

**Latifpour J**, McNeill JH (1984) Cardiac autonomic receptors: effect of long-term experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 230(1): 242-249.

**Lee SL**, Ostadalova I, Kolar F, Dhalla NS (1992) Alterations in Ca<sup>2+</sup>-channels during the development of diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 109(2): 173-179.

**Legaye F**, Beigelman P, Deroubaix E, Coraboeuf E (1988) Effect of 3-5-3'triiodothyronine treatment on cardiac action potential of streptozotocin-induced diabetic rat. *Life Sci* 42: 2269-2274.

**Lehmann R**, Kaplan V, Bingisser R, Bloch KE, Spinass GA (1997) Impact of physical activity on cardiovascular risk factors in IDDM. *Diabetes Care* 20(10):1603-11.

**Lehnart SE**, Wehrens XHT, Kushnir A, Marks AR (2004) Cardiac ryanodine receptor function and regulation in heart disease. *Ann N Y Acad Sci* 1015: 144-159.

**Le Peuch CJ**, Haiech J, Demaille JG (1979) Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry* 18(23):5150-7.

**Li B**, Setoguchi M, Wang X, Andreoli AM, Leri A, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P (1999) Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart. *Circ Res* 84:1007–1019

**Liang BT**, Galper JB (1988) Differential sensitivity of alpha o and alpha i to ADP-ribosylation by pertussis toxin in the intact cultured embryonic chick ventricular myocyte. Relationship to the role of G proteins in the coupling of muscarinic cholinergic receptors to inhibition of adenylate cyclase activity. *Biochem Pharmacol* 37(23):4549-55.

**Ligeti L**, Szenczi O, Prestia CM, Szabo C, Horvath K, Marcsek ZL, Van Stiphout R, Van Riel N, Buijs JOP, Van Der Vusse GJ, Ivanics T (2006) Altered calcium handling is an early sign of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Int J Mol Med* 17: 1035-1043.

---

**Lim G**, Venetucci L, Eisner DA, Casadei B (2008) Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation-contraction coupling. *Cardiovasc Res* 77(2):256-64.

**Limas CJ** (1979) Increased number of beta-adrenergic receptors in the hypertrophied myocardium. *Biochim Biophys Acta* 588(1):174-8.

**Lishner M**, Akselrod S, Avi VM, Oz O, Divon M, Ravid M (1987) Spectral analysis of heart rate fluctuations. A non-invasive, sensitive method for the early diagnosis of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *J Auton Nerv Syst* 19(2):119-25.

**Litwin SE**, Raya TE, Anderson PG, Daugherty S, Goldman S (1990) Abnormal cardiac function in the streptozotocin-diabetic rat. Changes in active and passive properties of the left ventricle. *J Clin Invest* 86: 481-488.

**Liu X**, Takeda N, Dhalla NS (1997) Myosin light-chain phosphorylation in diabetic cardiomyopathy in rats. *Metabolism* 46(1): 71-75.

**Lloyd-Mostyn RH**, Watkins PJ (1975) Defective innervation of heart in diabetic autonomic neuropathy. *Br Med J* 3(5974):15-7.

**Loganathan R**, Bilgen M, Al-Hafez B, Zhero SV, Alenezzy MD, Smirnova IV (2007) Exercise training improves cardiac performance in diabetes: in vivo demonstration with quantitative cine-MRI analyses. *J Appl Physiol* 102: 665-672.

**Lompré AM**, Anger M, Levitsky D (1994) Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 26(9):1109-21.

**Lopaschuk GD**, Tahiliani AG, Vadlamudi RVS, Katz S, McNeill JH (1983) Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin- or carnitine treated diabetic rats. *Am J Physiol* 245: H969-976.

**Lopaschuk GD**, Katz S, McNeill JH (1983) The effect of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes on calcium transport in rat cardiac sarcoplasmic reticulum. The possible involvement of long chain acylcarnitines. *Can J Physiol Pharmacol* 61: 439-448.

**López-López JR**, Shacklock PS, Balke CW, Wier WG (1995) Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science* 268(5213):1042-5.

**Luetje CW**, Tietje KM, Christian JL, Nathanson NM (1988) Differential tissue expression and developmental regulation of guanine nucleotide binding regulatory proteins and their messenger RNAs in rat heart. *J Biol Chem*. 1988 Sep 15;263(26):13357-65.

**MacDonnell SM**, Kubo H, Crabbe DL, Renna BF, Reger PO, Mohara J, Smithwick LA, Koch WJ, Houser SR, Libonati JR (2005) Improved myocardial  $\beta$ -adrenergic responsiveness and signaling with exercise training in hypertension. *Circulation* 111: 3420-3428.

