



Physiopathologie de la dysfonction bêta-adrénergique et rôle de la protéine MRP4 au cours du vieillissement, du diabète et du syndrome métabolique

Aude Carillion

► To cite this version:

Aude Carillion. Physiopathologie de la dysfonction bêta-adrénergique et rôle de la protéine MRP4 au cours du vieillissement, du diabète et du syndrome métabolique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066485 . tel-01296945

HAL Id: tel-01296945

<https://theses.hal.science/tel-01296945>

Submitted on 1 Apr 2016

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED394)

UMRS 1166 ICAN / Equipe 3 "Physiopathologie de l'Excitabilité Cellulaire"

**Physiopathologie de la dysfonction bêta-adrénergique et
rôle de la protéine MRP4 au cours du vieillissement,
du diabète et du syndrome métabolique**

Par **Aude Carillion**

Thèse de doctorat de Physiologie et Physiopathologie

Dirigée par Bruno Riou et Julien Amour

Présentée et soutenue publiquement le 23 septembre 2015

Devant un jury composé de :

Bausero, Pedro, Professeur des Universités, Président de jury

Andriantstitohaina, Ramaroson, Directeur de Recherche, Rapporteur

Gérard, Jean-Louis, Professeur des Universités, Rapporteur

Mebazaa, Alexandre, Professeur des Universités, Examineur

Ouattara, Alexandre, Professeur des Universités, Examineur

Riou, Bruno, Professeur des Universités, Directeur de Thèse

Amour, Julien, Professeur des Universités, Directeur de Thèse



A mon mari qui m'a soutenu et a supporté toutes ces années de recherche,

Et à mes deux enfants nés pendant ce travail,

REMERCIEMENTS

A mes présidents de jury, rapporteurs et examinateur, Pedro Bausero, Ramaroson Andriantstitohaina, Jean-Louis Gérard et Alexandre Mebazaa, merci de me faire l'honneur de rapporter et juger ce travail

Au Professeur Ouattara qui m'a un jour suggéré de goûter un peu à la recherche au laboratoire, merci de ce conseil avisé et de bien vouloir juger le fruit de ces années

Au Professeur Bruno Riou, merci de m'avoir fait profiter de votre sagesse, votre expérience et votre soutien qui sont incomparables

Au Professeur Julien Amour, merci pour ton énergie et ton courage qui sont un exemple pour tous

A tous les collègues des laboratoires et animalerie, merci pour tout ce que nous avons pu échanger durant ces années

A ma famille en particulier ma tante qui m'a accueilli et encouragé

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	p3
TABLE DES MATIERES	p4
ABREVIATIONS	p8
RESUME EN FRANÇAIS	p9
RESUME EN ANGLAIS	p11
INTRODUCTION	p12
ETAT DE LA QUESTION	p14
1. Physiopathologie de la réponse cardiaque à la stimulation β-adrénergique	p14
1.1 Récepteurs β-adrénergiques	p14
1.1.1 Gènes et expression des récepteurs β -adrénergiques	p14
1.1.2 Structure des récepteurs β -adrénergiques	p15
1.1.3 Polymorphisme des récepteurs β -adrénergiques	p16
1.1.4 Pharmacologie des récepteurs β -adrénergiques	p16
1.2 Stimulation des récepteurs β-adrénergique et fonction cardiaque	p18
1.2.1 Couplage excitation-contraction	p18
1.2.2 Contractilité cardiaque	p20
1.2.3 Electrophysiologie	p22
1.3 Autres effets de la stimulation des récepteurs β-adrénergiques.	p23
1.3.1 Désensibilisation et downregulation des récepteurs β -adrénergiques	p23
1.3.2 Effets hypertrophiques et apoptotiques de la stimulation chronique β 1-adrénergique	p25
1.3.3 Signalisation issue du récepteur β 2-adrénergique	p26
1.3.4 Signalisation issue du récepteur β 3-adrénergique	p27
1.4 Régulation de la signalisation β1-adrénergique	p30
1.4.1 Compartimentalisation subcellulaire et signalisation β -adrénergique.	p30

1.4.2	Extrusion de l'AMPc par MRP4	p34
2.	Physiopathologie de la cardiopathie sénescence	p38
2.1	Le cardiomyocyte dans le cœur sénescence	p38
2.1.1	Altérations génétiques au cours de la sénescence	p39
2.1.2	Epigénétique et micro-ARNs au cours de la sénescence	p40
2.1.3	Accumulation des déchets dans le cœur sénescence	p41
2.1.4	Modifications structurelles du cœur sénescence	p41
2.2	Altérations fonctionnelles du cœur sénescence	p42
2.2.1	Electrophysiologie du cœur sénescence	p42
2.2.2	Contraction cardiaque basale et homéostasie calcique	p43
2.2.3	Altérations mécaniques du cœur sénescence	p44
2.3	La fonction β -adrénergique dans le cœur sénescence	p46
2.3.1	Hyperactivation neuro-hormonale	p46
2.3.2	La dysfonction β -adrénergique	p46
3.	Physiopathologie de la cardiopathie diabétique	p49
3.1	Principales modifications tissulaires et cellulaires dans la cardiopathie diabétique	p50
3.1.1	Altérations structurelles et neuro-hormonales au cours du diabète	p50
3.1.2	Aspects métaboliques de la cardiopathie diabétique	p51
3.1.3	Altérations du couplage excitation-contraction dans la cardiopathie diabétique	p52
3.2	Altérations mécaniques dans la cardiopathie diabétique	p54
3.2.1	Dysfonction diastolique dans la cardiopathie diabétique	p54
3.2.2	Dysfonction systolique dans la cardiopathie diabétique	p55
3.2.3	Dysfonction β -adrénergique dans la cardiopathie diabétique	p56
3.3	Principales altérations cardiaques liées à l'obésité et au syndrome métabolique	p59
	TRAVAUX MENES PAR LE DOCTORANT	p62
1.	Matériels et Méthodes	p62

1.1 Modèles animaux	p62
1.1.1 Cardiopathie sénescence	p62
1.1.2 Cardiopathie liée au syndrome métabolique	p63
1.1.3 Cardiopathie diabétique	p63
1.2 Effets inotrope et lusitrope de la stimulation β-adrénergique <i>in vivo</i>	p63
1.2.1 Echocardiographie	p63
1.2.2 Mesure invasive de la pression artérielle	p64
1.3 Effets inotrope et lusitrope de la stimulation β-adrénergique <i>ex vivo</i>	p65
1.4 Effets inotrope et lusitrope de la stimulation β-adrénergique <i>in vitro</i>	p65
1.4.1 Isolement des cardiomyocytes	p65
1.4.2 Etude Ionoptix® des cardiomyocytes	p66
1.5 Mesure de l'expression protéique de MRP4	p68
1.6 Analyse statistique	p68
 2. Résultats	 p70
2.1 Etude n°1 : Evaluation du rôle de la protéine MRP4 dans la réponse à la stimulation β -adrénergique dans la cardiopathie sénescence	p71
2.2 Etude n°2 : Etude de l'impact de l'obésité associée au diabète sur la stimulation β -adrénergique	p84
2.3 Etude n°3 : Etude de l'impact des statines sur la cardiopathie diabétique	p97
2.4 Etude n°4 : Etude du rôle de la protéine MRP4 dans la réponse à la stimulation β -adrénergique.	p113
 CRITIQUES ET LIMITES DES METHODES	 p127
1. Modèles animaux	p127
1.1 Espèce animale	p127
1.2 Modèles de cardiopathie	p128
2. Evaluation de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques <i>in vivo</i>	p129
3. Evaluation de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques <i>in vitro</i>	p130
4. Inhibition de MRP4 par MK571	p131

5. Analyses d'expression génomique et protéique	p132
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	p133
REFERENCES	p136
ANNEXES	p143
TABLE DES ILLUSTRATIONS	p155

ABREVIATIONS

AGEs : produits avancés de la glycation

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ATP : adénosine triphosphate

ARN : acide ribonucléique

CAMKII : protéine kinase calcium-calmoduline dépendante

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Epac : protéine d'échange activée par l'AMPc

FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche

FRVG : fraction de raccourcissement ventriculaire gauche

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

I_{CaL} : canaux calciques lents

MRP4 : multidrug resistance associated protein 4

NOS3 : nitrite oxide synthase 3 ou endothéliale

PKA: protéine kinase-AMPc dépendante

PDE : phosphodiesterases

SERCA2a: SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase

TRIV : temps de relaxation isovolumique

RESUME EN FRANÇAIS

Physiopathologie de la dysfonction β -adrénergique et rôle de la protéine MRP4 au cours du vieillissement, du diabète et du syndrome métabolique.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour objectif d'approfondir la compréhension de l'altération de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans plusieurs contextes physiopathologiques. La première étude confirme l'existence d'une dysfonction β -adrénergique à l'échelle du cardiomyocyte au cours de la sénescence. Elle met en lumière le rôle de la protéine MRP4 (multidrug resistance associated protein 4) dans cette diminution de réponse inotrope positive à l'isoprotérénol. La deuxième étude évalue la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans le syndrome métabolique et montre que la dysfonction est modérée dans ce contexte même en cas de diabète associé à l'obésité. Ces résultats fonctionnels sont expliqués par la diminution d'expression des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques mais l'absence de surexpression du récepteur β_3 -adrénergique comme observée dans le diabète de type 1. La troisième étude analyse le rôle de l'atorvastatine sur la réponse β -adrénergique chez les diabétiques et les mécanismes de modulation de cette réponse par une étude du transcriptome cardiaque. Elle montre également que l'inhibition de la production d'oxyde nitrite améliore la réponse β -adrénergique. La quatrième étude a expliqué une part de la dysfonction β -adrénergique chez les diabétiques par la surexpression de MRP4. L'inhibition de MRP4 a permis de restaurer la réponse à l'isoprotérénol au cours de la cardiopathie diabétique. Au total, l'ensemble de nos travaux poursuit la description des mécanismes de la dysfonction β -adrénergique dans la sénescence et le diabète et souligne le rôle de MRP4.

Mots-clés : stimulation β -adrénergique, sénescence, cardiopathie diabétique, syndrome métabolique, multidrug resistance associated protein 4, MRP4.

RESUME EN ANGLAIS

Physiopathology of the β -adrenergic dysfunction and role of MRP4 protein during aging, diabetes mellitus and metabolic syndrome.

The studies presented in this report looked for a better understanding of the altered response to stimulation of the β -adrenergic receptors in several physiopathological contexts. The first study confirms the alteration of the β -adrenergic response at the cardiomyocyte level in the senescent cardiomyopathy. The role of MRP4 (multidrug resistance associated protein 4) in the reduced inotropic response to isoproterenol is emphasized. The second study evaluates the response to β -adrenoceptors stimulation in the metabolic syndrome and shows mild dysfunction in this context even in obesity associate with diabetes. These functional results are explained by a reduced expression of β 1- and β 2-adrenergic receptors but no overexpression of β 3-adrenoceptor as observed in type 1 diabetes. The third study analyzes the role of atorvastatin on the β -adrenergic response in the diabetic cardiomyopathy and the mechanisms involved by study of the cardiac transcriptome. The inhibition of nitrite oxide production improves the response to β -adrenoceptors stimulation in diabetic heart. The fourth study explained part of the β -adrenergic dysfunction in the diabetic cardiomyopathy by the overexpression of MRP4. The inhibition of this protein restored the response to isoproterenol during diabetic cardiomyopathy. All together the present results carry on with description of the mechanisms involved in the β -adrenergic dysfunction in aging and diabetes and underline the role of MRP4.

Key words : β -adrenergic stimulation, aging, diabetic cardiomyopathy, metabolic syndrome, multidrug resistance associated protein 4, MRP4.

INTRODUCTION

Depuis le début du 20^{ème} siècle, le développement socio-économique et les progrès de la médecine ont profondément modifié le profil de la population et la physiopathologie qui en découle. Le recul des infections traditionnelles a permis l'émergence de problématiques cardiovasculaires et oncologiques. En effet, dans les pays occidentaux, les risques de famine et de malnutrition ont été remplacés par l'obésité et le diabète. Par ailleurs, du fait des mesures de prévention primaire, de l'amélioration des conditions socio-économiques et des progrès médicaux, la population des pays industrialisés vieillit. Les maladies métaboliques et le vieillissement sont ainsi devenus des enjeux majeurs de santé publique. En parallèle de la population générale, les patients pris en charge au bloc opératoire ou en réanimation sont donc plus en plus âgés, obèses ou diabétiques et sujets à diverses complications. Les modifications cardiovasculaires liées à l'âge, l'obésité ou le diabète responsables d'une instabilité hémodynamique péri-opératoire, nécessitent une prise en charge médicale spécifique. L'atteinte cardio-vasculaire liée au vieillissement, au diabète ou à l'obésité ont des points communs, notamment l'apparition d'une dysfonction cardiaque à fraction d'éjection conservée¹⁻⁴ et une altération de la réponse cardio-vasculaire à la stimulation β -adrénergique.

Le système nerveux sympathique joue un rôle déterminant dans l'adaptation du débit cardiaque, tout particulièrement en période péri-opératoire durant laquelle il peut exister d'importantes variations des conditions de charge cardiaque.^{5, 6} Au-delà de la chirurgie, ce système permet à l'individu de s'adapter à une situation de stress et d'assurer sa survie immédiate en activant les moyens nécessaires « fight or flight ».⁷ L'altération de la réponse à la stimulation β -adrénergique dans les cardiopathies sénescence et diabétique contribue à l'instabilité hémodynamique observée en clinique par une moindre augmentation du débit

cardiaque. Plusieurs mécanismes sous-tendant cette dysfonction β -adrénergique ont déjà été identifiés tels que la diminution de l'expression des récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques et la surexpression des récepteurs β_3 -adrénergiques.^{2, 8} Une meilleure compréhension du fonctionnement du système nerveux sympathique et de ses altérations dans les cardiopathies sénescence et diabétique est fondamentale pour améliorer leur prise en charge quotidienne.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur les mécanismes de la dysfonction de la réponse à la stimulation β -adrénergique. Nous avons évalué l'importance de cette dysfonction dans la cardiopathie sénescence et dans deux modèles de cardiopathie diabétique. Une fois cette dysfonction caractérisée, nous avons exploré un nouveau mécanisme contribuant à la diminution de réponse à la stimulation β -adrénergique à travers l'étude de la Multi-Drug associated resistance protein 4 (MRP4). Enfin nous avons évalué l'impact d'un traitement par les inhibiteurs de l'HMG CoA-réductase, ou statines, sur la réponse à la stimulation β -adrénergique, thérapeutique fréquemment administrée aux sujets âgés, obèses ou diabétiques.

ETAT DE LA QUESTION

1 Physiopathologie de la réponse cardiaque à la stimulation β -adrénergique

1.1 Récepteurs β -adrénergiques

1.1.1 Gènes et expression des récepteurs β -adrénergiques

Trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques, β_1 , β_2 et β_3 ont été décrits,² codés respectivement par les gènes *ADRB1*, *ADRB2* et *ADRB3*. Un 4^{ème} sous-type a été proposé mais correspond à un état particulier du récepteur β_1 -adrénergique.⁹

La localisation chromosomique chez l'homme diffère selon le type de récepteur β -adrénergique : 10q24-q26 pour le récepteur β_1 , 5q31-q32 pour le récepteur β_2 , 8p12-p11.2 pour le récepteur β_3 . *ADRB1* et *ADRB2* sont des gènes monoexons alors que *ADRB3* comporte 3 exons et 2 introns chez la souris et le rat, 2 exons et 1 intron chez l'homme.¹⁰ L'épissage alternatif de ces introns avant la traduction en protéines aboutit à 2 isoformes du récepteur β_3 -adrénergique dont l'un pourrait être sujet à la déphosphorylation (cf infra).¹⁰

Les récepteurs différents β -adrénergiques sont exprimés dans de nombreux tissus (foie, œil, muscles lisses,...). Au niveau du cœur, le récepteur β_1 -adrénergique est présent dans toutes les régions du cœur, le récepteur β_2 est principalement localisé dans les oreillettes et les ventricules, enfin le récepteur β_3 est surtout exprimé au niveau des ventricules. Les récepteurs β -adrénergiques du cœur adulte sain sont à 80% de type β_1 et pour 20% de type β_2 .^{7, 9, 11} Le récepteur β_3 -adrénergique est très peu exprimé dans le cœur sain⁹ mais sa proportion augmente dans le cœur sénescant⁸ ou en cas d'atteinte septique, diabétique², ou en cas d'insuffisance cardiaque.^{12, 13} Les récepteurs β_2 et β_3 -adrénergiques sont localisés sur les terminaisons postganglionnaires au niveau pré- et post-synaptique alors que le récepteur β_1 -adrénergique est exclusivement post-synaptique.

1.1.2 Structure des récepteurs β -adrénergiques

Les récepteurs β -adrénergiques font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G.⁹ Il s'agit de structures protéiques à 7 domaines transmembranaires hydrophobes de 22 à 28 acides aminés reliés entre eux en intra- et extra-cellulaire par des boucles hydrophiles (**Figure 1**).¹⁴ L'extrémité N-terminale (ou amino-terminale) de la protéine se situe du côté extracellulaire et comporte deux sites de N-glycosylation. Du côté extracellulaire, le site de fixation pour le ligand est formé par 3 domaines transmembranaires et 1 pont disulfure. L'extrémité C-terminale (carboxy-terminale) de la protéine se situe du côté intracellulaire et peut comporter des sites de phosphorylation.¹⁰ Du côté extracellulaire, le récepteur interagit avec une protéine G de type stimulatrice (G_s) ou inhibitrice (G_i).

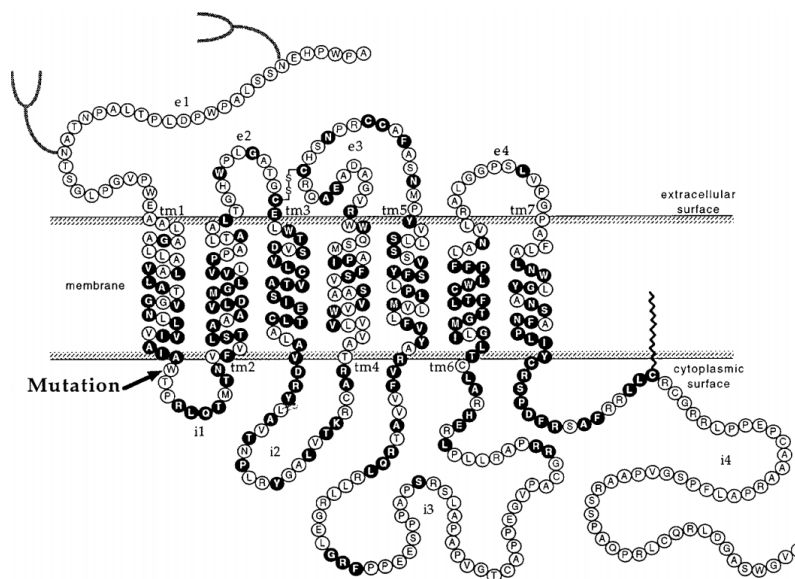


Figure 1 : Structure primaire du récepteur β -adrénergique humain. Reproduit d'après Stroberg et al.¹⁴ Les lettres correspondent aux acides aminés du récepteur β_3 , en noirs les communs avec les autres sous-types.