**MacLennan DH**, Rice WJ, Green NM (1997) The mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. *J Biol Chem* 272(46):28815-8.

**MacLennan DH**, Kranias EG (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7):566-77.

**Maeda CY**, Fernandes TG, Lulhier F, Irigoyen MC (1995) Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz J Med Biol Res* 28(4):497-501.

**Maeda CY**, Fernandes TG, Timm HB, Irigoyen MC (1995) Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension* 26(6 Pt 2):1100-4.

**Magyar J**, Rusznak Z, Szentesi P, Szûcs G, Kovacs L (1992) Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes. *J Mol Cell Cardiol* 24: 841-853.

**Mahan LC**, McKernan RM, Insel PA (1987) Metabolism of alpha- and beta-adrenergic receptors in vitro and in vivo. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1987;27:215-35.

**Mahgoub MA**, Abd-Elfattah AS (1998) Diabetes mellitus and cardiac function. *Mol Cell Biochem* 180: 59-64.

**Maiorana A**, O'Driscoll G, Taylor R, Green D (2003) Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med* 33(14):1013-35.

**Makino N**, Dhalla KS, Elimban V, Dhalla NS (1987) Sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Am J Physiol* 253: E202-207.

**Marx SO**, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101(4):365-76.

**Marx SO**, Gaburjakova J, Gaburjakova M, Henrikson C, Ondrias K, Marks AR (2001) Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ Res* 88(11):1151-8.

---

**Meyer M**, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1995) Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92(4): 778-784.

**Meyers MB**, Puri TS, Chien AJ, Gao T, Hsu PH, Hosey MM, Fishman GI (1998) Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 273(30):18930-5.

**Mihm MJ**, Seifert JL, Coyle CM, Bauer JA (2001) Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. *Life Sci* 69: 527-542.

**Mickey J**, Tate R, Lefkowitz RJ (1975) Subsensitivity of adenylate cyclase and decreased beta-adrenergic receptor binding after chronic exposure to (minus)-isoproterenol in vitro. *J Biol Chem* 250(14):5727-9.

**Mildenberger RR**, Bar-Shlomo B, Druck MN, Jablonsky G, Morch JE, Hilton JD, Kenshole AB, Forbath N, McLaughlin PR (1984) Clinically unrecognized ventricular dysfunction in young diabetic patients. *J Am Coll Cardiol* 4(2):234-8.

**Mitchell MR**, Powell T, Terrar DA, Twist VW (1987) Calcium-activated inward current and contraction in rat and guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 391:545-60.

**Mondon CE**, Dolkas CB, Reaven GM (1980) Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rats at rest. *Am J Physiol* 239(3):E169-77.

**Mokhtar N**, Lavoie JP, Rousseau-Mignerone S, Tancrede G, Nadeau A (1993) Physical training reverses defect in mitochondrial energy production of chronically diabetic rats. *Diabetes* 42: 682-687.

**Moniotte S**, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL (2001) Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 103(12):1649-55.

**Moore RL**, Palmer BM (1999) Exercise training and cellular adaptations of normal and diseased hearts. *Exerc Sport Sci Rev* 27: 285-315.

**Morgan HE**, Cadenas E, Regen DM, Park CR (1961) Regulation of glucose uptake in muscle. II. Rate-limiting steps and effects of insulin and anoxia in heart muscle from diabetic rats. *J Biol Chem* 236:262-8.

**Mostarda C**, Rogow A, Silva IC, De La Fuente RN, Jorge L, Rodrigues B, Heeren MV, Caldini EG, De Angelis K, Irigoyen MC (2009) Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Auton Neurosci* 145(1-2):11-6.

**Nadeau A**, Tancrede G, Nguyen MH, Rousseau-Migneron S (1986) Effect of physical training on norepinephrine turnover in tissues of normal and diabetic rats. *Metabolism* 35(1): 25-29.

**Nadeau A**, Rousseau-Migneron S, Tancredre G (1988) Exercise training improves early survival rate in diabetic rats submitted to acute coronary artery ligation. *Diabetes res* 9: 37-43.

**Navarro X**, Kennedy WR, Ferrer MT (1991) Cardiovascular responses to tilting in healthy and diabetic subjects. *J Neurol Sci* 104(1):39-45

**Netticadan T**, Temsah RM, Kent A, Elimban V, Dhalla NS (2001) Depressed levels of Ca<sup>2+</sup>-cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart. *Diabetes* 50: 2133-2138.

**Neubauer B**, Christensen NJ (1976) Norepinephrine, epinephrine, and dopamine contents of the cardiovascular system in long-term diabetics. *Diabetes* 25: 6-10.

**Neumann J**, Schmitz W, Scholz H, Stein B (1989) Effects of adenosine analogues on contractile response and cAMP content in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340(6):689-95.

**Nilius B**, Hess P, Lansman JB, Tsien RW (1985) A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316(6027):443-6.

**Nishio Y**, Kashiwagi A, Kida Y, Kodama M, Abe N, Saeki Y, Shigeta Y (1988) Deficiency of cardiac  $\beta$ -adrenergic receptor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 37: 1181-1187.

**Nishio Y**, Kashiwagi A, Ogawa T, Asahina T, Ikebuchi M, Kodama M, Shigeta Y (1990) Increase in [<sup>3</sup>H]PN 200-110 binding to cardiac muscle in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 39: 1064-1069.

**Nobe S**, Aomine M, Arita M, Ito S, Takaki R (1990) Chronic diabetes mellitus prolongs action potential duration of ventricular muscles: circumstantial evidence for impaired Ca<sup>2+</sup> channel. *Cardiovasc Res* 24: 381-389.

**Nordin C**, Gilat E, Aronson RS (1985) Delayed afterdepolarizations and triggered activity in ventricular muscle from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Circ Res* 57: 28-34.

**Nunoda S**, Genda A, Sugihara N, Nakayama A, Mizuno S, Takeda R (1985) Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus. *Heart Vessels* 1(1):43-7.

**Ohtake T**, Yokoyama I, Watanabe T, Momose T, Serezawa T, Nishikawa J, Sasaki Y (1995) Myocardial glucose metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus patients evaluated by FDG-PET. *J Nucl Med* 36(3):456-63.

**Okayama H**, Hamada M, Hiwada K (1994) Contractile dysfunction in the diabetic-rat heart is an intrinsic abnormality of the cardiac myocyte. *Clin Sci (Lond)* 86(3):257-62.

**Osborn BA**, Daar JT, Laddaga RA, Romano FD, Paulson DJ (1997) Exercise training increases sarcolemmal GLUT 4 protein and mRNA content in diabetic heart. *J Appl Physiol* 82: 828-834.

**Pacher P**, Ungvari Z, Nanasi PP, Kecseti V (1999) Electrophysiological changes in at ventricular and atrial myocardium at different stages of experimental diabetes. *Acta Physiol Scand* 166: 7-13.

**Paillole C**, Dahan M, Paycha F, Solal AC, Passa P, Gourgon R (1989) Prevalence and significance of left ventricular filling abnormalities determined by Doppler echocardiography in young type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Am J Cardiol* 64(16):1010-6.

**Paulson DJ**, Light KE (1981) Elevation of serum and ventricular norepinephrine content in the diabetic rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 33(3): 559-562.

**Paulson DJ**, Kopp SJ, Peace DG, Tow JP (1987) Myocardial adaptation to endurance exercise training in diabetic rats. *Am J Physiol* 21: R1073-R1081.

**Paulson DJ**, Kopp SJ, Peace DG, Tow JP (1988) Improved postischemic recovery of cardiac pump function in exercised trained diabetic rats. *J Appl Physiol* 65 (1): 187-193.

**Paulson DJ**, Mathews R, Bowman J, Zhao J (1992) Metabolic effects of treadmill exercise training on the diabetic heart. *J Appl Physiol* 73(1): 265-271.

**Pellegrin M**, Mazzolai L, Berthelot A, Laurant P (2008) Endothelial dysfunction and cardiovascular risk. Exercise protects endothelial function and prevents cardiovascular disease. *Science & Sports*.

**Penpargkul S**, Malhotra A, Schaible T, Scheuer J (1980) Cardiac contractile proteins and sarcoplasmic reticulum in hearts of rats trained by running. *J Appl Physiol (Respirat Environ Exercise Physiol)* 48(3): 409-413.

**Penpargkul S**, Schaible T, Yipintsoi T, Scheuer J (1980) The effect of diabetes on performance and metabolism of rat hearts. *Circ Res* 47: 911-921.

**Penpargkul S**, Fein F, Sonnenblick EH, Scheuer J (1981) Depressed cardiac sarcoplasmic reticular function from diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 13: 303-309.

**Petrova R**, Yamamoto Y, Muraki K, Yonekura H, Sakurai S, Watanabe T, Li Hui, Takeuchi M, Makita Z, Kato I, Takasawa S, Okamoto H, Imaizumi Y, Yamamoto H (2002) Advanced glycation endproduct-induced calcium handling impairment in mouse cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1425-1431.

**Pierce GN**, Dhalla NS (1985) Mechanisms of the defect in cardiac myofibrillar function during diabetes. *Am J Physiol* 248: E170-E175.