1.1.3 Polymorphisme des récepteurs β -adrénergiques

Plusieurs polymorphismes nucléotidiques ou SNP (single nucleotide polymorphism) ont été décrits sur les récepteurs β -adrénergiques de type $\beta 1$ ou $\beta 2$.¹⁵ Ces mutations sur un nucléotide peuvent changer un acide aminé clé de la protéine et ainsi moduler le couplage des récepteurs aux protéines G ou influencer la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs.

Le polymorphisme $\beta 1$ Arg389Gly (substitution d'une arginine par une glycine en position 389) affecte une portion du récepteur $\beta 1$ -adrénergique impliquée dans la liaison aux protéines G.¹⁶ La présence de l'allèle codant pour une arginine Arg389 est liée à une réponse inotrope et chronotrope positive plus importante après stimulation par dobutamine chez des sujets traités par inhibiteurs des récepteurs β -adrénergiques (β -bloquants).^{9, 16} Les études cliniques restent discordantes quant à l'impact sur l'évolution clinique des patients.¹⁵ Les sujets porteurs du polymorphisme Arg389 amélioreraient plus leur fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) sous β -bloquant que les sujets porteurs de Gly389.¹⁷

Le polymorphisme $\beta 2$ Glu27 (allèle codant pour un acide glutamique au lieu d'une glutamine en position 27) est l'un des principaux décrits pour le récepteur $\beta 2$ -adrénergique. Les patients porteurs de l'acide glutamique traités par β -bloquants au long cours ont une réponse chronotrope positive résiduelle à la dobutamine supérieure à ceux porteurs de la glutamine.¹⁶ Ils évoluent en revanche plus souvent vers la dilatation ventriculaire gauche après un infarctus du myocarde.¹⁶

1.1.4 Pharmacologie des récepteurs β -adrénergiques

L'adrénaline et la noradrénaline sont les deux catécholamines endogènes agonistes naturels des récepteurs β -adrénergiques. La noradrénaline est libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques. L'adrénaline est libérée par les glandes surrénales et apportée par la circulation sanguine. Les deux peuvent être directement synthétisés au niveau du tissu myocardique et agir de façon autocrine ou paracrine (**Figure 2**).^{5, 18}

D'autres agonistes ont été développés par l'industrie pharmaceutique comme la dobutamine, le salbutamol, la terbutaline et l'isoprotérénol. L'isoprotérénol est largement utilisé dans les études expérimentales car il présente pour les trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques une affinité plus importante que les autres agonistes. Le récepteur β 3-adrénergique est activé par de plus fortes concentrations d'agonistes que les récepteurs β 1 et β 2.¹⁰

Différents antagonistes ont été développés par l'industrie pharmaceutique et sont largement utilisés dans les troubles du rythme, l'insuffisance coronaire ou même l'insuffisance cardiaque. L'inhibition peut être spécifique à certains sous-types de récepteur. Le nébivolol allie même une inhibition des récepteurs β 1 et une activation des récepteurs β 3-adrénergiques.

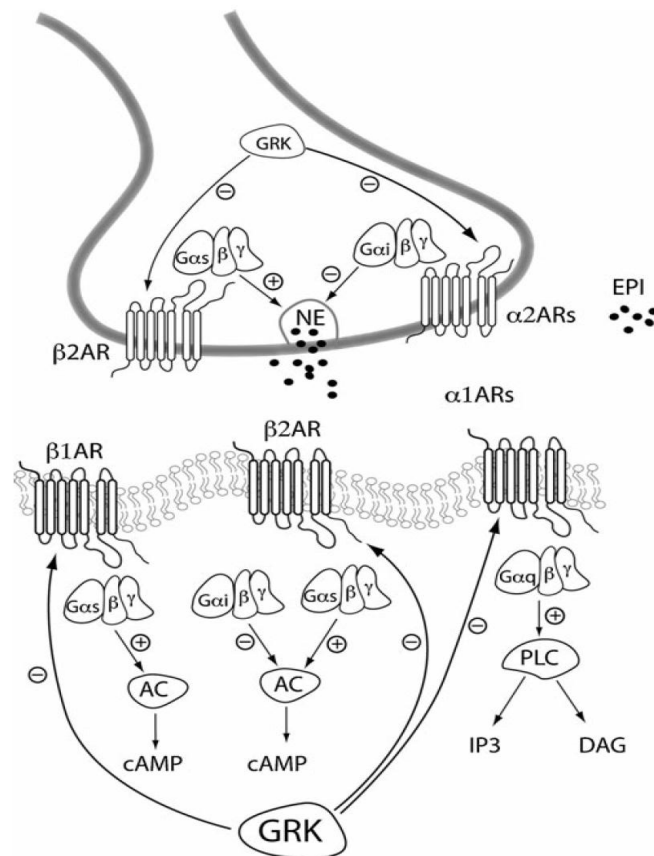


Figure 2 : Représentation schématique des récepteurs et de la signalisation β -adrénergique cardiaques. Reproduit d'après Davis et al.¹⁵

β 1AR : récepteur β 1-adrénergique, β 2AR : récepteur β 2-adrénergique, α 1AR : récepteur α 1-adrénergique, α 2AR : récepteur α 2-adrénergique, NE: norépinéphrine ou noradrénaline, EPI: épinéphrine ou adrénaline, G_{αs}: sous-unité α stimulatrice de protéine G, G_{αi}: sous-unité α inhibitrice de protéine G, β : sous-unité β de protéine G, γ : sous-unité γ de protéine G, AC: adénylate cyclase, GRK : kinase associée aux protéines G, PLC: phospholipase C, IP3: inositol triphosphate, DAG: diacylglycérol

1.2 Stimulation des récepteurs β -adrénergique et fonction cardiaque

1.2.1 Couplage excitation-contraction

La dépolarisation cellulaire induit l'ouverture des canaux calciques lents et l'entrée d'une petite quantité de calcium dans la cellule. Celui-ci stimule la libération massive de calcium du réticulum sarcoplasmique par le récepteur à la ryanodine (**Figure 3**). Le calcium se fixe sur la troponine C ce qui change la conformation de la tropomyosine. L'interaction

entre actine et myosine est libérée. La bascule de la tête de myosine sur l'actine provoque le raccourcissement du sarcomère et la contraction musculaire. Un apport d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) et la disparition du calcium cytosolique permettent la levée de l'interaction actine-myosine et la relaxation.

Le taux de calcium dans le cytosol est l'élément clé du cycle contraction-relaxation de la cellule musculaire cardiaque. Sa variation est appelée transitoire calcique. Le rôle des entrée et sortie de calcium à chaque cycle cardiaque est minoritaire dans la transitoire calcique par rapport à la mobilisation du calcium du réticulum sarcoplasmique.¹⁹ Le mécanisme d'amplification de la variation de la concentration cytosolique en calcium est nommé « calcium-induced calcium release » (**Figure 3**).¹⁹ La décroissance de la concentration cytosolique en calcium est principalement due au recaptage dans le réticulum sarcoplasmique par SERCA2a (SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase).

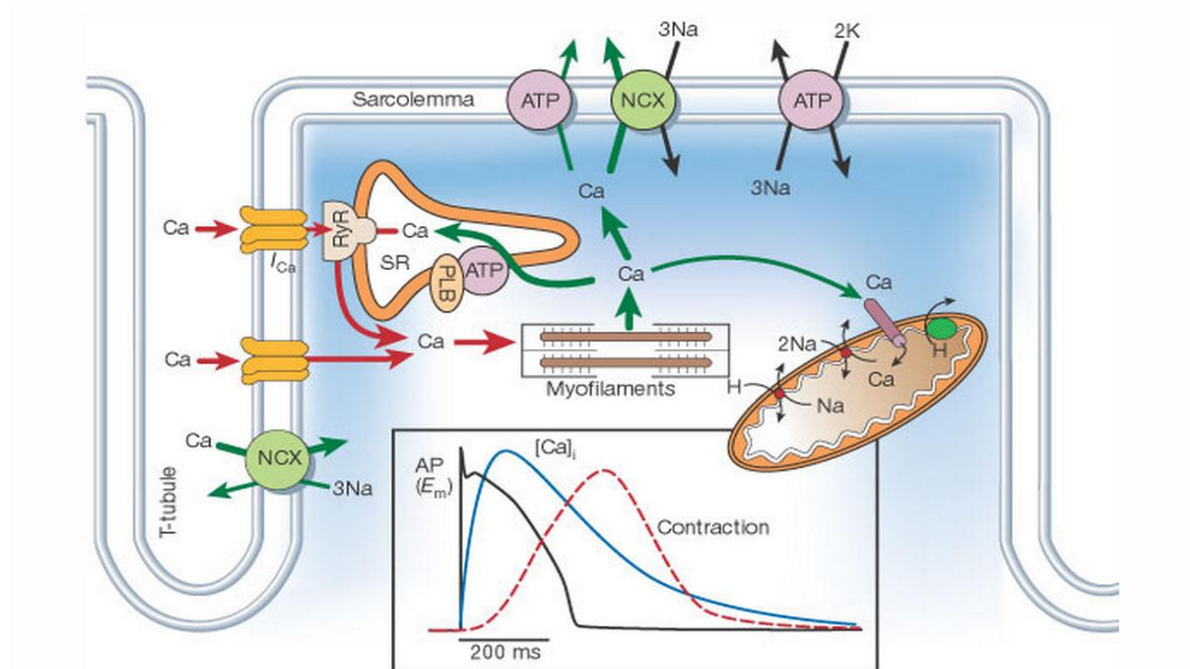


Figure 3 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction des mouvements calciques et du potentiel d'action dans le cardiomyocyte. Reproduit d'après Bers et al.¹⁹

NCX: échangeur sodium-calcium, SR: réticulum sarcoplasmique, PLB: phospholamban, ATP: adénosine triphosphate.

1.2.2 Contractilité cardiaque

La signalisation β -adrénergique décrite ici correspond à la voie de signalisation principale après la stimulation des récepteurs β 1-adrénergiques. Les voies de signalisation après stimulation des récepteurs β 2- et β 3-adrénergiques sont décrites plus loin.

L'activation d'un récepteur β -adrénergique par la liaison avec un ligand agoniste à la surface d'une cellule active la protéine G associée au récepteur en catalysant l'échange d'un guanosine diphosphate (GDP) pour un guanosine triphosphate (GTP).²⁰ Dans le cas d'une protéine de type G_s , la sous-unité active G_α de la protéine G est libérée¹⁸ et stimule l'activité de l'adénylate cyclase 5 et 6. Cette enzyme catalyse la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), second messenger intracellulaire de la signalisation β -adrénergique.²¹ L'AMPc active la protéine kinase-AMPc dépendante (PKA). Sa sous-unité catalytique va ensuite phosphoryler de nombreux effecteurs de la réponse à la stimulation β -adrénergique (Figure 4).²⁰

- Le canal calcique lent voltage-dépendant qui augmente le courant I_{CaL} d'entrée de calcium dans la cellule.
- Le récepteur à la ryanodine qui libère plus facilement le calcium du réticulum sarcoplasmique, ces deux premiers mécanismes induisant une augmentation de la contractilité cardiaque ou effet inotrope positif.
- SERCA2a qui assure l'essentiel du recaptage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. Cela induit à la fois un effet lusitrope positif par amélioration de la relaxation musculaire et un effet inotrope positif en augmentant le stock calcique disponible pour le cycle suivant.²²
- Le phospholamban qui lève l'inhibition qu'il exerce sur l'activité de SERCA2a à l'état non phosphorylé.

- La troponine I et la protéine C ou MyBP-C (myosin binding protein C) ce qui abaisse l'affinité de la troponine C pour le calcium et facilite son relargage et améliore la cinétique de l'interaction actine-myosine (effets lusitrope et inotrope positifs).²⁰

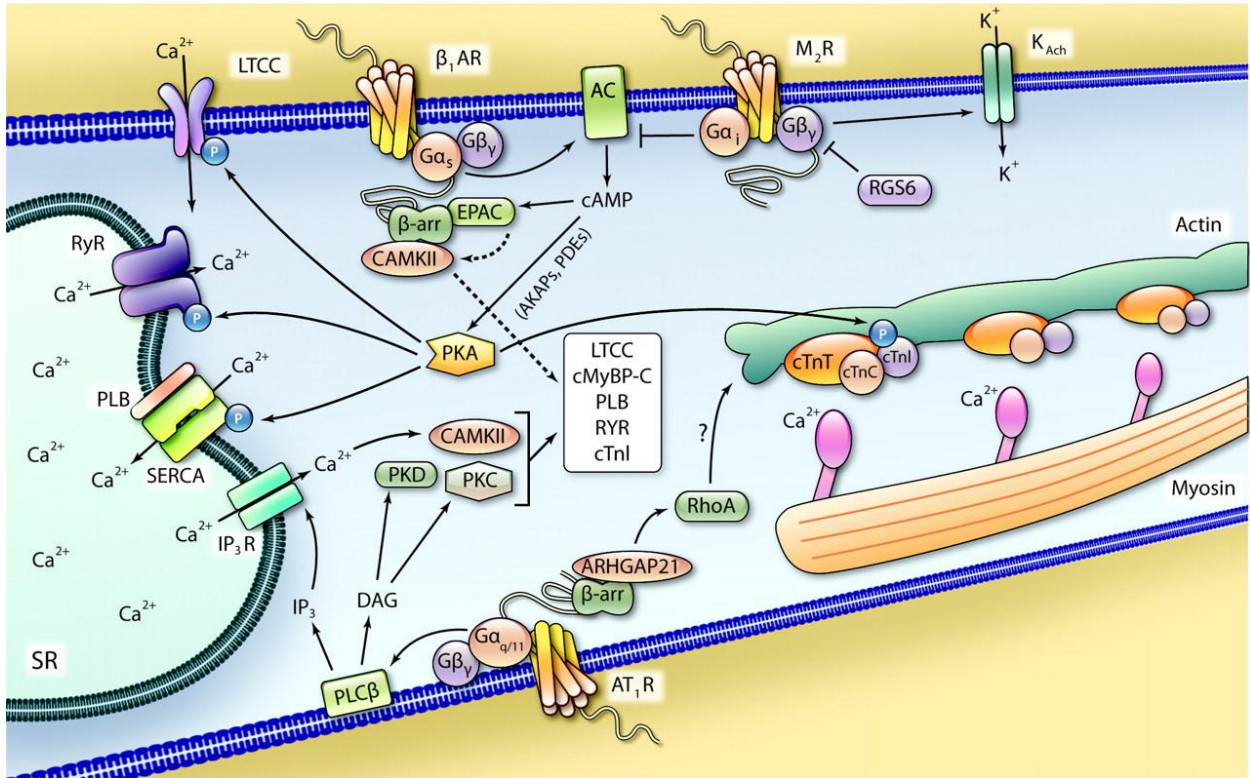


Figure 4 : Représentation schématique de la signalisation intracellulaire des récepteurs aux protéines G. Reproduit d'après Tilley et al.²⁰

LTCC : canal calcique lent, β_1 AR : récepteur β_1 -adrénergique, M_2 R : récepteur muscarinique de type 2, K_{Ach} : courant potassique muscarinique, AC : adénylate cyclase, $G_{\alpha s}$: sous-unité α stimulatrice de protéine G, $G_{\beta\gamma}$: sous-unités β et γ de protéine G, $G_{\alpha i}$: sous-unité α inhibitrice de protéine G, RGS6 : protéine 6 de régulation de protéines G, cAMP : adénosine monophosphate cyclique, EPAC : protéine d'échange activée par l'AMPc, β -arr : β arrestine, CAMKII : protéine kinase calcium-calmoduline dépendante, AKAP : protéine d'ancrage de PKA, PDE : phosphodiesterase, PKA : protéine kinase activée par l'AMPc, SR : réticulum sarcoplasmique, RYR : récepteur à la ryanodine, PLB : phospholamban, SERCA : SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase, IP $_3$: inositol triphosphate, IP $_3$ R : récepteur de l'IP $_3$, PLC β : phospholipase C β , DAG : diacylglycérol, PKD : protéine kinase D, PKC : protéine kinase C, cMyBP-c : protéine C de liaison à la myosine, cTnI : troponine I, cTnT : troponine T, cTnC : troponine C, ARHGAP21 : protéine 21 d'activation de la rho GTPase, $G_{\alpha q/11}$: sous-unité α q/11 activatrice de protéine G, AT_1 R : récepteur à l'angiotensine 1.

Sous l'effet de l'activation des récepteurs β_1 -adrénergiques, la contraction et la relaxation du muscle cardiaque sont améliorées. L'augmentation de la contractilité cardiaque se traduit par une contraction musculaire plus rapide et plus puissante. La fraction de raccourcissement des ventricules (FRVG) augmente. La vidange des cavités ventriculaires (surtout gauche) en systole est renforcée avec une diminution du diamètre télé-systolique, une augmentation de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) (**Figure 5**). L'augmentation du volume d'éjection systolique participe à l'augmentation du débit cardiaque, l'autre paramètre étant la fréquence cardiaque comme nous allons le voir ensuite. La relaxation du muscle cardiaque est plus rapide. La stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques a ainsi des effets inotropes et lusitropes positifs puissants qui sont les premiers régulateurs de la contractilité cardiaque en physiologie.⁶

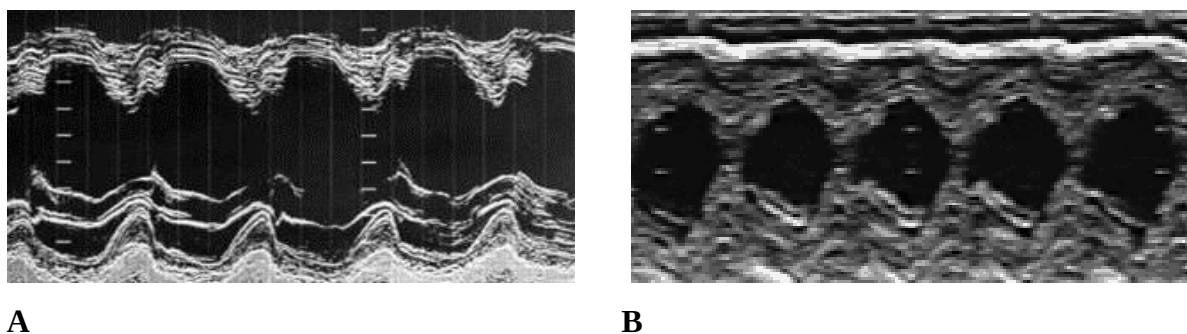


Figure 5 : Illustration de l'effet inotrope positif de l'isoprotérénol en échocardiographie en coupe parasternale grand axe. Par rapport à l'état basal (**A**), la contractilité ventriculaire gauche augmente sous isoprotérénol ($10\gamma\text{gr.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) (**B**). Images de collection personnelle obtenues sur des rats Wistar mâles de 12 semaines.