**Plourde G**, Martin M, Rousseau-Migneron S, Nadeau A (1991) Effect of physical training on ventricular  $\beta$ -adrenergic receptor adenylate cyclase system of diabetic rats. *Metabolism* 40(4): 362-367.

**Plourde G**, Rousseau-Migneron S and Nadeau A (1992) Physical training increases  $\beta$ -adrenoceptor density and adenylate cyclase activity in high-oxidative skeletal muscle of diabetic rats. *Metabolism* 41(12): 1331-1335.

**Priori SG**, Napolitano C (2005) Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular  $Ca^{2+}$  release channels. *J Clin Invest* 115(8):2033-8.

**Quednau BD**, Nicoll DA, Philipson KD (1997) Tissue specificity and alternative splicing of the  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am J Physiol* 272(4 Pt 1):C1250-61.

**Raev DC** (1993) Evolution of cardiac changes in young insulin-dependent (type 1) diabetic patients-one more piece of the puzzle of diabetic cardiopathy. *Clin Cardiol* 16(11): 784-790.

**Raev DC** (1994) Which left ventricular function is impaired earlier in the evolution of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 17(7): 633-639.

**Rajan SK**, Gokhale SM (2002) Cardiovascular function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus: a study using noninvasive methods. *Ann N Y Acad Sci* 958:425-30.

**Ramanadham S**, Tenner TE (1986) Chronic effects of streptozotocin diabetes on myocardial sensitivity in the rat. *Diabetologia* 29: 741-748.

**Randle PJ**, Newsholme EA, Garland PB (1964) Regulation of glucose uptake by muscle. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem J* 93(3):652-65.

**Randle PJ**, Sugden PH, Kerbey AL, Radcliffe PM, Hutson NJ (1978) Regulation of pyruvate oxidation and the conservation of glucose. *Biochem Soc Symp* (43):47-67.

---

**Reaven GM**, Chang F (1981) Effect of exercise-training on the metabolic manifestations of streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Diabetologia* 21: 415-417.

**Regan TJ**, Ettinger PO, Khan IM, Jesrani MU, Lyons MM, Oldewurtel HA, Weber M (1974) Altered myocardial function and metabolism in chronic diabetes mellitus without ischemia in dogs. *Circ Res* 35: 222-237.

**Regan TJ**, Lyons MM, Ahmed SS, Levinson GE, Oldewurtel HA, Ahmad MR and Haider B (1977) Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest* 60: 884-899.

**Ren J**, Bode AM (2000) Altered cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes from spontaneously diabetic BB rats. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 279: H238-244.

**Ren J**, Davidoff AJ (1997) Diabetes rapidly induces contractile dysfunctions in isolated ventricular myocytes. *Am J Physiol* 272: H148-H158.

**Riddell MC**, Iscoe KE (2006) Physical activity, sport, and pediatric diabetes. *Pediatr Diabetes* 7(1): 60-70.

**Riggs CE**, Collins G, Taylor M (1992) Streptozotocin-induced diabetes and the effects of endurance exercise training. *Diabetes Res* 19: 177-185.

**Rithalia A**, Qureshi MA, Howarth FC and Harrison SM (2004) Effects of halothane on contraction and intracellular calcium in ventricular myocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal of anaesthesia* 92 (2):246-53.

**Rizza R**, Haymond M, Cryer P, Gerich J (1979) Differential effects of epinephrine on glucose production and disposal in man. *Am J Physiol* 237(4):E356-62.

**Roberts MI**, Biser PS, Stadel JM, Taylor DA, Fleming WW (1992) Adenylyl cyclase and guanine nucleotide-binding proteins in supersensitive guinea pig ventricles. *Mol Pharmacol* 42(5):784-91.

**Rodrigues B**, Cam MC, McNeill JH (1998) Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 180(1-2):53-7.

**Rodriguez B**, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K (2007) Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 6: 38-44.



---

**Rona G**, Zsoter T, Chappel C, Gaudry R (1959) Myocardial lesions, circulatory and electrocardiographic changes produced by isoproterenol in the dog. *Rev Can Biol* 18(1):83-94.

**Roof DJ**, Applebury ML, Sternweis PC (1985) Relationships within the family of GTP-binding proteins isolated from bovine central nervous system. *J Biol Chem* 260(30):16242-9.

**Roy TM**, Peterson HR, Snider HL, Cyrus J, Broadstone VL, Fell RD, Rothchild AH, Samols E, Pfeifer MA (1989) Autonomic influence on cardiovascular performance in diabetic subjects. *Am J Med* 87(4):382-8.

**Rozec B**, Noireaud J, Trochu JN, Gauthier C (2003) Place of  $\beta_3$ -adrenoceptors among other  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in the regulation of the cardiovascular system. *Arch mal coeur* 96(9): 905-913.

**Rougier O**, Vassort G, Garnier D, Gargouil YM, Coraboeuf E (1969) Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflugers Arch* 308(2):91-110.

**Russ M**, Reinauer H, Eckel J (1991) Diabetes-induced decrease in the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in adult rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 178(3): 906-912.

**Santana LF**, Cheng H, Gómez AM, Cannell MB, Lederer WJ (1996) Relation between the sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  current and  $\text{Ca}^{2+}$  sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circ Res.* 1996 Jan;78(1):166-71.

**Sauviat MP**, Feuvray D (1986) Electrophysiological analysis of the sensitivity to calcium in ventricular muscle from alloxan diabetic rats. *Basic Res Cardiol* 81: 489-496.

**Savarese JJ**, Berkowitz BA (1979)  $\beta$ -adrenergic receptor decrease in the diabetic rat hearts. *Life Sciences* 25: 2075-2078.

**Schaffer SW**, Ballard-Croft C, Boerth S, Allo SN (1997) Mechanisms underlying depressed  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger activity in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 34(1):129-36.

**Schaible TF**, Malhotra A, Bauman WA, Scheuer J. Left ventricular function after chronic insulin treatment in diabetic and normal rats. *J Mol Cell Cardiol* 15(7):445-58.

**Schmidt RE**, Plurad SB, Modert CW (1983) Experimental diabetic autonomic neuropathy characterization in streptozotocin-diabetic Sprague-Dawley rats. *Lab Invest* 49(5):538-52.

---

**Seager MJ**, Singal PK, Orchard R, Pierce GN, Dhalla NS (1984) Cardiac cell damage: a primary myocardial disease in streptozotocin-induced chronic diabetes. *Br J Exp Path* 65: 613-623.

**Sears CE**, Ashley EA, Casadei B (2004) Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004 Jun 29;359(1446):1021-44.

**Seddon M**, Shah AM, Casadei B (2007) Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res* 75(2):315-26.

**Senges J**, Brachmann J, Pelzer D, Hasslacher C, Weihe E, Kübler W (1980) Altered cardiac automaticity and conduction in experimental diabetes mellitus. *J Mol Cell Cardiol* 12(12):1341-51

**Shao CH**, Rozanski GJ, Patel KP, Bidasee KR (2007) Dyssynchronous (non-uniform) Ca<sup>2+</sup> release in myocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 42(1):234-46.

**Shao CH**, Wehrens XH, Wyatt TA, Parbhu S, Rozanski GJ, Patel KP, Bidasee KR (2009) Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J Appl Physiol* 106(4):1280-92.

**Shen X**, Ye G, Metreveli NS, Epstein PN (2005) Cardiomyocyte defects in diabetic models and protection with cardiac-targeted transgenes. *Methods Mol Med* 112: 379-388.

**Shimoni Y**, Firek L, Giles W (1994) Short-term diabetes alters K<sup>+</sup> currents in rat ventricular myocytes. *Circ Res* 74: 620-628.

**Shimoni Y**, Light PE, French RJ (1998) Altered ATP sensitivity of ATP-dependent K<sup>+</sup> channels in diabetic rat hearts. *Am J Physiol* 275(4 Pt 1):E568-76.

**Simmerman HK**, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR (1986) Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem* 261(28):13333-41.

**Singal PK**, Yates JC, Beamish RE, Dhalla NS (1981) Influence of reducing agents on adrenochrome-induced changes in the heart. *Arch Pathol Lab Med* 105(12):664-9.

**Smith CI**, Pierce GN and Dhalla NS (1984) Alterations in adenylate cyclase activity due to streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Life Sciences* 34: 1223-1230.

**Stanley WC**, Hall JL, Smith KR, Cartee GD, Hacker TA, Wisneski JA (1994) Myocardial glucose transporters and glycolytic metabolism during ischemia in hyperglycemic diabetic swine. *Metabolism* 43(1): 61-69.

**Stiles GL**, Lefkowitz RJ (1984) Cardiac adrenergic receptors. *Annu Rev Med.* 1984;35:149-64.

**Stølen TO**, Høydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, Larsen T, Rolim N, Condorelli G, Smith GL, Wisløff U (2005) Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca<sup>2+</sup> control, and SR Ca<sup>2+</sup> release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res* 105(6):527-36.

**Sundaresan PR**, Sharma VK, Gingold SI, Banerjee SP (1984) Decreased beta-adrenergic receptors in rat heart in streptozotocin-induced diabetes: role of thyroid hormones. *Endocrinology* 114(4):1358-63.