1.2.3 Electrophysiologie

La stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques induit une augmentation de la fréquence ou effet chronotrope positif par la modulation conjointe des courants calcique lent

I_{CaL} , des courants sodique et potassique entrants (I_{st}) et du courant I_{ha} issu du canal HCN (Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel).²³ Ce dernier courant aussi appelé I_f ou courant pacemaker est à la base de la pente de dépolarisation diastolique dans les cellules du nœud sino-auriculaire. Un courant plus important accentue la pente de dépolarisation aboutissant à un potentiel d'action plus précoce et *in fine* une augmentation de la fréquence cardiaque.²⁴

Les canaux sodiques sont également la cible d'une phosphorylation par la PKA. Dans le nœud auriculo-ventriculaire, l'augmentation des courants entrants sodique I_{Na} et calcique I_{CaL} facilite la conduction cardiaque, d'où l'effet dromotrope positif de la stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques.

1.3 Autres effets de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques.

1.3.1 Désensibilisation et downregulation des récepteurs β -adrénergiques

La stimulation des récepteurs β -adrénergiques induit dans le même temps des mécanismes d'atténuation de son propre signal par la diminution des récepteurs exposés à la surface de la cellule par l'internalisation des récepteurs puis la régulation de leur expression et le changement de sous-type de récepteur.

Dès les premières minutes de la stimulation, les récepteurs de type β_1 et β_2 adrénergiques sont phosphorylés par la PKA sur l'extrémité C-terminale de la protéine. La PKA active en parallèle des kinases nommées GRK pour G protein receptor kinase^{5, 7} qui vont compléter la phosphorylation des récepteurs. La kinase la plus décrite est GRK2, aussi nommée β -ARK1 pour kinase des récepteurs β_1 , dont l'expression est augmentée lors de la stimulation chronique des récepteurs β -adrénergiques.²⁵ Le récepteur phosphorylé a une

affinité moins importante pour la protéine G et cela induit un découplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G qui interrompt le signal.^{5, 26}

Ensuite, la phosphorylation du récepteur favorise la liaison avec les arrestines et l'internalisation du récepteur dans des vésicules mantelées de clathrine.²⁶ Le récepteur est ensuite déphosphorylé puis réadressé à la membrane ou détruit par les lysosomes dans les heures qui suivent le début de la stimulation. Cela limite l'exposition des récepteurs à la surface de la cellule et donc la sensibilité à la stimulation β -adrénergique. Le récepteur β 3-adrénergique ne présente pas ce site de phosphorylation à l'extrémité C-terminale.¹³ Il est donc peu affecté par le phénomène de désensibilisation aux catécholamines.^{10, 14} Une phosphorylation de la queue du récepteur β 3-adrénergique dans l'isoforme β 3b-AR a été décrite chez la souris. Elle pourrait induire une désensibilisation à la stimulation du récepteur β 3-adrénergique.¹⁰

Secondairement, l'expression des récepteurs β -adrénergiques est modifiée avec une diminution de l'expression du sous-type β 1 sans réduction de l'expression du β 2.^{5, 26} Le ratio β 1/ β 2 passe donc de 80:20 dans le cœur sain à 50:50 dans l'insuffisance cardiaque chronique.⁵ L'expression du récepteur β 3-adrénergique augmente, elle, dans certaines conditions comme l'insuffisance cardiaque¹⁰ ou la sénescence⁸ et inverse le ratio β 1/ β 3 avec même une prédominance possible du sous-type β 3 sur le sous-type β 1.^{2, 8} Le rôle de ces voies de signalisation est décrit plus loin.

1.3.2 Effets hypertrophiques et apoptotiques de la stimulation chronique β 1-adrénergique

De nombreuses études expérimentales ont utilisé l'administration chronique d'isoprotérénol ou de noradrénaline comme modèle d'insuffisance cardiaque chronique. La

stimulation prolongée des récepteurs β -adrénergiques provoque en effet un remodelage cardiaque^{27, 28} avec en particulier une hypertrophie ventriculaire²⁸ qui mène à l'insuffisance cardiaque²⁷ par plusieurs voies de signalisation sous-jacentes.²⁵

En dehors de la voie de la PKA, l'AMPc active Epac (protéine d'échange activée par l'AMPc). Epac et PKA sont responsables de l'activation des kinases de la famille MAPK (Mitogen-activated protein kinases) aussi nommée ERK (extracellular signal regulated kinase) qui ont des effets bénéfiques anti-apoptotiques.^{25, 29}

La PKA active le facteur de transcription nucléaire CREM (cAMP-response element modulator) qui promeut l'hypertrophie et la fibrose cardiaque.²⁷ Sous l'effet de la stimulation par isoprotérénol, la protéine Epac active elle aussi la transcription d'un facteur pro-hypertrophique via l'histone déacétylase 4 (HDAC4).²¹ De plus, Epac active la phospholipase C, la protéine kinase C et la CAMKII (protéine kinase calcium-calmoduline dépendante) ce qui induit un effet inotrope positif modéré indépendant de la voie de la PKA.²⁰ La CAMKII est également activée directement par l'augmentation du calcium intracellulaire sous l'effet de la stimulation β -adrénergique.⁷ Elle déréprime la transcription de gènes pro-hypertrophique via les histones déacétylase²⁷ et participe au remodelage cardiaque⁷ mais aussi à l'activation de l'apoptose des cardiomyocytes.^{5, 28}

L'activation chronique des récepteurs β -adrénergiques est observée sous l'effet d'un stress chronique ou en réponse à l'étirement des cardiomyocytes. Des concentrations tissulaires et plasmatiques élevées de noradrénaline peuvent être une cause ou une conséquence de l'insuffisance cardiaque chronique. Le mécanisme initialement compensateur aggrave le pronostic à long terme ce qui explique le succès clinique du traitement par β -bloquant dans l'insuffisance cardiaque chronique.²⁵

1.3.3 Signalisation issue du récepteur β 2-adrénergique

Dans le cœur sain, les récepteurs β 2-adrénergiques représentent environ 20% de l'ensemble des récepteurs β 2-adrénergiques et sont localisés au niveau des cavéoles. A l'état basal, ils sont couplés avec des protéines G de type G_s et produisent un signal AMPc très localisé, confiné aux cavéoles par les phosphodiésterases.⁷ L'effet inotrope positif est moins important que lors de la stimulation des récepteurs β 1-adrénergiques.

Sous l'effet de la stimulation β -adrénergique, la signalisation β 2-adrénergique augmente et se modifie. Alors que l'expression du récepteur β 2-adrénergique ne diminue pas,^{5, 26} le confinement aux cavéoles disparaît sous l'effet de la stimulation β -adrénergique dans l'insuffisance cardiaque²⁵ avec la surexpression de la cavéoline 3. De plus, le récepteur β 2 se lie à une protéine G de type G_i au lieu d'une protéine G_s .^{5, 7} Les protéines G_i activent les phosphodiésterases 4 qui détruisent l'AMPc et donc inhibe l'activité de la PKA contrairement à la signalisation des protéines G_α . Le recrutement de la phospholipase A2 cytosolique a un effet inotrope positif modéré via une action de l'acide arachidonique sur les canaux I_{CaL} , les récepteurs à la ryanodine et la protéine kinase C.²⁹ Par ailleurs l'activation de G_i stimule d'autres voies de signalisation comme celle de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) couplée à Akt (protéine kinase B) (**Figure 6**) qui a des effets bénéfiques anti-apoptotiques^{30, 31} par une diminution du stress oxydant.⁷ La levée du confinement de la stimulation β 2-adrénergique dans l'insuffisance cardiaque chronique pourrait expliquer l'effet pro-apoptotique observé lors de la stimulation prolongée.²⁵ La régulation de la contractilité cardiaque n'est donc qu'un objectif secondaire de la signalisation β 2-adrénergique.²⁹

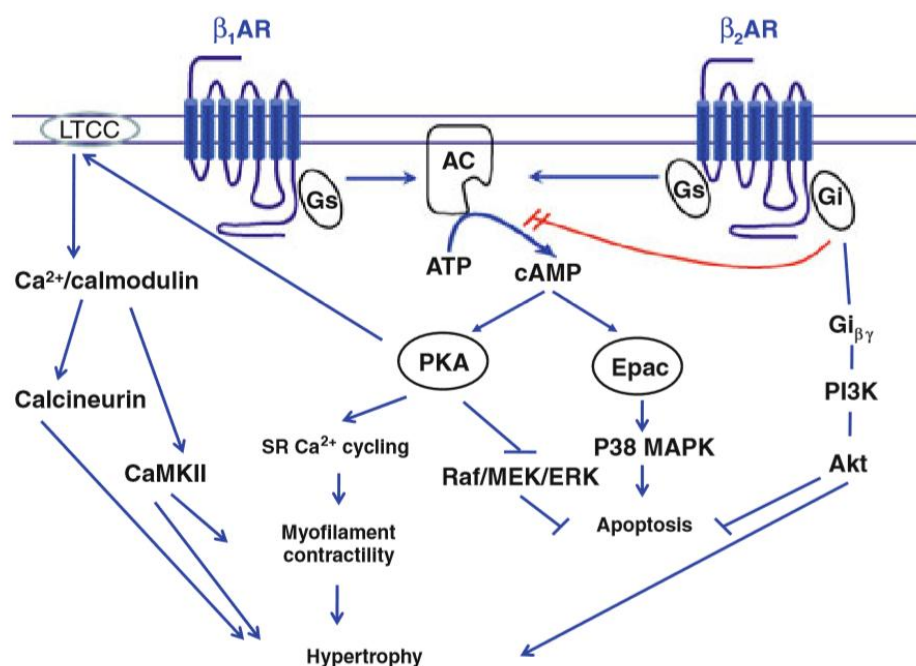


Figure 6 : Représentation schématique de la signalisation des récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques dans les cardiomyocytes. Reproduit d'après Ho et al.²⁵

β_1 AR : récepteur β_1 -adrénergique, β_2 AR : récepteur β_2 -adrénergique, LTCC : canal calcique lent, AC : adénylate cyclase, G_s : protéine G, stimulatrice, G_i : protéine G inhibitrice, ATP : adénosine triphosphate, cAMP : adénosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase activée par l'AMPc, EPAC : protéine d'échange activée par l'AMPc, CaMKII : protéine kinase calcium-calmoduline dépendante, SR : réticulum sarcoplasmique, Raf : rapidly accelerated fibrosarcoma kinase, MEK : mitogen extracellular kinase, ERK extracellular signal regulated kinase, MAPK : mitogen activated proteins kinases, $G_{i\beta\delta}$: sous-unités β et δ de protéine G inhibitrice, PI3K : phosphoinositide 3 kinase, Akt : protéine kinase B

1.3.4 Signalisation issue du récepteur β_3 -adrénergique

Le récepteur β_3 -adrénergique est peu exprimé dans les cœurs sains où son impact sur la contraction cardiaque est minoritaire.¹⁰ En revanche, sa surexpression par rapport au récepteur β_1 lui donne un rôle particulier dans de nombreuses conditions pathologiques.^{2,8} Le récepteur β_3 -adrénergique est couplé à une protéine G de type G_i qui active la nitrite oxyde synthase de type 3 (NOS3 ou eNOS). L'oxyde nitrite active la guanylyl cyclase qui produit à son tour du GMPc (guanosine monophosphate cyclique) (**Figure 7**).³² Le GMPc active les

phosphodiésterases qui limitent l'activation de la PKA en détruisant l'AMPc. Le GMPc active par ailleurs la protéine kinase G. Celle-ci a de nombreux effets intracellulaires sur les myofilaments, les mitochondries, les phosphodiésterases, les récepteurs à l'angiotensine.

Tous ces mécanismes contribuent à limiter l'effet inotrope positif de la voie de signalisation des récepteurs β_1 -adrénergiques alors que l'effet lusitrope positif est préservé. La stimulation des récepteurs β_3 -adrénergiques conserve un effet chronotrope positif mais il est indirect et dû à l'activation du baroréflexe par la vasodilatation.¹⁰

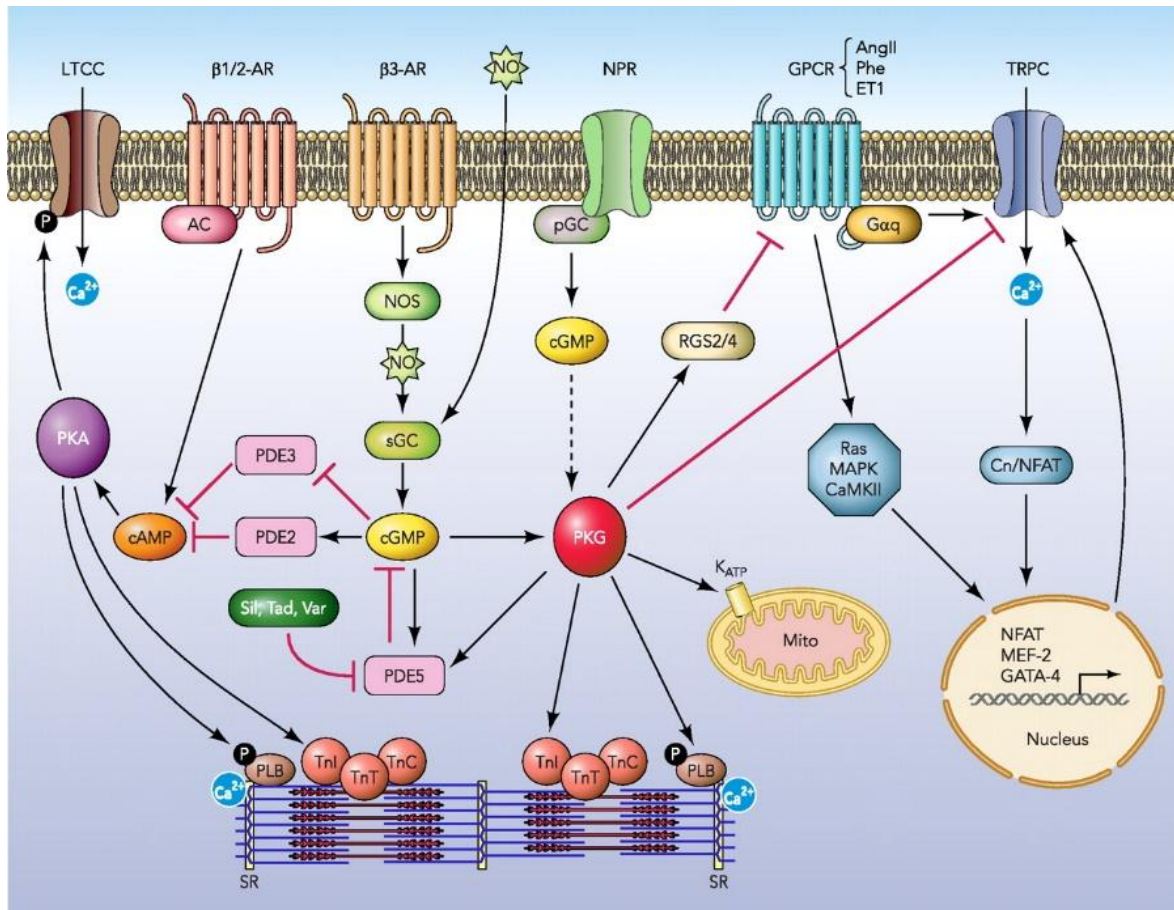


Figure 7 : Représentation schématique de la signalisation intracellulaire issue du récepteur $\beta 3$ -adrénergique. Reproduit d'après Lee et al.³²

LTCC : canal calcique lent $\beta 1/2$ -AR : récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ -adrénergiques, $\beta 3$ AR : récepteur $\beta 3$ -adrénergique, NO : oxide nitrique, NPR : récepteur aux peptides natriurétiques, GPCR : récepteur associé aux protéines G, AngII : angiotensine II, Phe : ET1 : endothéline 1, TRPC : canaux calciques TRP (transient receptor potential), AC : adénylate cyclase, pGC : guanylyl cyclase, $G\alpha q$: sous-unité αq de protéine G, NOS : nitrite oxide synthase, cGMP : guanosine monophosphate cyclique, RGS2/4 : régulateur de protéine G 2/4, PKA : protéine kinase activée par l'AMPc, cAMP : adénosine monophosphate cyclique, PDE : phosphodiesterase, Sil : sildénafil, Tad : Var : , sGC : guanylate cyclase soluble, PKG : protéine kinase G, Mito : mitochondrie, K_{ATP} : canal potassique ATP dépendant, MAPK : mitogen activated proteins kinases, CaMKII : protéine kinase calcium-calmoduline dépendante, Cn: calcineurine, NFAT : facteur nucléaire des lymphocytes activés, MEF-2 : facteur myocytaire de transcription 2, GATA-4 : facteur de transcription GATA-4, PLB : phospholamban, TnI : troponine I, TnC : troponine C, TnT : troponine T, SR : réticulum sarcoplasmique.

1.4 Régulation de la signalisation β 1-adrénergique

La stimulation des récepteurs β -adrénergiques a des effets puissants et potentiellement néfastes à long terme comme décrit précédemment. De nombreux mécanismes existent pour freiner la signalisation et protéger le cœur d'un fonctionnement en surrégime. Le recaptage présynaptique du neurotransmetteur comme la noradrénaline et sa dégradation limitent la stimulation directe des récepteurs.⁶ La désensibilisation des récepteurs par le découplage de la protéine G, l'internalisation puis le changement de types de récepteurs est un élément d'adaptation largement étudié. La régulation du second messager intracellulaire a connu des avancées plus récentes. La dégradation rapide de l'AMPc par les phosphodiésterases (PDE) évite la pérennisation du signal d'activation. Les études ont décrit une augmentation de cette dégradation en pathologie comme l'insuffisance cardiaque⁶ et plus récemment une diffusion plus ou moins restreinte de l'AMPc et du signal d'activation et la possibilité d'un mécanisme régulateur par extrusion.

1.4.1 Compartimentalisation subcellulaire et signalisation β -adrénergique.

De nouvelles techniques expérimentales ont permis de montrer ces dernières années l'importance de l'organisation spatiale de la cellule dans son fonctionnement et du contrôle local des signalisations intracellulaires.³³

Les tubules T ont été identifiés depuis de nombreuses années par microscopie. Ils concentrent les canaux calciques lents et les échangeurs calcium-sodium NCX. Le réticulum sarcoplasmique est situé en regard des canaux formant les unités fonctionnelles du couplage excitation-contraction appelées dyades.

Les récepteurs β -adrénergiques sont localisables à la surface de la cellule par des techniques de marquages moléculaires en microscopie confocale ou déconvolution. Leurs interactions fonctionnelles avec d'autres protéines peuvent être étudiées par coimmunoprécipitation. Cette technique reste peu précise en raison de la faiblesse chronique des anticorps disponibles. Les concepts sur l'organisation spatiale de la signalisation β -adrénergique ont été complètement bouleversés par les techniques de fluorescence ces dernières années. L'évaluation de l'AMPc intracellulaire produit après stimulation β -adrénergique passait jusque-là par une mesure radio-immunologique ou immunoenzymatique du contenu global de la cellule. La technique de FRET (fluorescence resonance energy transfer) avec des sondes spécifiques correspondant à différents éléments de la signalisation β -adrénergique a clairement montré que la diffusion intracellulaire du signal n'est pas uniforme. Dans des cardiomyocytes de souris, il a été ainsi possible de visualiser au microscope optique la propagation de l'AMPc.³⁴ Dans des cardiomyocytes adultes soumis à une stimulation β -adrénergique, la concentration cytosolique globale d'AMPc mis en évidence par la sonde Epac2-camps (sonde analogue à Epac de type 2) est supérieure à celle observée dans les microdomaines associés à la PKA mis évidence avec un autre senseur.³⁵ Ces données ont amené au concept de microdomaines cellulaires physiques et fonctionnels.³⁵

³⁶ Des modèles de compartimentation cellulaire ont été construits afin de mieux comprendre l'action de la stimulation β -adrénergique^{35, 36} et le rôle des différents acteurs de la signalisation.

Plusieurs caractéristiques du cardiomyocytes permettent de contenir la signalisation β -adrénergique. Les récepteurs β 1-adrénergiques sont répartis à la surface de la membrane plasmique alors que les récepteurs β 2-adrénergiques sont concentrés au niveau des cavéoles dans le cœur sain.^{37, 38} L'importance des phosphodiesterases dans ce microdomaine détruit l'AMPc avant sa diffusion à l'ensemble de la cellule (**Figure 8**).³⁸ Le signal β 2 reste très

localisé sans accès aux myofilaments par exemple et produit un effet inotrope positif faible. Le signal des récepteurs β_1 diffuse au contraire sur des cibles localisées dans toute la cellule : membrane plasmique (canaux I_{CaL}), réticulum sarcoplasmique (récepteur à la ryanodine, SERCA2a, phospholamban) et myofilaments (troponine I).³⁸ Les cavéoles se comportent comme des plateformes pour l'interaction de plusieurs protéines, constituant des « signalosomes ».^{33 37} Dans le cardiomyocyte sain, les cavéoles concentrent aussi NOS3 et les phosphodiésthérases.³⁹ Après activation de NOS3, l'AMPc produit par la signalisation β -adrénergique est dégradé localement par les phosphodiésthérases principalement la PDE 4 et accessoirement la PDE3 avant sa diffusion à l'ensemble de la cellule.⁴⁰ Cette organisation spatiale génère des pools locaux d'AMPc étroitement régulés (**Figure 4**).³⁹ L'AMPc n'est pas un second messager spécifique de la signalisation β -adrénergique mais peut en effet être généré par d'autres voies de signalisation utilisant des récepteurs à protéines G.³⁸ La compartimentalisation permet à partir d'une même stimulation des récepteurs la régulation individuelle de multiples signalisations sur des substrats spécifiques d'affinité pour l'AMPc différente et de rôles différents.³⁵ Elle oriente les effets de l'AMPc produit lors de stimulation β_1 -adrénergique vers la régulation de la contractilité.

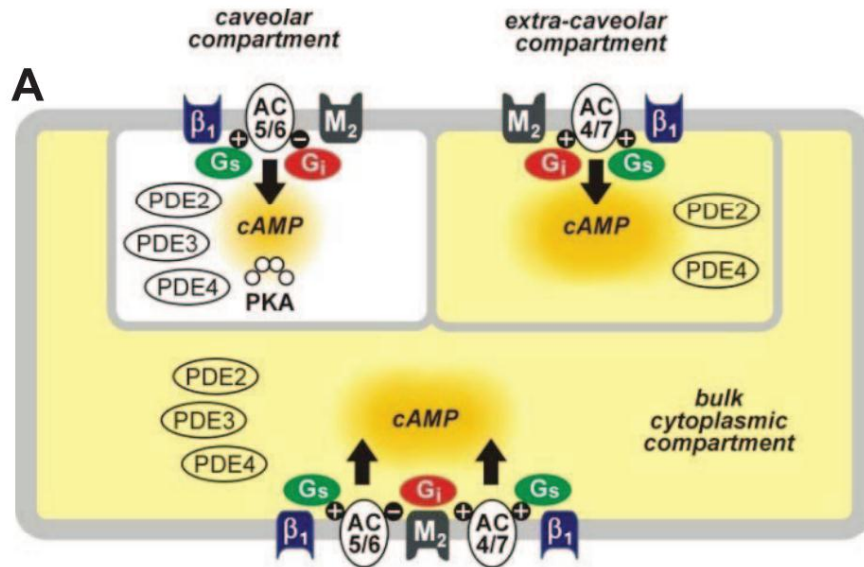


Figure 8 : Représentation schématique des microdomaines intracellulaires d'AMPc. Reproduit d'après Iancu et al.³⁵

β_1 : récepteur β_1 -adrénergique, M_2 : récepteur muscarinique de type 2, AC5/6 : adénylate cyclase 5/6, G_s : protéine G, stimulatrice, G_i : protéine G inhibitrice, cAMP : adénosine monophosphate cyclique, PDE : phosphodiésterases, PKA : protéine kinase activée par l'AMPc.

La PKA est confinée à certaines zones cellulaires par des protéines d'ancrage spécifiques nommées AKAPs (A-kinase anchoring proteins).^{20, 21} La concentration cellulaire d'AMPc cytosolique en dehors de toute stimulation suffirait à activer la PKA en permanence.³⁵ La PKA doit donc être maintenue dans des zones de plus faible concentrations d'AMPc. De plus, elle se trouve confinée à proximité des effecteurs comme le réticulum sarcoplasmique, les canaux calciques lents ou les myofilaments.²⁰ Le calcium est impliqué dans différents processus intracellulaires et est lui aussi organisé en pools selon des fonctions précises : contraction, signalisation hypertrophique, apoptose...³⁹

La compartimentalisation des signalisations intracellulaires est modifiée dans de nombreuses pathologies. Dans l'insuffisance cardiaque chronique, les récepteurs β_2 -

adrénergiques sont retrouvés sur toute la surface de la cellule et modifient la signalisation sous-jacente (cf. signalisation des récepteurs β 2-adrénergiques). Néanmoins, la contribution relative de chaque microdomaine et de chaque effecteur reste difficile à déterminer. Les études de FRET nécessitent des modifications génétiques qui sont par exemple difficilement compatibles avec les modèles de cardiopathie sénescence ou diabétiques.

1.4.2 Extrusion de l'AMPc par MRP4

Le transporteur MRP4 (multidrug resistance associated protein 4) a été récemment identifié comme un mécanisme complémentaire de régulation de la concentration d'AMPc dans les cellules musculaires lisses vasculaires^{41, 42} et les cardiomyocytes.²¹ MRP4 (ou ABCC4) est un canal transmembranaire initialement décrit dans les résistances aux chimiothérapies anti-cancéreuses où il permet aux cellules malignes d'extruder les médicaments.^{43, 44} D'autres études ont ensuite montré un rôle important de comme effluent des nucléotides cycliques dont l'AMPc.^{40, 41, 45}

MRP4 fait partie de la superfamille des transporteurs actifs de type ABC (ATP-Binding Cassette).⁴³ Il s'agit du plus petit des transporteurs de cette classe. La protéine est codée par le gène *ABCC4* située sur le chromosome 13 (position 13q32) qui comporte 31 exons.⁴⁴ De nombreux variants ont été identifiés mais peu de mutations affectent la fonction de transport du récepteur.⁴⁶ La protéine MRP4 est formée de deux domaines de liaison aux nucléotides intercalés avec deux domaines transmembranaires constitués chacun de 6 portions transmembranaires (**Figure 9**).⁴⁷ Elle présente par ailleurs un motif PDZ d'interaction avec d'autres protéines transmembranaires comme le transporteur CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).⁴⁸

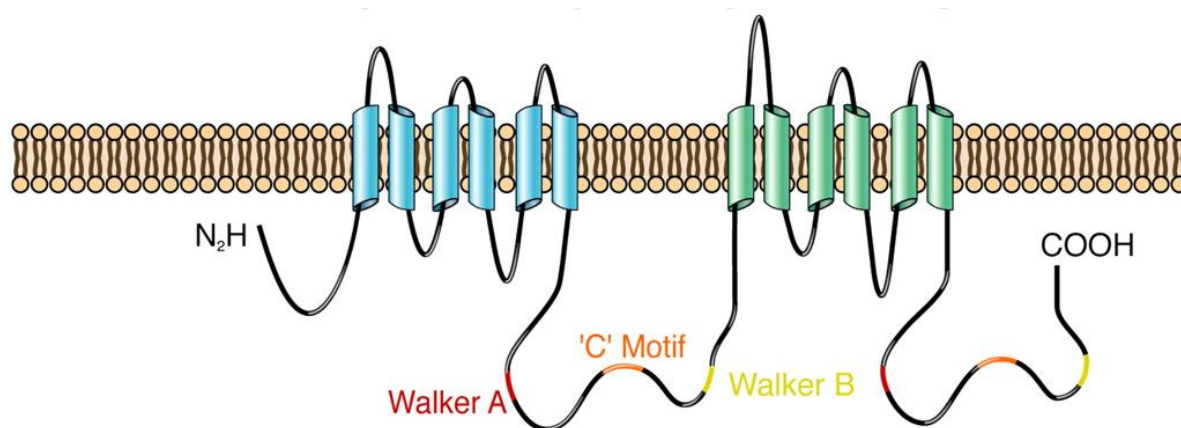


Figure 9 : Représentation schématique du canal MRP4. Reproduit d'après Deeley et al.⁴⁷

L'expression de MRP4 est presque ubiquitaire^{46, 49} et semble sous contrôle des facteurs de transcription NF-E2 (NF-E2-related factor 2) et AhR (aryl hydrocarbon receptor) dans le foie.⁵⁰ La nexine 27 joue un rôle dans l'internalisation et la dégradation du transporteur.⁵¹ Le rôle de MRP4 a été particulièrement étudié dans le foie,⁴³ le rein,⁵² les plaquettes.⁵² MRP4 est l'isoforme des MRPs la plus abondante au niveau du cœur.²¹ Il a été mis en évidence chez l'homme comme chez le rat et se situe dans les cavéoles des cardiomyocytes adultes atriaux et ventriculaires.²¹

MRP4 permet l'extrusion de nombreuses molécules par un transport actif compétitif : nucléotides cycliques^{41, 43, 52} (dont l'AMPc)⁵³ mais aussi acides biliaires, glutathion, prostaglandines,^{21, 52} eïcosanoïdes, hormones stéroïdes et acide urique.⁵⁴ Il intervient dans la signalisation β -adrénergique comme effluent de l'AMPc intracellulaire (**Figure 10**)^{21, 41, 42}. Son action reste toutefois limitée dans les tissus sains, la sensibilité de MRP4 pour l'AMPc étant faible.^{49, 54} L'activité de transport de MRP4 peut être inhibée par le dipyridamole, l'indométacine, l'ibuprofène ou le MK571.⁵² Les toxines urémiques accumulées en cas d'insuffisance rénale peuvent expérimentalement inhiber le transport médié par MRP4.⁵⁵

In vivo les souris Mrp4^{-/-} avec une inhibition constitutive de l'expression de MRP4 par invalidation génique (knock-out ou KO) sont plus sensibles à l'accumulation de médicaments⁴⁶ et de nucléotides en particulier dans les cellules hématopoïétiques. Une diarrhée sécrétoire en lien avec la diminution de fonction de CFTR a été décrite.⁴⁸ Sur le plan cardiaque, les souris Mrp4^{-/-} développent une hypertrophie ventriculaire avec une augmentation de la taille des cardiomyocytes.²¹ *In vitro* l'inhibition de MRP4 dans les cardiomyocytes de rats adultes n'affecte à l'état basal ni la concentration d'AMPc ni l'amplitude de la transitoire calcique.²¹

Dans les cardiomyocytes de souris Mrp4^{-/-}, l'absence de MRP4 induit une augmentation plus importante de l'AMPc intracellulaire, de l'amplitude de la transitoire calcique et de la contraction lors de la stimulation des récepteurs β -adrénergique par isoprotérénol.²¹ L'activité de la PKA est augmentée comme suggéré par l'hyperphosphorylation du récepteur à la ryanodine et de la troponine I.⁵⁶ Dans les cardiomyocytes, l'inhibition de MRP4 par interférence ARN augmente l'AMPc produit après stimulation des récepteurs β -adrénergiques par isoprotérénol⁴⁰ ou stimulation directe de l'adénylate cyclase par la Forskoline.²¹ Dans les souris Mrp4^{-/-}, l'inhibition de MRP4 semble transitoirement compensée par une augmentation de la dégradation de l'AMPc par les phosphodiesterases.²¹ MRP4 semble donc agir conjointement avec les phosphodiesterases pour réguler l'AMPc impliqué dans la signalisation β 1-adrénergique (**Figure 10**).

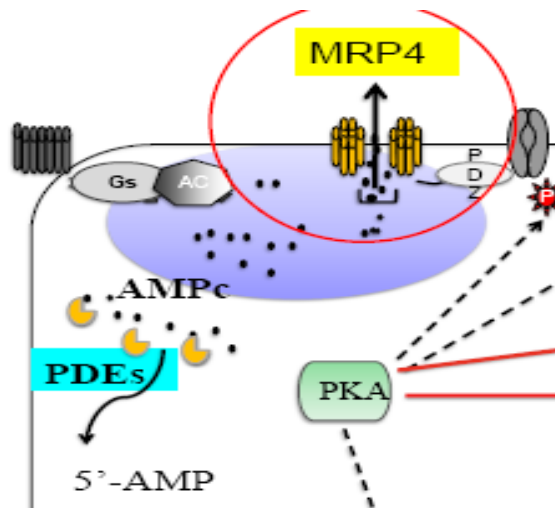


Figure 10 : Représentation schématique du rôle de MRP4 dans la signalisation β -adrénergique. Reproduit d'après des données personnelles de S. Hatem.

L'expression de MRP4 est modifiée dans de nombreuses pathologies. Dans le diabète, l'expression protéique hépatique et rénale de MRP4 est augmentée.⁵⁷ Une autre étude a retrouvé une augmentation de l'expression rénale de MRP4 dans le diabète ou la grossesse.⁵⁸ Au niveau cardiaque, l'expression de MRP4 est augmentée dans la cardiopathie hypertrophique chez la souris.⁵⁶

Ces études suggèrent que MRP4 pourrait être impliquée dans la dysfonction β -adrénergique de myocardes pathologiques. Cependant, son impact sur la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques n'a jamais été investigué à notre connaissance dans la cardiopathie sénescence ou diabétique.

2. Physiopathologie de la cardiopathie sénescence

Les projections statistiques anticipent un doublement de la population âgée de plus de 65 ans aux USA entre 2000 et 2030,⁵⁹ reflet du vieillissement important de la population.⁶⁰ Le vieillissement se définit par un processus continu de changements structuraux, biologiques et biochimiques dont les conséquences restent longtemps infra-cliniques et sont souvent aspécifiques de la sénescence. Plusieurs éléments rendent difficile l'examen de la sénescence dont la durée des études longues par nature et donc coûteuses, la variabilité interindividuelle, les mécanismes complexes et multifactoriels mis en jeu et la difficulté d'établir un seuil dichotomique.⁶¹ Le seuil de sénescence retenu dans les études est variables, 65ans⁶² selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé mais plus volontiers 75ans dans les nouvelles études menées dans les pays développés selon la définition gériatrique actuelle de la sénescence.

Les patients âgés sont globalement 4 fois plus exposés à la chirurgie et aux hospitalisations que les patients jeunes et ils sont plus fréquemment sujets aux complications en particulier sur le plan cardiovasculaire. Indépendamment de toute comorbidité, le cœur du sujet âgé présente des modifications importantes au niveau cellulaire et tissulaire qui altèrent sa fonction et se révèlent cruciales lors d'une situation de stress.

2.1 Le cardiomyocyte dans le cœur sénescence

Des changements complexes sont observés dans la morphologie, la structure et le fonctionnement des cellules cardiaques sénescence et en particulier des cardiomyocytes. La sénescence cellulaire est définie par l'arrêt du cycle de croissance et de multiplication cellulaire et le maintien en stade G0, la cellule poursuivant une activité métabolique.⁶³ Le

tissu cardiaque comporte ainsi des cellules capables de division cellulaire, ou cellules progénitrices, et des cellules en voie de sénescence.²² Le renouvellement cellulaire cardiaque et le fonctionnement des progéniteurs cardiaques sont particulièrement contrôlés par la voie de l'Insulin Growth Factor 1 (IGF-1).²² Une surexpression cardiaque de l'IGF-1 améliore les performances du cœur sénescant et corrige partiellement l'hypertrophie et la dilatation des cavités cardiaques.²²

2.1.1 Altérations génétiques au cours de la sénescence

A chaque multiplication cellulaire, des altérations génétiques se produisent sous forme de dégradation de l'ADN ou de raccourcissement des extrémités des chromosomes aussi appelées télomères.⁵⁹ Les télomères sont constitués de séquences répétées d'ADN qui forment des complexes avec des protéines à l'extrémité des chromosomes. Leur but est de maintenir la stabilité du génome chromosomique et de contrôler les étapes du cycle cellulaire. La longueur initiale des télomères est héréditaire et elle diminue à chaque cycle de division cellulaire, aboutissant à une longueur critique qui caractérise la sénescence de la cellule.⁶⁴ Les télomères constitueraient une sorte d'horloge biologique interne, en partie déterminée héréditairement,⁶⁴ l'inflammation et un stress oxydatif accru étant deux mécanismes importants d'accélération de la réduction de longueur des télomères. Le raccourcissement progressif des télomères à chaque division cellulaire aboutit à des cellules progénitrices cardiaques qui deviennent de plus en plus rapidement sénescantes.⁶⁴ L'accumulation de ces défauts contribue au vieillissement de la cellule et au phénotype de sénescence.

2.1.2 Epigénétique et micro-ARNs au cours de la sénescence

L'épigénétique regroupe tous les processus de régulation de l'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN. De nombreuses modifications épigénétiques ont été décrites dans la sénescence sur la chromatine (par exemple méthylation de l'ADN ou changement des histones), sur réseau permettant la transcription et sur le profil des ARNs.⁶⁵ Ces éléments participent au phénotype cellulaire de sénescence.

Les micro-ARNs ou miRs sont de petits ARNs de 22 nucléotides monobrans et non codants pour des protéines. Ils modulent l'expression des protéines en inhibant la traduction de l'ARN messager en protéine ou en induisant la dégradation de l'ARN messager.⁵⁹ Selon le contexte, le tissu, l'espèce et le miR concerné, leur fonction peut être protectrice ou pathogène. Leurs effets peuvent être contradictoires sur la durée de la correction de l'augmentation selon le miR étudié.⁵⁹ L'impact individuel de chaque miR sur le fonctionnement cellulaire est faible mais dans la plupart des cas plusieurs miRs agissent en coopération à différents niveaux d'un système pour le moduler efficacement. L'étude des miRs permet d'établir des profils d'expression des miRs associés à différentes conditions. Dans le contexte de la cardiopathie sénescence, de nombreux miR sont dysrégulés (par exemple augmentation de miR-71, miR-238, miR-239 et miR-246, diminution de *let-7* et miR-1) mais peu sont directement reliés à une altération fonctionnelle.⁶⁶ Le miR-29 est augmenté dans les tissus sénescents, sa fonction étant de limiter les dépôts de collagène IV, il pourrait s'agir d'un mécanisme limitant la fibrose.⁵⁹ Le miR-34a est augmenté dans les cœurs sénescents.⁶⁶ Son inhibition réduit la mort cellulaire liée à l'âge,⁶⁶ réduit la nécrose des cardiomyocytes et la fibrose après un infarctus du myocarde.⁶⁶ Elle corrige le remodelage dû à l'âge et améliore la fonction contractile cardiaque.⁶⁷ Le miR-34a agirait en limitant l'activité

d'une phosphatase nucléaire (PNUTS phosphatase-1 nuclear targeting subunit) qui elle favorise la réparation de l'ADN et limite le raccourcissement des télomères.⁶⁶

2.1.3 Accumulation des déchets dans le cœur sénescant

Au cours de la vie de la cellule, différents déchets sont produits dont une partie s'accumule en intracellulaire comme la lipofuscine.⁶⁸ Cette accumulation participe à l'augmentation progressive de taille des cardiomyocytes,²² induit des altérations du fonctionnement cellulaire⁶⁹ et du cycle calcique, des perturbations électrophysiologiques et mécaniques et favorise la mort cellulaire.