**Sundkvist G**, Lilja B, Almér LO (1980) Abnormal diastolic blood pressure and heart rate reactions to tilting in diabetes mellitus. *Diabetologia* 19(5):433-8.

**Swynghedauw B** (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodelling. *Physiol Rev* 79: 215-262.

**Sylvestre-Gervais L**, Nadeau A, Tancrède G, Nuyen MH, Rousseau-Mignerou S (1984) Decrease in ventricular beta-adrenergic receptors in trained diabetic rats. *Basic Res Cardiol* 79: 432-439.

**Szkudelski T** (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46.

**Tada M**, Katz AM (1982) Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol* 44:401-23.

**Tada M**, Inui M, Yamada M, Kadoma M, Kuzuya T, Abe H, Kakiuchi S (1983) Effects of phospholamban phosphorylation catalyzed by adenosine 3':5'-monophosphate- and calmodulin-dependent protein kinases on calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 15(5):335-46.

**Takeda N**, Dominiak P, Türck D, Rupp H, Jacob R (1985) The influence of endurance training on mechanical catecholamine responsiveness,  $\beta$ -adrenoceptor density and myosin isoenzyme pattern of rat ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol* 80: 88-99.

**Takeda N**, Nakamura I, Ohkubo T, Hatanaka T, Nagano M (1988) Effects of physical training on the myocardium of streptozotocin-induced diabetic rats. *Basic Res Cardiol* 83: 525-530.

**Takeda N**, Nakamura I, Hatanaka T, Ohkubo T, Nagano M (1988) Myocardial mechanical and myosin isoenzyme alterations in streptozotocin-diabetic rats. *Jpn Heart J* 29: 455-463.

**Takeda N**, Dixon IMC, Hata T, Elimban V, Shah KR, Dhalla NS (1996) Sequence of alterations in subcellular organelles during the development of heart dysfunction in diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 30 (Suppl): S113-122.

**Tamada A**, Hattori Y, Houzen H, Yamada Y, Sakuma I, Kitabatake A and Kanno M (1998) Effects of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation on contractility,  $[Ca^{2+}]_i$ , and  $Ca^{2+}$  current in diabetic rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 274: H1849-1857.

**Tancrede G**, Rousseau-Migneron S, Nadeau A (1982) Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetes* 31: 406-409.

**Tani M**, Neely JR (1988) Hearts from diabetic rats are more resistant to in vitro ischemia: possible role of altered  $Ca^{2+}$  metabolism. *Circ Res* 62(5): 931-940.

**Tatchum-Talom R**, Schulz R, McNeill JR, Khadour FH (2000) Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(4):H1757-66.

**Teshima Y**, Takahashi N, Saikawa T, Hara M, Yasunaga S, Hidaka S, Sakata T (2000) Diminished expression of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase and ryanodine sensitive  $Ca^{2+}$  channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 32: 655-664.

**Treinys R**, Jurevicius J (2008) L-type  $Ca^{2+}$  channels in the heart: structure and regulation. *Medicina (Kaunas)* 44(7):491-9.

**Trost SU**, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E and Dillmann WH (2002) Overexpression of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51: 1166-1171.

**Trujillo A**, Eggena P, Barrett J, Tuck M (1989) Renin regulation in type II diabetes mellitus: influence of dietary sodium. *Hypertension* 13(3):200-5

**Tsuchida K**, Watajima H, Otomo S (1994) Calcium current in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 267: H2280-H2289.