Les processus d'élimination des déchets sont moins efficaces avec en particulier une diminution de l'autophagie (processus lysosomal de dégradation et renouvellement des protéines et organelles intracellulaires).⁶⁹ Cette voie de dégradation a été largement étudiée dans la sénescence. L'autophagie est inhibée dans les cellules sénescantes par l'activation de la voie Akt. L'apport calorique stimule la sécrétion d'insuline qui active via le récepteur IGF (insulin like growth factor) et la protéine kinase B ou Akt la voie de signalisation mTOR (mammalian target of rapamycin). L'inhibition de la voie mTOR limite le vieillissement cellulaire.⁵⁹ Par ce même mécanisme, la restriction calorique prolonge la vie en réduisant l'exposition à l'insuline.⁶⁸

2.1.4 Modifications structurelles du cœur sénescant

Si la taille des cardiomyocytes augmente avec la sénescence, leur nombre se réduit du fait d'une réduction du renouvellement par les cellules progénitrices et d'une augmentation de l'apoptose et de la nécrose.^{1, 66, 69} La perte de cardiomyocytes est estimée à 30-35% entre 17 et 90ans.⁶² Une hypertrophie compensatrice est observée dans les cellules voisines ainsi qu'une augmentation de la proportion de tissu adipeux et de matrice extracellulaire.^{62, 64} Le

cœur sénescence accumule les dépôts amyloïdes et les produits avancés de la glycation comme dans le diabète.^{60, 64} L'activation des fibroblastes entraîne une fibrose avec accumulation de collagène^{60, 64, 70} en dépôts focaux⁷¹ disséminés et la formation de ponts de collagène.⁶⁴

Ces modifications augmentent la rigidité pariétale et l'épaisseur des parois des cavités cardiaques,^{64, 69} menant à un remodelage concentrique du cœur⁶⁴ malgré une petite augmentation de la taille des cavités cardiaques.⁶⁹ En dépit de la perte de nombreux cardiomyocytes, la masse cardiaque reste stable ou augmente à cause de la fibrose.¹ En plus des altérations constitutives du myocarde sénescence, le cœur sénescence est exposé à une impédance aortique accrue du fait des modifications de la paroi vasculaire qui induisent une augmentation de la rigidité aortique. L'augmentation de la postcharge ventriculaire gauche accentue les modifications structurelles du cœur sénescence.

2.2 Altérations fonctionnelles du cœur sénescence

2.2.1 Electrophysiologie du cœur sénescence

Plusieurs perturbations électrophysiologiques sont fréquemment observées dans le cœur sénescence. La diminution du nombre de cellules pacemaker favorise la dysfonction sinusale.⁶² Les troubles de conduction cardiaque sont fréquents⁷¹ en lien avec l'augmentation de la matrice extracellulaire⁶² et les changements dans la structure des gaps jonctions avec une diminution de la connexine 43.⁶⁹ Les difficultés de recaptage du calcium expliquent la prolongation du potentiel d'action. La durée du potentiel d'action augmente dans le cœur sénescence^{1, 72} ce qui prolonge la contraction musculaire.^{1, 72, 73} Le cœur sénescence est sujet à des troubles du rythme d'origine ventriculaire ou supra-ventriculaires. De plus, la dysautonomie diminue la variabilité du rythme cardiaque sinusal.⁶²

2.2.2 Contraction basale et homéostasie calcique du cœur sénescant

Le couplage excitation-contraction et l'homéostasie calcique sont notablement altérés dans le cœur sénescant.⁶⁹ L'entrée de calcium dans la cellule via le canal calcique lent est préservée voire augmentée dans certains modèles de sénescence.²² L'activité des récepteurs à la ryanodine est inconstamment diminuée selon les souches de rats.²² En revanche le recaptage du calcium par SERCA2a vers le réticulum sarcoplasmique est constamment réduit dans le cœur sénescant^{1, 22, 72} par la diminution de la quantité totale de SERCA2a^{1, 72, 73} et du ratio SERCA2a / phospholamban.²² Le niveau de calcium cytosolique diminue plus lentement que dans le cœur adulte sain prolongeant la transitoire calcique¹ et le temps de relaxation musculaire⁷² ce qui participe à la dysfonction diastolique. La surexpression de SERCA2a dans des cœurs sénescants corrige les paramètres de relaxation comme le temps de relaxation isovolumique (TRIV) et la pente de décroissance diastolique de la pression intraventriculaire (-dP/dt).⁷² La transfection d'un chélateur du calcium la parvalbumine améliore également la relaxation de cardiomyocytes âgés.⁷⁴

Secondairement à la réduction du recaptage dans le réticulum sarcoplasmique, le stock de calcium mobilisable lors de la contraction se réduit ce qui peut expliquer une réduction de la contractilité et une dysfonction systolique,²² lors de l'avancée de la cardiopathie.

Enfin certaines études montrent une concentration diastolique en calcium plus élevée dans le cytosol des cardiomyocytes sénescants que dans ceux d'un cœur adulte sain²² malgré l'extrusion de calcium par NCX dont le rôle augmente avec l'âge.¹ D'autres études ne retrouvent pas de variation de la concentration cytosolique en calcium²² probablement à cause d'une sénescence moins avancée. La surcharge cytosolique en calcium participe à la dysfonction diastolique et diminue la tolérance des cardiomyocytes au calcium²² avec une tendance accrue aux arythmies et à la mort cellulaire en particulier sous l'effet d'un stress comme une ischémie-reperfusion, un stress oxydatif ou une activation de la voie beta-

adrénergique.²² D'autres éléments comme l'altération du fonctionnement mitochondrial, un stress oxydatif accru et la diminution des réserves énergétiques réduisent la cardioprotection due au préconditionnement dans le cœur sénescence.⁷⁵

2.2.3 Altérations mécaniques du cœur sénescence

Le cœur sénescence se caractérise par une dysfonction diastolique et une fonction systolique longtemps préservée^{8, 72} comme d'autres cardiopathies.²

Les difficultés de recaptage du calcium et la persistance de ponts actine-myosine⁷⁰ gênent la relaxation musculaire. L'augmentation de la rigidité pariétale⁷⁰ réduit la compliance et limite de facto le remplissage des ventricules cardiaques. Le changement du profil du flux transmitral de remplissage traduit l'augmentation des pressions de remplissage ventriculaire lié au défaut de compliance.⁶⁹ Ainsi, le rapport E/A s'inverse traduisant un simple trouble de la relaxation. Par la suite, ce rapport devient très supérieur à 1 traduisant l'aggravation de la compliance myocardique et signant des pressions de remplissage ventriculaires augmentées. **(Figure 11).**^{62 76} Le TRIV s'allonge.⁷² La pente de diminution de la pression intraventriculaire $-dP/dt$ diminue.⁷²

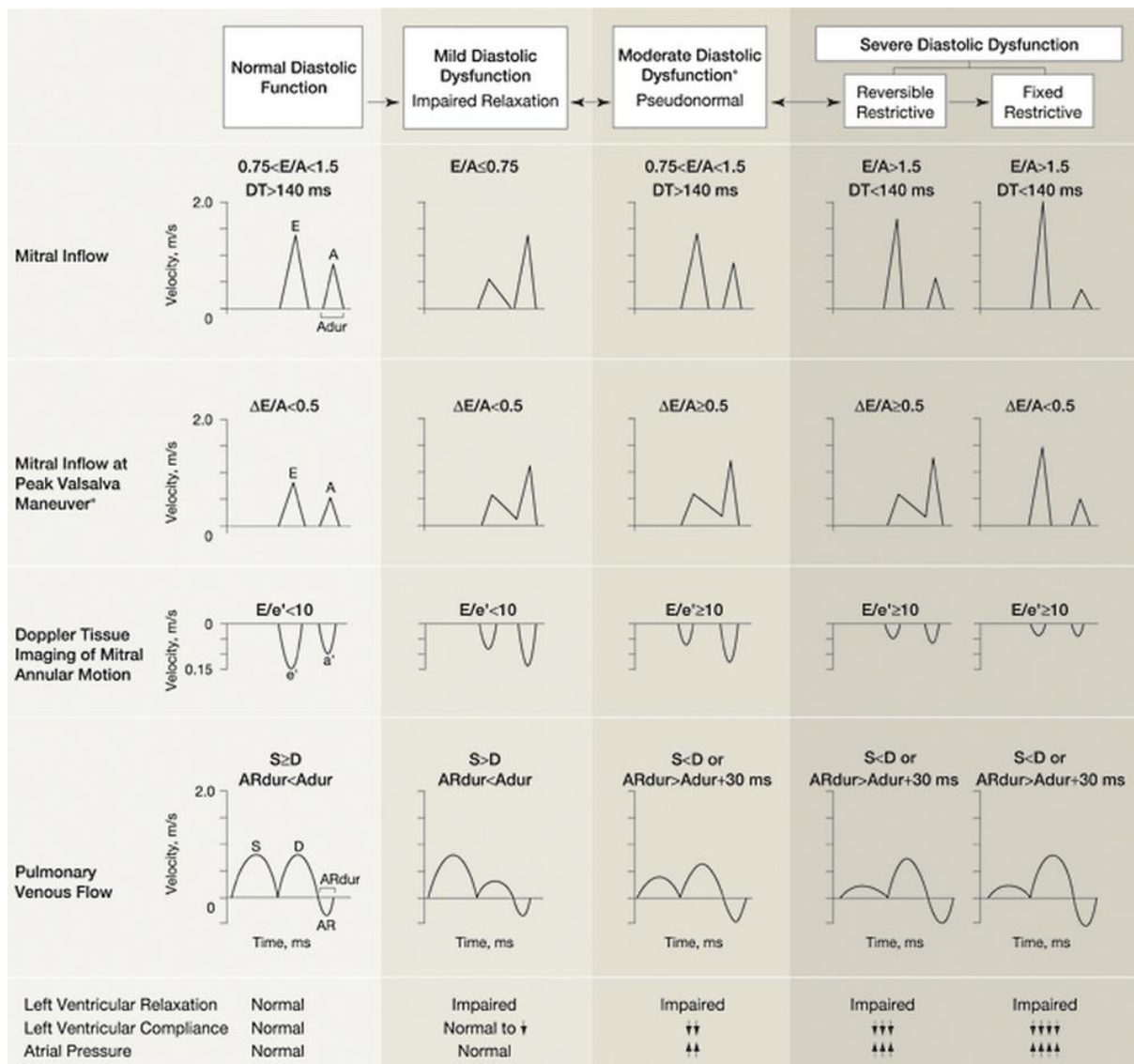


Figure 11 : Critères échocardiographiques de dysfonction diastolique. Reproduit d'après Redfield et al.⁷⁶

E : amplitude de l'onde protodiastolique de remplissage transmitral, A : amplitude de l'onde télédiastolique auriculaire de remplissage transmitral, DT : temps de décélération de l'onde E, $\Delta E/A$: variation du rapport E/A, e' : amplitude du mouvement de l'anneau mitral latéral en Doppler tissulaire, S : amplitude de l'onde systolique de remplissage auriculaire dans les veines pulmonaires, D : amplitude de l'onde diastolique de remplissage auriculaire dans les veines pulmonaires, AR : amplitude du reflux dans les veines pulmonaires gauches pendant la systole auriculaire, ARdur : durée de l'onde AR, Adur : durée de l'onde A.

La fonction systolique au repos est longtemps préservée dans le cœur sénescant.⁶² La vitesse de contraction du muscle cardiaque diminue,^{1, 70} par un shift de la chaîne lourde de la myosine de type α vers une myosine de type β .⁶⁹ Cela constitue un processus d'adaptation et d'économie d'énergie dans le cœur sénescant. L'amplitude du raccourcissement des sarcomères n'est pas modifiée.⁷⁷ La dysfonction systolique est d'abord latente et révélée par une incapacité à accroître la contraction musculaire lors de la stimulation.²² La contractilité cardiaque diminue secondairement au repos²² avec une morbidité et une mortalité significative.⁶⁹ L'échocardiographie objective alors une diminution de la FEVG et de la FRVG.⁷⁸

2.3 La fonction β -adrénergique dans le cœur sénescant

2.3.1 Hyperactivation neuro-hormonale

Une hyperactivation neuro-hormonale est observée dans la sénescence comme de nombreuses conditions pathologiques et contribue au vieillissement cardiaque.²⁵ Le taux d'angiotensine 2 intracardiaque est augmenté⁶⁰ et le blocage du système rénine angiotensine réduit la fibrose dans le cœur sénescant.⁶⁰ L'inflammation cardiaque et l'augmentation du TGF- β 1 favorise l'apoptose cellulaire et la fibrose.¹ L'endothéline 1, peptide vasoconstricteur puissant, est augmentée dans les cultures de fibroblastes sénescants pro-fibrotiques et dans les cœurs de sujets âgés.⁷⁹ Les taux de peptide atrial natriurétique et de peptides opioïdes circulants sont augmentés. L'activité du système nerveux sympathique est augmentée au cours de la sénescence mais la réponse cardiaque est altérée.⁸⁰

2.3.2 La dysfonction β -adrénergique

Malgré un taux de catécholamines circulantes plus élevé que le sujet jeune,²² l'adaptation au stress et la tolérance à l'effort sont compromises chez le sujet âgé.⁷¹ La réserve contractile et la réserve chronotrope sont réduites.⁷¹ Cela passe en partie par une diminution de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques aussi appelée dysfonction β -adrénergique,⁸ observée *in vitro*^{8, 72} comme *in vivo* chez le rat⁸¹ ou chez l'homme.⁸² Dans le cœur sénescant, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques induit moins de phosphorylation de troponine et du phospholamban²² et une moindre augmentation des mouvements calciques^{1, 22} que dans le cœur jeune. Le cardiomyocyte sénescant est ainsi moins exposé à une surcharge calcique potentiellement létale.²²

Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer cette dysfonction. Le couplage entre le récepteur β -adrénergique et l'adénylate cyclase est altéré dans le cœur sénescant.¹ L'expression des récepteurs β_1 -adrénergiques est diminuée dans le cœur sénescant^{8, 83} alors que celle des récepteurs β_3 -adrénergiques est augmentée.⁸ Les récepteurs β_3 -adrénergiques stimulent la production d'oxyde nitrique comme décrit précédemment et réduisent l'effet inotrope positif induit par la stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques.⁸ **(Figure 13)** L'inhibition de NOS par L-NAME ou plus spécifiquement par L-VNIO, un inhibiteur spécifique de la NOS de type 1 restaure partiellement l'effet inotrope positif de la stimulation par isoprotérénol.⁸ **(Figure 12)** L'activité de l'adénylate cyclase est altérée au cours de la sénescence comme le montre la réduction de l'effet inotrope positif induit par la stimulation directe de l'adénylate cyclase.⁸³

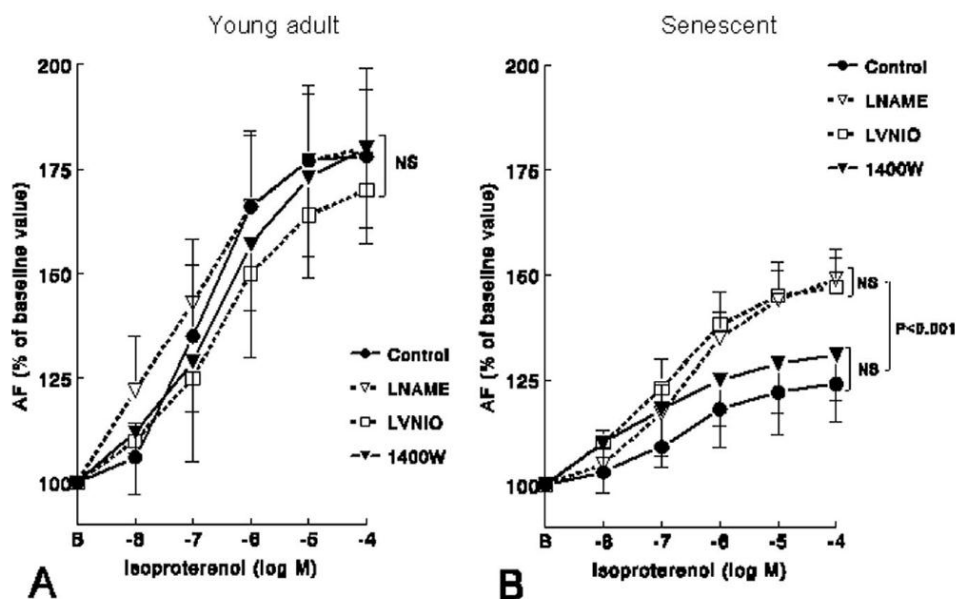


Figure 12 : Réponse inotrope à la stimulation par isoprotérénol de muscles papillaires de rats sénescents et jeunes adultes. Reproduit d'après Birenbaum et al.⁸

AF : force active, LNAME : *N*_G-nitro-L-arginine methylester, inhibiteur des NO synthase, LVNIO : vinyl-LN-5(1-imino-3-butenyl)-L-ornithine inhibiteur de NO synthase 1, 1400W : inhibiteur de NO synthase 2, NS : non significatif

Néanmoins, l'effet inotrope positif directement induit par l'application d'AMPc ou d'un analogue est encore réduit ce qui suggère une perturbation plus distale dans la cascade de signalisation β -adrénergique.⁸ L'expression de MRP4, canal effluent de l'AMPc décrit plus haut, est augmentée dans le foie de souris femelles âgées⁸⁴ mais à notre connaissance aucun travail n'avait été réalisé sur son expression et son rôle éventuel dans la cardiopathie sénescence.

3. Physiopathologie de la cardiopathie diabétique

Le diabète est une maladie en pleine expansion, souvent comparée à une pandémie au regard du nombre de personnes atteintes dans le monde et à ses conséquences sanitaires, encore aggravées par l'obésité fréquemment associée dans le cadre du syndrome métabolique. La présence d'un diabète ou d'une hyperglycémie constitue un facteur pronostic péjoratif dans de nombreuses situations^{85, 86} comme la chirurgie⁴ ou l'infarctus du myocarde avec une augmentation de la mortalité,^{85, 86} des complications cardiovasculaires et de l'insuffisance cardiaque.⁸⁶ Indépendamment de toute comorbidité de type coronaropathie ou hypertension artérielle⁸⁷ et même en cas de contrôle glycémique correct, le diabète induit de multiples altérations cardiaques regroupées sous le terme de cardiopathie diabétique.⁴ Le concept a été introduit par la description de cas d'insuffisance cardiaque sans atteinte des coronaires dès 1972⁸⁸ et a été depuis largement complété.^{4, 86, 89, 90} Une tendance à l'hypertrophie, une modification du métabolisme énergétique, des anomalies de l'homéostasie calcique, une dysfonction diastolique plus fréquente que la dysfonction systolique et une réponse au stress altérée sont les éléments les plus consensuels^{86, 89, 90} même si selon les études, les modèles et le degré de sévérité de diabète étudié, certains résultats peuvent être contradictoires.^{86, 91} Les altérations cardiaques sont progressives et longtemps asymptomatiques à l'état basal⁸⁷ mais peuvent être révélées plus précocement à l'occasion d'un stress comme une chirurgie avec la diminution de réponse cardiaque à la stimulation β -adrénergique.

3.1 Principales modifications tissulaires et cellulaires observées dans la cardiopathie diabétique

3.1.1 Altérations structurelles et neuro-hormonales au cours du diabète

Le cœur diabétique présente habituellement un remodelage concentrique de la cavité⁸⁶ pouvant aller jusqu'à une hypertrophie ventriculaire gauche.^{90, 91} La taille des cardiomyocytes est le plus souvent normale⁹⁰ mais quelques études retrouvent une hypertrophie des cardiomyocytes⁸⁶ qui compenserait l'apoptose accrue des cardiomyocytes.⁹² La place de l'autophagie reste à déterminer dans le diabète, adaptative en limitant les dépôts intracellulaires ou pathologique, selon la voie qui l'induirait.⁹²

La prolifération de fibroblastes et la fibrose précoce interstitielle et périvasculaire par dépôts de collagène 1 sont corrélées à l'augmentation de la masse ventriculaire gauche.⁸⁶ La fibrose peut être mise en évidence par le rehaussement tardif au gadolinium en IRM ou par l'analyse de la rétrodiffusion dans les nouvelles modalités d'échocardiographie.⁸⁶ Ces nouveaux outils révèlent une fibrose cardiaque précoce chez plus de 50% des patients diabétiques en l'absence de pathologie cardiaque ischémique.⁸⁶ Dans le tissu interstitiel myocardique du diabétique, les ponts de collagène augmentent la rigidité pariétale^{93, 94} diminuent la compliance cardiaque et participent à la dysfonction diastolique.^{86, 89, 94}

L'activité du système rénine-angiotensine est renforcée dans le cœur diabétique. L'augmentation de la concentration en angiotensine 2 circulante⁹² et de ses récepteurs cardiaques^{86, 90} active la voie du diacylglycérol et de la protéine kinase C.⁹² L'activation de cette signalisation mène à la fibrose cardiaque et l'hypertrophie ventriculaire.⁹² L'augmentation de l'angiotensine accentue le stress oxydatif et favorise l'apoptose et la nécrose des cellules.⁹⁰ L'inhibition du système rénine-angiotensine limite la production d'espèces réactives de l'oxygène le remodelage et la dysfonction cardiaque.⁹⁰ En parallèle, la

voie de la calcineurine est activée par l'allongement du potentiel d'action et une concentration en calcium longtemps élevée et favorise la fibrose cardiaque.⁸⁶

Comme l'ensemble des tissus de l'organisme du diabétique, le myocarde est le siège d'une microangiopathie avec une diminution de la densité en microvaisseaux, une fibrose périvasculaire.⁸⁶ De plus, le cœur diabétique est plus sensible à l'ischémie-reperfusion que le cœur sain par une diminution de la réserve de flux coronaire⁸⁶ et une altération des mécanismes de pré- et post-conditionnement.^{4, 86} Après une revascularisation coronaire, la zone infarctée est plus étendue.⁸⁶ L'hyperglycémie elle-même suffit à limiter les effets du préconditionnement par les agents anesthésiques.⁹⁵

3.1.2 Aspects métaboliques de la cardiopathie diabétique

L'hyperglycémie entraîne différents dommages cellulaires dont la formation de produits avancés de la glycation (advanced glycation end-products ou AGEs).⁴ La glycation des lipides et des protéines comme le collagène augmente la rigidité pariétale et perturbe la contraction et la relaxation cardiaques.⁹⁰ Expérimentalement, un inhibiteur de la formation des AGEs prévient la dysfonction VG induite par le diabète⁸⁶ mais cette piste n'a pas encore mené à une thérapeutique usuelle.

Le métabolisme énergétique du cœur diabétique repose sur l'oxydation des acides gras libres^{90, 91} et non plus sur l'utilisation conjointe des acides gras et du glucose⁹⁴ et s'adapte difficilement à la disponibilité en substrats énergétiques.⁹⁰ Le captage du glucose par les cellules est diminué par une diminution de l'expression du transporteur GLT4/GLUT1 et par l'absence de GLUT4 à la membrane plasmique.⁸⁶ Le captage des acides gras augmente en compensation mais dépasse les capacités d'utilisation.⁹⁰ L'accumulation intracellulaire de lipides^{90, 91} est responsable d'une lipotoxicité et favorise l'apoptose.⁹⁰ L'augmentation des

acides gras libres active PPAR α (récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes de type α) qui limite l'oxydation du glucose et favorise l'utilisation des acides gras.^{86, 90} Cette voie métabolique est plus consommatrice d'oxygène et productrice de radicaux libres au niveau des mitochondries.^{86, 90} La production énergétique mitochondriale est perturbée dans les cardiomyocytes diabétiques^{86, 91} avec une baisse de la production d'ATP.⁹⁰ La disponibilité en ATP mobilisable en cas de stress est moins importante que dans le cœur sain^{86, 90} et le rapport phosphocréatine/ATP réduit.⁸⁶ La production d'espèces réactives de l'oxygène est augmentée⁹⁰ au niveau mitochondrial et extra-mitochondrial.⁸⁶ mais l'effet des antioxydants sur la cardiopathie diabétique reste à éclaircir.^{86, 90}

3.1.3 Altérations du couplage excitation-contraction dans la cardiopathie diabétique

Les perturbations de l'homéostasie calcique observées dans la cardiopathie diabétique sont très dépendantes du degré de pathologie et des conditions expérimentales.^{86, 94} Des résultats en apparence contradictoires reflètent cette aggravation progressive de la cardiopathie et l'influence des techniques d'analyse.^{85, 91}

La concentration cytosolique diastolique en calcium est inchangée dans le cardiomyocyte diabétique.⁹⁴ L'ensemble des publications retrouve une diminution du contenu calcique intra-sarcoplasmique.^{85, 90} Lors de la phase de dépolarisation, le courant calcique entrant I_{CaL} est normal ou diminué selon les études.^{85, 90} Le relargage calcique par le réticulum sarcoplasmique est diminué.^{90, 94, 96, 97} Une diminution de l'expression des récepteurs à la ryanodine et une augmentation du phospholamban non phosphorylé⁹⁰ pourraient être en cause dans la diminution de l'amplitude de la transitoire calcique^{85, 86, 94} et l'allongement du temps de croissance de la concentration calcique cytosolique de la transitoire calcique.⁹⁴

La décroissance diastolique de la concentration cytosolique en calcium est ralentie dans le cardiomyocyte diabétique.^{86, 90, 94, 97, 98} L'expression de SERCA2a est diminuée dans plusieurs modèles de cardiopathie diabétique^{3, 97, 98} alors que l'expression du phospholamban est augmentée (**Figure 13**).³ De plus, la glycation de SERCA2a altère son fonctionnement.⁸⁶ Au total, l'activité de recaptage du calcium par SERCA2a est diminuée dans la majorité des études portant sur la cardiopathie diabétique^{85, 86, 90, 97, 98} et l'augmentation de l'expression cardiaque de SERCA2a prévient ou corrige la dysfonction contractile.^{90, 97} L'entraînement physique corrige les anomalies de l'homéostasie calcique chez l'animal.⁸⁵ L'extrusion calcique par le NCX n'est pas ou peu altérée dans la cardiopathie diabétique.^{86, 90, 98} En revanche, des fuites diastoliques de calcium provoquées par la phosphorylation de la CaMKII⁸⁵ sont responsables de troubles du rythme.^{85, 86}

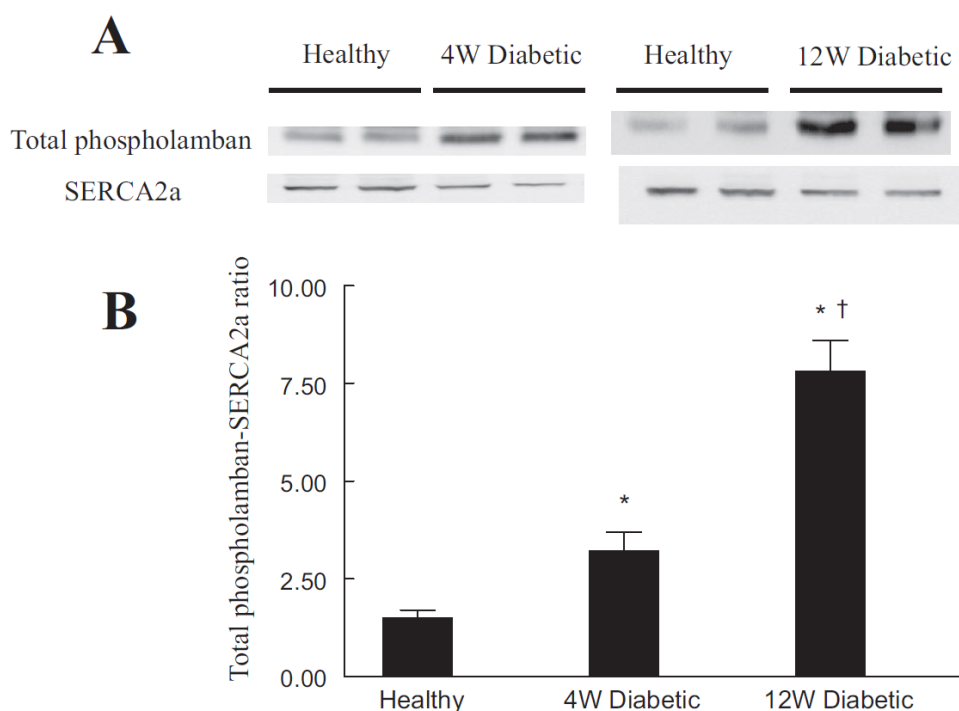


Figure 13 : Images types (panel A) et représentation graphique (panel B) de l'expression du phospholamban total et de SERCA2a. Reproduit d'après Amour et al.³

D'autres altérations des cardiomyocytes sont décrites dans la cardiopathie diabétique, proches de celles observées dans l'insuffisance cardiaque comme un shift de la myosine de type α pour β .⁹⁴ La densité en tubules T est diminuée^{85, 94} mais beaucoup moins que lors de l'insuffisance cardiaque observée en dehors du diabète.⁹⁴ La sensibilité au calcium des myofilaments est réduite de façon variable selon les modèles étudiés.^{86, 90, 91, 94} Plusieurs perturbations électrophysiologiques sont décrites dans la cardiopathie diabétique dont l'augmentation de la durée du potentiel d'action^{86, 94} et l'augmentation du courant potassique entrant I_{to} par diminution de l'expression des canaux Kv4.2.⁸⁶

3.2 Altérations mécaniques dans la cardiopathie diabétique

3.2.1 Dysfonction diastolique dans la cardiopathie diabétique

L'altération de la fonction diastolique est l'une des caractéristiques fondamentales de la cardiopathie diabétique.^{4, 91} Elle est retrouvée *in vitro*^{2, 3, 96} comme *in vivo* aussi bien chez le rat^{2, 3} que chez l'homme où elle touche jusqu'à 75% des sujets diabétiques.^{86, 87, 90} *In vitro*, la relaxation du cardiomyocyte diabétique est plus lente et allongée.^{96, 98} *In vivo*, l'échocardiographie identifie un profil de remplissage transmitral restrictif ou pseudo-normal,⁸⁶ une inversion puis une augmentation du rapport E/A, une augmentation du temps de décélération de l'onde E et du TRIV.^{76, 87} **(Figure 11)** Le Doppler tissulaire s'est révélé plus sensible dans la détection des anomalies de la relaxation⁸⁶ et permet de détecter une dysfonction diastolique chez 47 à 63% des patients selon les études,^{86, 87} **(Figure 14)** élément pronostic important chez le sujet diabétique.

3.2.2 Dysfonction systolique dans la cardiopathie diabétique

La dysfonction systolique est classiquement décrite comme plus tardive et moins fréquente que la dysfonction diastolique.⁸⁶ Son incidence est variable selon les études et très dépendante du degré de sévérité, des conditions de charge et nettement augmentée depuis l'utilisation de nouveaux outils de détection.⁸⁷

In vitro, par microscopie optique et système Ionoptix®, Ceylan et al.⁹⁶ ont déterminé que l'amplitude et le raccourcissement des sarcomères étaient diminués dans un modèle de diabète de type 1 par injection de streptozotocine. Des résultats concordants ont été obtenus sur des cardiomyocytes issus de souris db/db qui sont un modèle de diabète de type 2.⁸⁵ Selon les études, la contraction du muscle cardiaque est plus lente et prolongée chez le diabétique^{2, 94, 96} mais d'amplitude normale ou diminuée^{85, 94, 96} par rapport au sujet sain.

In vivo, les analyses de boucle pression-volume objectivent une diminution du pic et de la pente de pression systolique ventriculaire gauche, du travail cardiaque et du volume d'éjection systolique.⁹⁹ A un stade avancé de cardiopathie diabétique, une diminution de la FEVG⁹⁹ et de la FRVG⁸⁶ ont été décrites. Le Döpler tissulaire objective un pic de l'onde S' moins élevé chez les sujets diabétiques malgré une FEVG normale.⁸⁶ Plus récemment, les mesures de « strain » et de « strain rate » ont révélé une altération de la fonction systolique chez 32% des patients diabétiques même sans hypertension artérielle ou pathologie cardiaque déclarée.^{86, 87} **(Figure 14)** La dysfonction systolique est ainsi retrouvée chez 28% des sujets diabétiques asymptomatiques et avec une fonction diastolique normale.⁸⁷

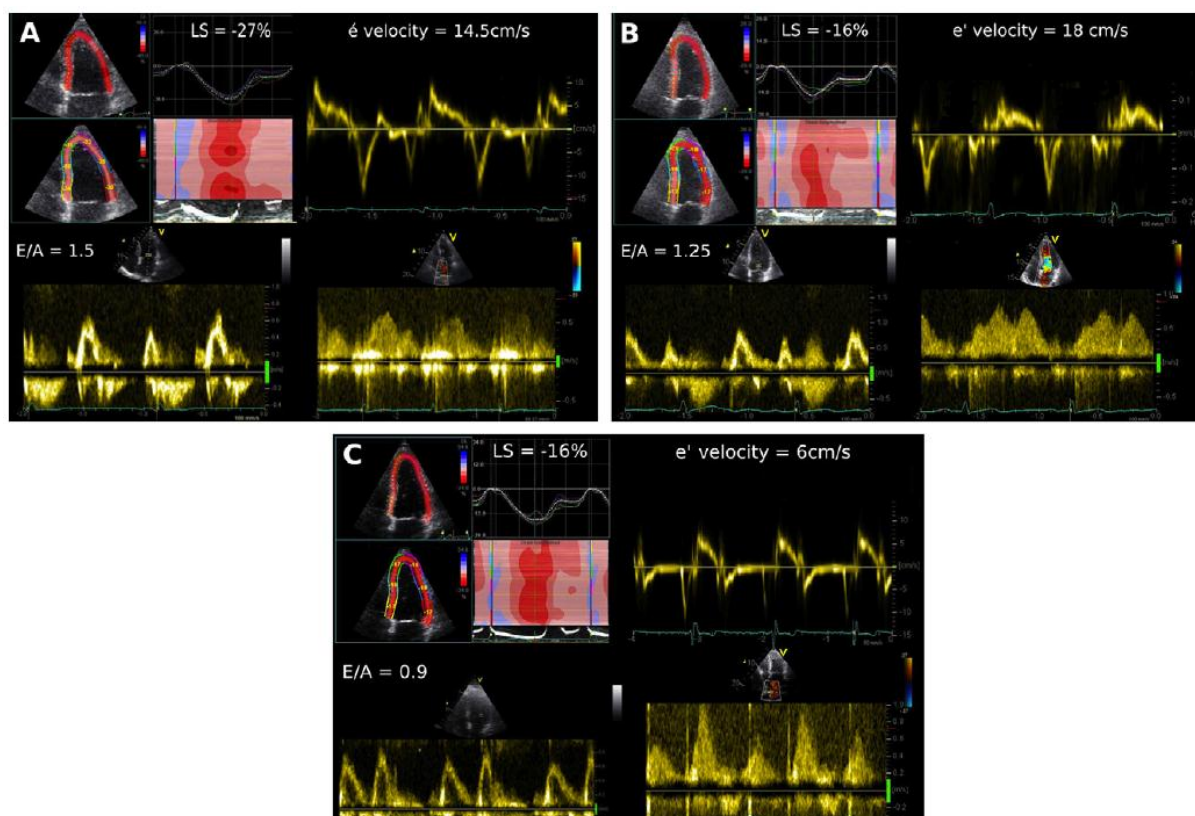


Figure 14 : Exemples d'évaluation de la fonction systolique par strain longitudinal et diastolique par flux transmitral : fonction systolique et diastolique normales (panel A), dysfonction systolique avec fonction diastolique normale, dysfonction systolique et diastolique (panel C). Reproduit d'après Ernande et al.⁸⁷

LS : strain longitudinal, e' : mouvement de l'anneau mitral latéral

3.2.3 Dysfonction β -adrénergique dans la cardiopathie diabétique

Les perturbations décrites ci-dessus sont progressives et la cardiopathie diabétique reste longtemps silencieuse. Son existence peut être révélée plus précocement par une altération de la réponse aux catécholamines, endogènes lors de l'exercice ou du stress ou exogènes lors de l'utilisation thérapeutique.⁸⁶ Plusieurs études ont montré dans le diabète une

réduction de la réponse inotrope positive à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques.^{2, 86}
contrastant avec une préservation de l'effet lusitrope positif.^{3, 85, 89}

In vitro, l'amplitude de la transitoire calcique et la contraction des cardiomyocytes issus d'animaux diabétiques augmentent moins sous stimulation par isoprotérénol que dans les cellules issues d'animaux sains.¹⁰⁰ La réponse inotrope positive en réponse à la stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques dans les muscles papillaires de diabétiques.² *In vivo*, l'augmentation du volume d'éjection systolique et de l'index cardiaque est plus faible que chez les sujets sains⁸⁶ de même que l'augmentation de pression artérielle ce qui est associé à un pronostic défavorable.^{86, 89}

Plusieurs éléments expliquent cette dysfonction β -adrénergique. L'expression des récepteurs β_1 -adrénergiques est diminuée dans le cœur diabétique^{2, 89} (**Figure 16**) alors que l'expression des récepteurs β_2 -adrénergiques est peu modifiée.⁸⁹ En revanche, l'expression des récepteurs β_3 -adrénergiques est significativement augmentée dans le myocarde diabétique^{2, 89} (**Figure 16**) comme cela a pu être observée dans l'insuffisance cardiaque⁸⁹ ou le cœur sénescant.⁸ Dans le cœur diabétique, l'inversion du ratio d'expression entre récepteurs β_1 - et β_3 -adrénergiques limite l'effet inotrope positif de la stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques.² L'inhibition par le L-NAME de la production d'oxyde nitrite (NO) induite par la stimulation des récepteurs β_3 -adrénergiques corrige partiellement cette dysfonction β -adrénergique (**Figure 15**).²