**Uchida K** (2000) Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 28(12):1685-96.

- Ulrich P**, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 56:1-21.
- Vadlamudi R**, McNeill JH (1980) Cardiac function in normal and diabetic rats. *Proc West Pharmacol Soc* 23:29-31.
- Vadlamudi RV**, McNeill JH (1984) Effect of experimental diabetes on isolated rat heart responsiveness to isoproterenol. *Can J Physiol Pharmacol* 62(1):124-31.
- Valdivia HH**, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ (1995) Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg<sup>2+</sup> and phosphorylation. *Science* 267(5206):1997-2000.
- Vasanji Z**, Dhalla NS, Netticadan T (2004) Increased inhibition of SERCA2 by phospholamban in the type 1 diabetic heart. *Mol Cell Biochem* 261: 245-249.
- Vetter R**, Rehfeld U, Reissfelder C, Weib W, Wagner KD, Günther J, Hammes A, Tschöpe C, Dillmann W, Paul M (2002) Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase improves reticular Ca<sup>2+</sup> handling in normal and diabetic rat hearts. *FASEB J* 16(12):1657-9.
- Villanueva DS**, Poirier P, Standley PR, Broderick TL (2003) Prevention of ischemic heart failure by exercise in spontaneously diabetic BB wor rats subjected to insulin withdrawal. *Metabolism* 52(6): 791-797.
- Vinik AI**, Freeman R, Erbas T (2003) Diabetic autonomic neuropathy. *Semin Neurol* 23(4):365-72.
- Vishwanath V**, Frank KE, Elmets CA, Dauchot PJ, Monnier VM (1986) Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus. Correlation with long-term complications. *Diabetes* 35(8):916-21.
- Wall SR**, Lopaschuk GD (1989) Glucose oxidation rates in fatty acid-perfused isolated working hearts from diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 1006(1):97-103.
- Wang DW**, Kiyosue T, Shigematsu S, Arita M (1995) Abnormalities of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in ventricular myocytes from rats with chronic diabetes. *Am J Physiol* 269: H1288-H1296.
- Wang H**, Kohr MJ, Wheeler DG, Ziolo MT (2008) Endothelial nitric oxide synthase decreases  $\beta$ -adrenergic responsiveness via inhibition of the L-type Ca<sup>2+</sup> current. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1473–H1480.

**Watanuki S**, Matsuda N, Sakuraya F, Jesmin S, Hattori Y (2004) Protein kinase C modulation of the regulation of sarcoplasmic reticular function by protein kinase A-mediated phospholamban phosphorylation in diabetic rats. *Br J Pharmacol* 141: 347-359.

**Wegner JA**, Lund DD, Overton JM, Edwards JG, Oda RP, Tipton CM (1987) Select cardiovascular and metabolic responses of diabetic rats to moderate exercise training. *Med Sci Sports Exerc* 19(5): 497-503.

**Wichelhaus A**, Russ M, Petersen S and Eckel J (1994) G protein expression and adenylate cyclase regulation in ventricular cardiomyocytes from STZ-diabetic rats. *Am J Physiol* 267: H548-555.

**Wier WG**, Egan TM, López-López JR, Balke CW (1994) Local control of excitation-contraction coupling in rat heart cells. *J Physiol* 474(3):463-71.

**Wisloff U**, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O (2001) Intensity-controlled treadmill running in rats: VO<sub>2</sub> max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1301-1310.

**Xu A**, Hawkins C, Narayanan N (1993) Phosphorylation and activation of the Ca(2+)-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 268(12):8394-7.

**Xu L**, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279(5348):234-7.

**Yamamoto Y**, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H (2001) Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest* 108(2):261-8.

**Yang JM**, Cho CH, Kong KA, Jang IS, Kim HW, Juhn YS (1999) Increased expression of G $\alpha$ q protein in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Mol Med* 31(4):179-84.

**Yaras N**, Ugur M, Ozdemir S, Gurdal H, Purali N, Lacampagne A, Vassort G, Turan B (2005) Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rat heart. *Diabetes* 54: 3082-3088.

**Ye G**, Donthi RV, Metreveli NS, Epstein PN (2005) Cardiomyocyte dysfunction in models of type 1 and type 2 diabetes. *Cardiovasc Toxicol* 5: 285-292.

**Yu Z**, McNeill JH (1991) Altered inotropic responses in diabetic cardiomyopathy and hypertensive-diabetic cardiomyopathy. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 64-71.

**Yu Z**, Quamme GA and McNeill JH (1994) Depressed  $[Ca^{2+}]_i$  responses to isoproterenol and cAMP in isolated cardiomyocytes from experimental diabetic rats. *Am J Physiol* 266: H2334-2342.

**Yu Z**, Tibbits GF, McNeill JH (1994) Cellular functions of diabetic cardiomyocytes: contractility, rapid-cooling contracture, and ryanodine binding. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 266: H2082-2089.

**Yu ZJ**, Quamme GA, McNeill JH (1995) Altered  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization in diabetic cardiomyocytes: responses to caffeine, KCl, ouabain, and ATP. *Diabetes Res Clin Pract* 30: 9-20.

**Yu ZJ**, Rodrigues B, McNeill JH (1997) Intracellular calcium levels are unchanged in the diabetic heart. *Cardiovascular Research* 34: 91-98.

**Zarain-Herzberg A**, Yano K, Elimban V and Dhalla NS (1994) Cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase expression in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 203(1): 113-120.

**Zarich SW**, Arbuckle BE, Cohen LR, Roberts M, Nesto RW (1988) Diastolic abnormalities in young asymptomatic diabetic patients assessed by pulsed Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 12(1):114-20.

**Zhao XY**, Hu SJ, Li Jiang, Mou Y, Chen BP, Xia Q (2006) Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem* 62(1): 1-8.