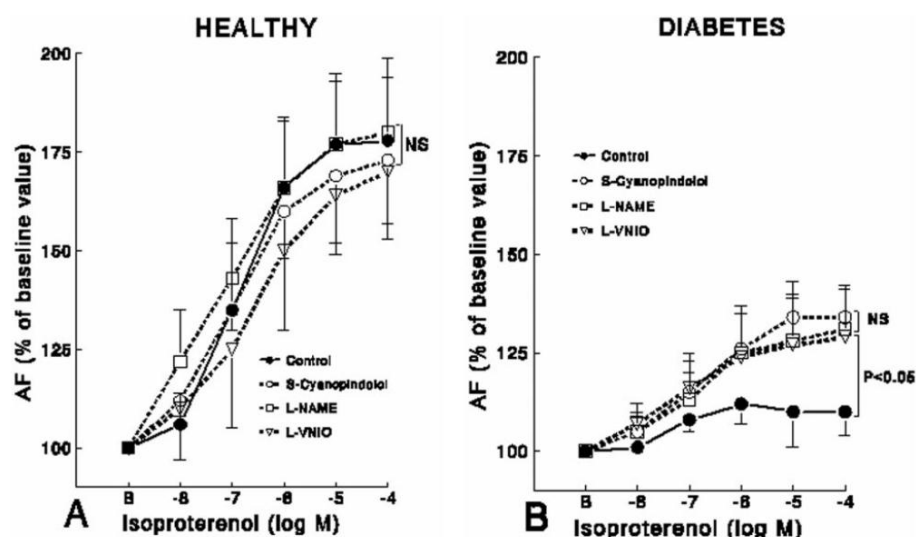


Figure 15 : Réponse inotrope positive de muscles papillaires de rats sains (panel A) ou diabétiques (panel B) en présence de doses cumulatives croissantes d'isoprotérénol. Reproduit d'après Amour et al.²

AF : force active, NS : non significatif. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

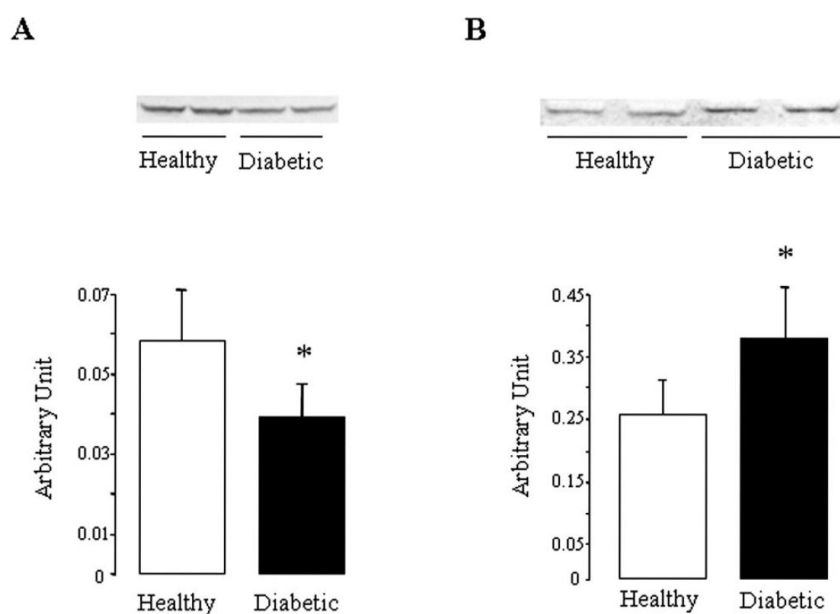


Figure 16 : Images-types et résultats moyens de l'expression des récepteurs β_1 - (panel A) et β_3 -adrénergiques (panel B) dans le ventricule gauche de rats sains ou diabétiques. Reproduit d'après Amour et al.² Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Néanmoins, la réponse inotrope positive à l'isoprotérénol reste inférieure à celle observée chez les sujets sains² suggérant une altération de la signalisation β -adrénergique sous-jacente. Cette hypothèse est renforcée par une étude indépendante qui montre que la réponse inotrope positive à la forskoline ou à un analogue de l'AMPc est diminuée chez les diabétiques.¹⁰⁰

3.3 Principales altérations cardiaques liées à l'obésité et au syndrome métabolique

Chez l'homme, le diabète est plus fréquemment de type 2 et associé à une obésité. Le syndrome métabolique regroupe diabète ou intolérance au glucose, obésité, dyslipémie et hypertension artérielle¹⁰¹ et est associé à un risque cardiovasculaire et une morbi-mortalité accrus. L'obésité crée une demande métabolique supplémentaire et une activation chronique du système nerveux sympathique pour établir un état circulatoire hyperdynamique avec élévation de la volémie, du débit cardiaque et de la pression artérielle.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

Peu d'études ont été publiées sur la cardiopathie du sujet obèse et diabétique ou du syndrome métabolique et encore sur l'impact de l'association de l'obésité au diabète alors que plus de 35% des américains de 20 à 74 ans sont obèses ou en surpoids et souvent diabétiques.¹⁰³ Les études humaines se heurtent à des nombreux facteurs confondants et les résultats expérimentaux sont impactés par les modèles utilisés. En général, le cœur du sujet obèse est caractérisé par une augmentation de son poids total.¹⁰² L'apoptose des cardiomyocytes est augmentée dans un modèle de souris ob/ob présentant diabète et obésité ainsi que la fibrose en cas d'hypertension artérielle et de dyslipémie associées.¹⁰⁵ La relaxation est perturbée par ces facteurs mécaniques et par une altération du recaptage du

calcium par SERCA2a,¹⁰⁵ liée à une possible augmentation de l'inhibition par le phospholamban selon une autre étude.¹⁰⁶

Au repos, plusieurs études ont montré l'existence d'une altération de la contraction du cœur de l'obèse, de sévérité variable selon le modèle utilisé. La pression développée par le ventricule gauche de lapins obèses est réduite par rapport à des animaux sains.¹⁰³ Chez des rats obèses, la dysfonction contractile a pu être mise en évidence à l'échelle du cardiomyocyte avec une diminution de l'amplitude et de la vitesse de raccourcissement des sarcomères.¹⁰⁶ La dysfonction contractile basale semble moins marquée dans le diabète de type 2 avec obésité du modèle Zucker que dans le diabète de type 1 induit par streptozotocine alors que la compliance est plus altérée chez les rats Zucker.⁹⁹ La cardiopathie des sujets obèses peut atteindre le stade de dilatation ventriculaire et diminution de la FEVG.¹⁰³

Comme dans le cas de l'insuffisance cardiaque chronique, l'hyperactivation neuro-hormonale initialement adaptative chez l'obèse prédispose à l'insuffisance cardiaque.^{101, 102,}
¹⁰⁴ La concentration basale de catécholamines circulantes est augmentée¹⁰¹ mais la signalisation issue de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques a été peu étudiée et les quelques résultats publiés sont contradictoires.¹⁰¹⁻¹⁰³ Lima-Leopoldo et al ont conclu que la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques était inchangée chez des rats obèses, hormis lors de l'exposition à de fortes concentrations d'isoprotérénol.¹⁰⁷ Dans une étude ancienne sur les cœurs des lapins obèses, la réponse à l'isoprotérénol n'était pas altérée.¹⁰³ La transmission de la stimulation par l'isoprotérénol à l'adénylate cyclase était préservée¹⁰² alors que la réponse à la stimulation directe de l'adénylate cyclase par la forskoline était diminuée dans une étude sur des lapins obèses.¹⁰² Les résultats concernant l'expression des récepteurs β -adrénergiques sont aussi rares et discordants.¹⁰¹⁻¹⁰³ Les mesures indirectes de quantité de récepteurs β -adrénergiques par évaluation de l'affinité aux ligands ne montraient pas de différence chez les lapins obèses ou non.¹⁰² Pourtant, une diminution de l'expression des

récepteurs β 1- et β 2-adrénergiques a été rapportée dans un modèle de porc obèses.¹⁰¹
L'évaluation directe de l'expression des sous-types de récepteurs β -adrénergiques n'a, à notre connaissance, jamais été publiée dans d'autres modèles d'obésité et de syndrome métabolique.

TRAVAUX SCIENTIFIQUES MENES PAR LE DOCTORANT

Les travaux présentés dans ce travail ont été réalisés au sein du groupe de travail dirigé par le Pr. Riou dans l'UMR INSERM 1166 (dirigée par le Pr. Stéphane Hatem) et de l'Institut Hospitalo-Universitaire ICAN (Directrice Pr. Karine Clément) et dans le cadre de l'école doctorale Physiologie, physiopathologie et thérapeutique (ED394, Directrice Pr. Isabelle Cremer) de l'Université Pierre et Marie Curie Paris 06 Sorbonne-Université.

1. Matériels et Méthodes

1.1 Modèles animaux

Tous les animaux sont étudiés sous la responsabilité de chercheur agréé (JA, A-75-20-81) et soignés conformément aux recommandations en vigueur dans un établissement labellisé (B-75-13-08). Ils ont accès librement à la nourriture et à l'eau. Tous les animaux sont pesés lors du sacrifice et les poids du cœur et du ventricule gauche sont déterminés sauf pour les cœurs utilisés pour l'isolement des cardiomyocytes.

1.1.1 Cardiopathie sénescence

Des rats Wistar mâles (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) sénescents (âgés de 24 mois) ou jeunes adultes (3 mois) sont utilisés.⁸ Ils ont été élevés en animalerie spécialisée (Janvier) jusqu'à leur entrée dans l'étude.

1.1.2 Cardiopathie liée au syndrome métabolique

Des rats Zucker obèses par mutation sur le gène de la leptine et des rats Zucker obèses et diabétiques sont utilisés comme modèle de cardiopathie de l'obèse associée ou non au diabète (Charles River, L'Arbresle, France).^{101, 104}

1.1.3 Cardiopathie diabétique

Des rats Wistar mâles de 6 semaines (Janvier) sont répartis selon deux groupes: rats adultes sains et rats adultes rendus diabétiques. Le diabète est induit dans le groupe concerné par une injection intraveineuse unique de streptozotocine (65mg.kg^{-1} de poids corporel, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France).² Les animaux sont étudiés 6 semaines plus tard. Au moment de l'euthanasie, un prélèvement sanguin est pratiqué pour déterminer la glycémie et la réserve alcaline de chaque rat.

1.1.4 Traitement par atorvastatine

Des rats Wistar sains ou diabétiques (6 semaines après l'injection de streptozotocine) sont gavés quotidiennement avec 80mg.kg^{-1} d'atorvastatine pendant 15 jours consécutifs avant étude de la contractilité.

1.2 Effets inotrope et lusitrope de la stimulation β -adrénergique *in vivo*

1.2.1 Echocardiographie

Sous anesthésie générale par isoflurane (1 à 2%), les échocardiographies sont réalisées à l'aide d'un appareil Vivid 7 (General Electric, Aulnay-sous-Bois, France) équipé d'une sonde linéaire de 8-14 MHz. La fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) et la fraction de raccourcissement du ventricule gauche (FRVG) sont mesurées sur une coupe para-sternale

grand axe.^{2, 3} Les paramètres diastoliques du ventricule gauche sont obtenus à partir du Doppler pulsé du flux mitral : pics de vitesse de l'onde protodiastolique mitrale E et de l'onde télédiastolique mitrale A, temps de décélération de l'onde E et temps de relaxation isovolumétrique.^{2, 3} Le pic de vitesse de l'onde protodiastolique Ea par Doppler pulsé tissulaire (DTi) est enregistré à l'anneau mitral en fenêtre apicale 4 cavités. Le rapport E/A, reflet de la fonction diastolique du ventricule gauche et le rapport E/Ea, reflet des pressions de remplissage du VG sont calculés.^{2, 3} Les différents paramètres sont enregistrés après stabilisation en condition basale, puis après une injection intraveineuse de MK571 (30 mg.kg⁻¹, Enzo Life Sciences)¹⁰⁸ ou du même volume de NaCl 0.9% et enfin sous stimulation β -adrénergique par isoprotérénol (5 ou 10 μ g.kg⁻¹.min⁻¹ en intraveineux continu).

1.2.2 Mesure invasive de la pression artérielle

In vivo, les rats sont anesthésiés par pentobarbital (65 mg.kg⁻¹ intrapéritonéal) pour enregistrer la pression artérielle. La carotide interne gauche des animaux est canulée avec un cathéter de polyéthylène connecté à un transducteur de pression (Gould Electronic, Cleveland, OH, USA). Après stabilisation, la pression artérielle et sa dérivée première en fonction du temps sont enregistrées. A partir de ces tracés on détermine la pression artérielle systolique et diastolique (respectivement PAS et PAD), la fréquence cardiaque et la vitesse maximale de croissance systolique de la pression artérielle (+dP/dt). Les différents paramètres sont enregistrés après stabilisation, en condition basale, puis après une injection intraveineuse de MK571 (30 mg.kg⁻¹, Enzo Life Sciences)¹⁰⁸ ou du même volume de NaCl 0.9% et enfin sous stimulation β -adrénergique par isoprotérénol (10 μ g.kg⁻¹.min⁻¹ en intraveineux continu).

1.3 Effets inotrope et lusitrope de la stimulation β -adrénergique *ex vivo*

Sous anesthésie générale par pentobarbital (30mg.kg^{-1}), le thorax des animaux est ouvert et le cœur rapidement prélevé. Les muscles papillaires sont soigneusement disséqués et suspendus dans une solution tampon bicarbonatée de Krebs-Henseleit, thermostatée et oxygénée, à une fréquence de stimulation de 12Hz, selon la technique précédemment décrite.² Les muscles sont soumis des concentrations croissantes d'isoprotérénol en doses cumulatives de 10^{-8} à 10^{-4} M, un agoniste spécifique des récepteurs β -adrénergiques et en présence de phentolamine (10^{-6} M) pour bloquer la signalisation des récepteurs α -adrénergiques. L'effet inotrope positif a été évalué en mesurant la vitesse maximale de raccourcissement sans précharge en isotonie et la force active maximale en isométrie. L'effet lusitrope a été évalué en mesurant le rapport R1 entre les vitesses maximales de contraction et de relaxation en isotonie avec précharge et le rapport R2 entre les forces maximales de contraction et de relaxation en isométrie. Les courbes concentrations-effets ont été analysées en calculant l'effet maximum (Eff_{max}) et la concentration produisant 50% de l'effet maximum (EC_{50}).

La stimulation directe de l'adénylate cyclase par la forskoline ou l'administration d'un analogue de l'AMPc

1.4 Effets inotrope et lusitrope de la stimulation β -adrénergique *in vitro*

1.4.1 Isolement des cardiomyocytes

Sous anesthésie générale par pentobarbital, le cœur des rats est rapidement prélevé par sternotomie et connecté par l'aorte ascendante à un dispositif de Langendorf.¹⁰⁹ Par la canule aortique le cœur est d'abord perfusé avec un tampon Stock sans calcium (NaCl 117mM, KCl 5,7mM, KH_2PO_4 1,5mM, NaHCO_3 4,4mM, MgCl_2 1,7mM, Glucose 11,7mM, Créatine

10mM, HEPES 21mM, Taurine 20mM, Sigma Aldrich) ajusté à pH 7,1 à 25°C, bullé à l'oxygène pur et réchauffé à 36,5°C. Une solution oxygénée de collagénase A (0.204 U/mg) (Roche Diagnostics, Meylan, France) est ensuite perfusée.^{41, 110} Après digestion enzymatique, l'exérèse des oreillettes et une dissection mécanique complémentaire douce est pratiquée suivie d'une filtration. Les cardiomyocytes en suspension sont lavés et resuspendus dans le tampon Stock. Le calcium est ajouté progressivement. Les cellules sont analysées dans les six heures qui suivent l'isolement.

1.4.2 Etude Ionoptix® des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes sont incubés avec du Fura2-AM (10^{-6} M, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) pendant 20 minutes à température ambiante puis lavés et resuspendus dans un tampon Stock avec 0.5mM de calcium. La contractilité et la transitoire calcique des cardiomyocytes sont enregistrées sur une plateforme Ionoptix® (Ionoptix Corporation, Milton, MA, USA).¹¹¹ Seuls les cellules rectangulaires à bords droits et sans bulles ni contraction spontanée sont étudiées. Les cardiomyocytes sont stimulés électriquement à 1 Hz et 8 Volts dans un bain à 25°C (**Figure 17**).

La longueur des sarcomères est déterminée par un microscope Olympus IX71 à objectif inversé et une caméra. Les propriétés contractiles des cardiomyocytes sont analysées avec le logiciel IonWizard® software (Ionoptix®) par l'amplitude maximale de raccourcissement (PR), le délai entre le début et le pic du raccourcissement (TPR) et la vitesse maximale de raccourcissement ($-dL/dt$) pour la phase de contraction et le temps pour 90% de relaxation (TR90) et la vitesse maximale de relaxation ($+dL/dt$) pour la phase de relaxation.

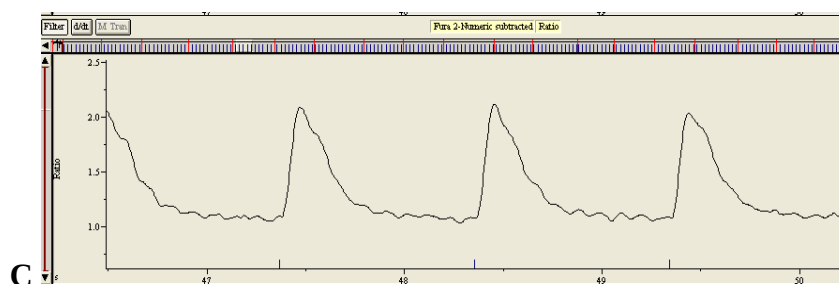
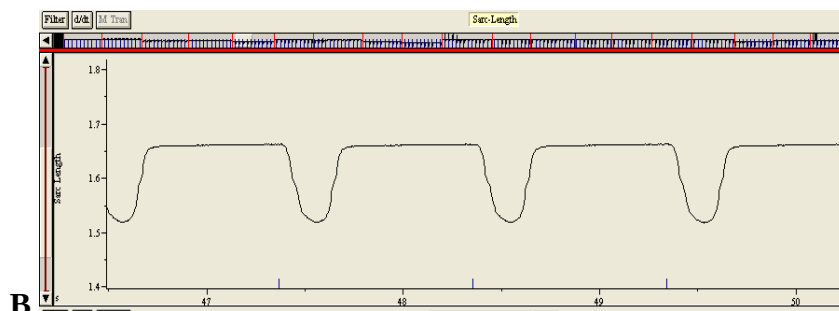


Figure 17 : Plateforme d'analyse Ionoptix **(A)** et exemple de tracés de raccourcissement des sarcomères **(B)** et de transitoire calcique **(C)** obtenus simultanément sur des cardiomyocytes isolés. Images de collection personnelle obtenues sur des rats Wistar mâles de 12 semaines.