**Zheng H**, Li YF, Cornish KG, Zucker IH, Patel KP (2005) Exercise training improves endogenous nitric oxide mechanisms within the paraventricular nucleus in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5):H2332-41.

**Zhong Y**, Ahmed S, Grupp IL, Matlib MA (2001) Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rats hearts. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 281: H1137-1147.

**Zimmer HG** (1998) The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol Sci*. 1998 Aug;13:203-210.

**Ziolo MT**, Katoh H, Bers DM (2001) Positive and negative effects of nitric oxide on  $Ca^{2+}$  sparks: influence of  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2295–H2303.

**Zhou BQ**, Hu SJ, Wang GB (2006) The analysis of ultrastructure and gene expression of sarco/endoplasmic reticulum calcium handling proteins in alloxan-induced diabetic rat myocardium. *Acta cardiol* 61(1): 21-27.

**Zhou S**, Tan AY, Paz O, Ogawa M, Chou CC, Hayashi H, Nihei M, Fishbein MC, Chen LS, Lin SF, Chen PS (2008) Antiarrhythmic effects of beta3-adrenergic receptor stimulation in a canine model of ventricular tachycardia. *Heart Rhythm* 5:298-299.

**Zouhal H**, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A (2008) Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Med* 38:401-423.



.....

**Effet combiné du diabète insulino-dépendant et de l'entraînement sur la fonction cardiaque : étude du système  $\beta$ -adrénergique et du système de régulation du calcium intracellulaire**

.....

Le traitement à l'insuline n'empêchant pas à long terme le développement de la cardiomyopathie, l'activité physique régulière est aujourd'hui proposée comme complément à la prise en charge médicamenteuse du diabète. Notre objectif premier était de déterminer sur une durée conséquente les effets respectifs de l'entraînement physique et du traitement à l'insuline sur la fonction cardiaque en portant une attention particulière sur le système  $\beta$ -adrénergique et/ou sur le système de régulation du calcium intracellulaire. A long terme le traitement à l'insuline comme l'entraînement physique ne parviennent ni l'un, ni l'autre à atténuer les désordres occasionnés par le diabète au niveau de la fonction myocardique. Si notre entraînement en endurance n'a pas permis d'améliorer les performances myocardiques dans notre modèle de rat diabétique non traité à l'insuline, il a même accentué la bradycardie et la désensibilisation  $\beta$ -adrénergique induites par le diabète. Ensuite, nous avons cherché à déterminer si à long terme, le traitement à l'insuline et l'entraînement physique pouvaient agir de manière synergique et ce faisant améliorer les performances myocardiques. Associés le traitement à l'insuline et l'entraînement en endurance parviennent à normaliser la fonction contractile. Cet effet additif est très certainement médié par des adaptations dans la voie de signalisation impliquant les protéines régulatrices du  $Ca^{2+}$ . Nos travaux révèlent l'intérêt majeur d'un traitement bi-dimensionnel – traitement à l'insuline, activité physique – dans la prise en charge thérapeutique quotidienne des patients diabétiques. Néanmoins, nous soulignons l'importance d'une activité physique adaptée pour induire les effets bénéfiques escomptés.

**Mots clés :** diabète, fonction myocardique, système  $\beta$ -adrénergique, calcium intracellulaire, entraînement

.....

**Combined effect of diabetes mellitus and exercise training on cardiac function: a study of  $\beta$ -adrenergic system and intracellular calcium regulatory system**

.....

The insulin treatment does not avoid long-term development of cardiomyopathy, regular physical activity is now offered as a complement to drug therapy of diabetes. Our primary aim was to determine long term respective effects of exercise training and insulin treatment on cardiac function with a focus on the  $\beta$ -adrenergic system and/or on the calcium intracellular regulatory system. In the long-term insulin treatment and exercise training were not able to decrease the troubles caused by diabetes on myocardial function. Our endurance training did not improve myocardial performance in our model of diabetic rats, furthermore bradycardia and the  $\beta$ -adrenergic desensitization induced by diabetes has been increase. Afterwards, we considered the effects of a possible synergy between long-term insulin treatment and exercise training on myocardial performance. Associated insulin treatment and exercise training are able to normalize contractile function. This additive effect is likely mediated by changes in the signaling pathway involving  $Ca^{2+}$  cycling proteins. Our works show the interest of a major bi-dimensional treatment - insulin treatment, physical activity - in the therapeutic management of patients with diabetes everyday. However, we highlighted importance of adequate physical activity to induce the expected benefits.

**Key words :** diabetes, myocardial function,  $\beta$ -adrenergic system, intracellular calcium, exercise training