Les cardiomyocytes sont exposés en alternance à une lumière de 340 et 380nm provenant d'une source au xénon avec un système Hyperswitch Fluorescence System Interface[®]. La longueur d'onde de la lumière émise par l'exposition de la sonde Fura2 dépend de la concentration en calcium. L'intensité de fluorescence (FFI) émise aux deux expositions lumineuses est exprimée en ratio 340/380 qui est corrélé à la concentration intracellulaire en calcium.¹¹¹ Les variations du calcium intracellulaire lors du cycle contraction-relaxation sont

appelés transitoire calcique et décrites par ΔFFI , l'amplitude du pic de la transitoire calcique et après chaque stimulation électrique et la constante de décroissance (τ).

L'inhibition de MRP4 a été réalisée par un prétraitement de la moitié des cellules par MK571 ($10^{-7}M$). La contraction et la fluorescence des cardiomyocytes ont été enregistrées après stabilisation en conditions basales et après ajout d'isoprotérénol ($10^{-6}M$).

1.5 Mesure de l'expression protéique

Sous anesthésie générale par pentobarbital, le ventricule gauche des animaux est prélevé, pesé et congelé en fragments à $-80^{\circ}C$. Les protéines totales sont extraites d'un échantillon par homogénéisation dans un tampon de lyse [Tris-HCl 50 mM (Invitrogen), NaCl 150mM, EDTA 2mM et Triton 1% (Sigma Aldrich)] en présence d'un cocktail inhibiteur anti-protéase (Sigma-Aldrich). La quantification des protéines totales est réalisée selon la méthode colorimétrique de Bradford.

Après dénaturation et migration électrophorétique dans un gel de polyacrylamide à 9%, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond, GE Healthcare, Vélizy, France). Les membranes sont coupées puis incubées avec un anticorps primaire anti-MRP4 et anti-GAPDH (les deux Abcam, Paris, France) ou anti-calsequestrine (Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) puis un anticorps secondaire anti-rat et anti-lapin (Cell Signaling). Après exposition à une solution de révélation (ECL+, GE Healthcare, Vélizy, France) les membranes sont lues par un lecteur EthanDIGE et les signaux analysés par le logiciel ImageJ. L'expression de MRP4 est normalisée par rapport à l'expression de GAPDH.

1.6 Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyennes $\pm$ DS. Les effets inotrope et lusitrope sont exprimés en pourcentage de la valeur de base. La comparaison de deux moyennes est effectuée à l'aide du test t de Student. La comparaison de plusieurs moyennes est effectuée à l'aide d'une analyse de variance avec mesures répétées à une voie, complétée en cas de significativité par un test post-hoc de Newman-Keuls. Une valeur de $P < 0,05$ est choisie pour rejeter l'hypothèse nulle. Tous les tests sont effectués en situation bilatérale avec le logiciel NCSS 7.0 (Statistical Solution Ltd., Cork, Irlande).

2. Resultats

2.1 Etude n° 1 : Evaluation du rôle de la protéine MRP4 dans la réponse à la stimulation β -adrénergique dans la cardiopathie sénescence

Effluent protein MRP4 induces an altered response to β -adrenergic stimulation in the senescent heart.

Carillion A, Feldman S, Jiang C, Atassi F, Na N, Mougenot N, Besse S, Hulot JS, Riivo B, Amour J.

Anesthesiology 2015; 122: 334-42.

Buts :

Les sujets âgés présentent une capacité réduite d'adaptation à l'effort et au stress et cela participe à la morbi-mortalité accrue des patients âgés dans diverses situations péri-opératoires ou de réanimation.⁸ Indépendamment des comorbidités éventuelles, le vieillissement conduit à l'apparition d'un cœur sénescant caractérisé par une dysfonction diastolique et une diminution de la réponse à la stimulation du système adrénergique. En effet, l'effet inotrope positif provoqué par la stimulation des récepteurs β -adrénergiques cardiaques est diminué dans le cœur sénescant. Plusieurs modifications expliquent cette dysfonction comme la surexpression des récepteurs β_3 -adrénergiques et une augmentation de la dégradation de l'AMPc, le second messenger intracellulaire de la signalisation β -adrénergique. Néanmoins, la correction de ces altérations n'a qu'un effet de restauration partielle suggérant une atteinte à d'autres niveaux de la signalisation.

Le canal effluent MRP4 (multidrug resistance associated protein 4) participe à la régulation de la concentration intracellulaire d'AMPc.²¹ Ce transporteur efflue des cardiomyocytes l'AMPc produit en particulier lors de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques. Son expression est modifiée lors du vieillissement dans le foie⁸⁴ mais n'a jamais à notre connaissance été évaluée dans le cœur au cours de la sénescence.

L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer le rôle de MRP4 dans l'altération de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans la cardiopathie sénescante.

Méthodes :

Pour répondre à cette question, nous avons comparé des rats sénescents de 24 mois à des jeunes adultes de 3 mois. La fonction contractile a été évaluée *in vivo* par

échocardiographie sur la fraction de raccourcissement (FRVG) et la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) et *in vitro* par Ionoptix® sur des cardiomyocytes isolés par le raccourcissement des sarcomères (amplitude, vitesse maximale, délai de pic normalisé) et la transitoire calcique (variations d'amplitude) de l'intensité de fluorescence de la sonde Fura2-AM. La stimulation des récepteurs β -adrénergiques a été réalisée par l'application d'isoprotérénol, un agoniste de l'ensemble des récepteurs β -adrénergiques ($10\mu\text{g.kg.min}^{-1}$ *in vivo* et 10^{-6}M *in vitro*). Les expériences ont été menées avec une inhibition sélective du transporteur MRP4 par le MK571 pour déterminer le rôle de ce transporteur (30mg.kg^{-1} *in vivo* et 10^{-6}M *in vitro*). L'expression de la protéine MRP4 a été évaluée par Western Blotting sur des homogénats de ventricule gauche. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ DS.

Résultats :

Nous avons mesuré une contractilité basale normale et une altération de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques chez les animaux sénescents comme dans les études déjà effectuées sur ce modèle. L'effet inotrope positif de l'isoprotérénol était réduit chez les rats sénescents *in vivo* (FEVG $110\pm 8\%$ vs. $124\pm 14\%$, $P<0.001$ et FRVG $120\pm 16\%$ vs. $158\pm 20\%$, $P<0.001$ sur 16 rats, en % de la valeur de base) comme *in vitro* (amplitude 129 ± 37 vs. 148 ± 35 , vitesse maximale 155 ± 60 vs. 179 ± 62 , temps de pic normalisé 75 ± 27 vs. 61 ± 17 , $p<0.05$ respectivement, en % de la valeur de base).

L'expression de MRP4 était 3,6 fois supérieure dans les ventricules gauches de rats sénescents par rapport à ceux des jeunes adultes ($P=0.012$ sur 8 rats par groupe).

L'inhibition de MRP4 par MK571 a restauré l'effet inotrope positif chez les rats sénescents *in vivo* (FEVG $110\pm 8\%$ et FRVG $120\pm 15\%$, en % de la valeur de base) et *in vitro* (amplitude de raccourcissement 161 ± 45 , vitesse maximale 223 ± 83 et délai de pic normalisé

57±17, P<0.05 respectivement) et a induit une augmentation de la transitoire calcique plus importante dans les cardiomyocytes sénescents prétraités que les sham (amplitude 132±25 vs. 113±27; p<0.05). Avec l'inhibition de MRP4, l'effet inotrope positif dans les cœurs ou cardiomyocytes sénescents était comparable à celui observé chez les sujets adultes jeunes.

Conclusion :

Ce travail nous a permis de confirmer la diminution de la réponse inotrope positive à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans la cardiopathie sénescence à l'échelle du cardiomyocyte. Nous avons pu montrer que l'inhibition du transporteur MRP4 restaure la réponse inotrope positive à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans la cardiopathie sénescence *in vivo* comme *in vitro*. La surexpression de MRP4 dans les cœurs sénescents semble renforcer l'importance de ce mécanisme d'élimination de l'AMPc.

Effluent Protein MRP4 Induces an Altered Response to β -Adrenergic Stimulation in the Senescent Rat Heart

Aude Carillion, M.D., Sarah Feldman, Cheng Jiang, M.D., Fabrice Atassi, Ph.D., Na Na, M.D., Nathalie Mougenot, Sophie Besse, Ph.D., Jean-Sébastien Hulot, M.D., Ph.D., Bruno Riou, M.D., Ph.D., Julien Amour, M.D., Ph.D.

ABSTRACT

Background: In the senescent heart, the positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation is reduced, partly by dysregulation of β 1- and β 3-adrenoceptors. The multidrug resistance protein 4 (MRP4) takes part in the control of intracellular cyclic adenosine monophosphate concentration by controlling its efflux but the role of MRP4 in the β -adrenergic dysfunction of the senescent heart remains unknown.

Methods: The β -adrenergic responses to isoproterenol were investigated *in vivo* (stress echocardiography) and *in vitro* (isolated cardiomyocyte by Ionoptix® with sarcomere shortening and calcium transient) in young (3 months old) and senescent (24 months old) rats pretreated or not with MK571, a specific MRP4 inhibitor. MRP4 was quantified in left ventricular homogenates by Western blotting. Data are mean $\pm$ SD expressed as percent of baseline value.

Results: The positive inotropic effect of isoproterenol was reduced in senescent rats *in vivo* (left ventricular shortening fraction $120 \pm 16\%$ vs. $158 \pm 20\%$, $P < 0.001$, $n = 16$ rats) and *in vitro* (sarcomere shortening $129 \pm 37\%$ vs. $148 \pm 35\%$, $P = 0.004$, $n = 41$ or 43 cells) as compared to young rats. MRP4 expression increased 3.6-fold in senescent compared to young rat myocardium ($P = 0.012$, $n = 8$ rats per group). In senescent rats, inhibition of MRP4 by MK571 restored the positive inotropic effect of isoproterenol *in vivo* ($143 \pm 11\%$, $n = 8$ rats). *In vitro* in senescent cardiomyocytes pretreated with MK571, both sarcomere shortening ($161 \pm 45\%$ vs. $129 \pm 37\%$, $P = 0.007$, $n = 41$ cells per group) and calcium transient amplitude ($132 \pm 25\%$ vs. $113 \pm 27\%$, $P = 0.007$) increased significantly.

Conclusion: MRP4 overexpression contributes to the reduction of the positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation in the senescent heart. (ANESTHESIOLOGY 2015; 122:334-42)

ELDERLY patients are exposed to a higher mortality risk during the perioperative period.¹ In the senescent heart, diastolic dysfunction²⁻⁴ and a reduced response to β -adrenoceptor stimulation are observed which may contribute to hemodynamic instability during the perioperative period.⁵ Down-regulation of β 1- and β 2-adrenoceptors impair the positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation,²⁻⁶ whereas overexpression of β 3-adrenoceptor increases nitric oxide production *via* nitric oxide synthase 1, activates protein kinase G, and then promotes the increased hydrolysis of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) by activation of phosphodiesterases.³ However, these abnormalities only partly contribute to the alteration of the β -adrenergic pathway.

A complementary mechanism of regulation of cAMP has been recently described, the multidrug resistance protein 4 (MRP4).^{7,8} This channel was first described in resistance to chemotherapy as it allows malignant cells to extrude the drug and survive⁹ but further studies revealed its role as transporter of cyclic nucleotides.¹⁰⁻¹² In cardiomyocytes

What We Already Know about This Topic

- The multidrug resistance protein MRP4 plays an important role in regulation of intracellular cyclic adenosine monophosphate and β -adrenergic stimulated heart performance
- Elderly patients are at significant risk of perioperative cardiovascular compromise; however, the role of MRP4 in the senescent heart has never been investigated

What This Article Tells Us That Is New

- MRP4 is overexpressed in the senescent rat heart and is involved in the limited positive inotropic response of the senescent heart to β -adrenergic stimulation
- MRP4 may be a therapeutic target for altering the inotropic reserve of elderly patients

and vascular smooth cells, MRP4 is located at the plasma membrane level⁷ and extrudes cAMP.^{7-9,11} *In vitro*, inhibition of MRP4 increased intracellular cAMP level and protein kinase A activity,⁸ leading to a greater positive inotropic

Submitted for publication January 27, 2014. Accepted for publication September 2, 2014. From the Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, UMR INSERM-UPMC 1166, Paris, France (A.C., S.F., C.J., E.A., N.M., J.-S.H., B.R., J.A.); Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine (A.C., J.A.), Department of Emergency Medicine and Surgery (N.N., B.R.), and Department of Pharmacology (J.-S.H.), Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; Université de Reims Champagne-Ardenne and Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Robert Debré Hospital, Reims, France (A.C.); Wuhan University, Wuhan, The People's Republic of China (C.J.); UMR INSERM 902 Université Evry Val d'Essonne, Evry, France (S.B.); and Université Paris-Descartes, Paris, France (S.B.).

Copyright © 2014, the American Society of Anesthesiologists, Inc. Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved. Anesthesiology 2015; 122:334-42

effect of β -adrenoceptor stimulation. In mice with genetic deletion of MRP4, an increase in cAMP has been observed in cardiomyocytes after adenylyl cyclase stimulation.⁷ However, the involvement of MRP4 in the senescence-induced β -adrenergic dysfunction had not yet been studied.

This study tested the hypothesis that an overexpression of MRP4 contributes to the altered response of the β -adrenoceptor stimulation in the senescent heart.

Materials and Methods

Animals

Experiments were conducted in an authorized laboratory under supervision of an authorized researcher (J. Amour, A-75-20-81). The project has been submitted to the relevant Animal Care Committee through the French Ministry of High Education and Research (Comité Régional d'Ethique en Expérimentation Animale Paris-comité 3, Paris, France). Wistar male rats have been studied in two groups: senescent rats (24 months old) and young adult rats (3 months old). Animals were purchased from Janvier (Le Genest St Isle, France) and cared according to the *Guiding Principles in the Care and Use of Animals* in a labeled housing place (B-75-13-08) with food and water *ad libitum*. The heart was removed during anesthesia after the measurements of arterial blood pressure and weighed, except for the hearts used for the isolation of cardiomyocytes, in order to shorten the time of ischemia. Then, the left ventricle was carefully dissected and frozen in liquid nitrogen for Western blotting experiments.

Stress Echocardiography

Transthoracic stress echocardiography was performed on anesthetized rats under 1 to 2% isoflurane using a General Electric Vivid 7 instrument (Aulnay-sous-Bois, France) as previously described.^{3,13,14} Systolic function and inotropy were studied with left ventricular shortening and ejection fractions using a modified version of Simpson's analysis on parasternal short-axis and long-axis views in M mode. These variables were measured in basal conditions and under β -adrenergic stimulation using isoproterenol ($10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, continuous intravenous administration) with or without intravenous pretreatment with MK571 (30 mg/kg, Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) a specific inhibitor of MRP4^{7,15} or the same volume of NaCl 0.9% as control. Stress values were determined after stabilization of heart rate (HR) 6 min after each drug administration.

Arterial Pressure Measurements

In vivo, at least 2 days after the echocardiographic assessment, the rats were anesthetized using pentobarbital (50 mg/kg intraperitoneally) to measure arterial blood pressure. Pressure transducer catheter (size 2F, Millar Micro-tip catheter transducer, model SPR-407; Millar Instruments, Inc., Houston, TX), was introduced into the right carotid artery and connected to a pressure transducer (Gould Electronic, Cleveland, OH). After stabilization, the arterial systolic,

mean arterial pressure and diastolic pressures were recorded. From the arterial blood pressure tracings, the HR and the maximum positive values of first derivative of arterial pressure ($+dP/dt$) were quantified. The cardiac variables were recorded under baseline conditions and under β -adrenergic stimulation using isoproterenol ($10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, continuous intravenous administration although the tail vein) with or without pretreatment with MK571 (intravenous administration of 30 mg/kg 6 min before through the tail vein)^{7,15} or the same volume of normal saline as a control. Stress values were determined after stabilization of HR.

Measurements of Intracellular Calcium Transient and Contractile Function in Isolated Cardiomyocytes

Ventricular cardiomyocytes were isolated from rat hearts on a Langendorf apparatus using enzymatic digestion by collagenase A (Roche Diagnostics, Meylan, France) as previously described.¹⁶ Under intravenous anesthesia (pentobarbital 65 mg/kg, intraperitoneally) the chest was opened, the heart was removed and washed in buffer then connected through the aorta to the Langendorf perfusion cannula. An antegrade perfusion *via* the coronary circulation was applied to the heart with a HEPES buffer (117 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 4.4 mM NaHCO_3 , 1.7 mM MgCl_2 , 11.7 mM glucose, 10 mM creatine, 21 mM HEPES, and 20 mM taurine, all from Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, Saint-Quentin Fallavier, France) bubbled with oxygen and maintained at 37°C and pH 7.40. The cardiac digestion was performed by the perfusion of the same buffer with collagenase A (1.2 to 1.4 mg/ml), 100 μM EGTA and 240 μM CaCl_2 (both from Sigma-Aldrich). After 60 to 80 min, the heart was removed and the atria excised. A careful mechanical dissection completed the digestion. The cells were filtered and resuspended in the native calcium-free buffer with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Calcium was progressively added to the suspension to reach an extracellular calcium concentration of 0.5 mM. Freshly isolated cardiomyocytes were used in the same day. The ventricular cardiomyocytes were loaded for 20 min at room temperature with Fura2-AM (1 μM , Molecular Probes, Invitrogen, Saint-Aubin, France) and then resuspended in the HEPES buffer with 0.5 mM calcium. Contractility and calcium transient of the cardiomyocytes were assessed on each cell with a Ionoptix® platform (Ionoptix Corporation, Milton, MA).¹⁷ Only rod-shaped cardiomyocytes with sharp edges were studied. Cardiomyocytes with spontaneous contraction or sarcolemal blebs were avoided. Myocytes were electrically stimulated at 1 Hz and 8 V in a room at 25°C. The contractile properties of the cardiac myocytes were analyzed with the IonWizard® software (Ionoptix®, Ionoptix Corporation) from the trace of the sarcomere shortening by peak shortening (PS), time to PS normalized to PS and the maximum shortening velocity ($-dL/dt$) for the shortening phase and time to 90% relengthening and the maximum relengthening velocity ($+dL/dt$) for the relengthening phase were recorded.

Myocytes were alternatively exposed to a light of 340 and 380 nm by the Fluorescence System Interface with Hyper-switch (Ionoptix Corporation). Fura2-AM is a fluorescent dye whose emission wavelength depends on the calcium concentration and the ratio 340/380 of fluorescence of the Fura2-AM is correlated to the intracellular calcium level.¹⁷ The changes in Fura2-fluorescence intensity (FFI) reflect the variation of the intracellular calcium level during the cardiac cycle, also known as calcium transient. The calcium transient was described in our study by the Δ FFI, amplitude of the FFI increase after twitch (peak FFI-baseline FFI) and the time course of the fluorescence constant decay (τ). The inhibition of MRP4 was provided by a pretreatment with MK571 (10^{-7} M). The contraction and fluorescence ratio of the cardiomyocyte were recorded continuously at basal condition and after adjunction of isoproterenol (10^{-6} M). Since calibration was not performed, only percent changes with isoproterenol and baseline values of Δ FFI could be compared between groups. Stress values were evaluated at maximal cell contraction. As MK571 could also inhibit leukotrienes receptors CysLT1 and CysLT2 and thus influence the response to β -adrenoceptor stimulation, we performed additional experimentation in isolated cardiomyocytes using BAY-u9773 (10^{-7} M) (Cayman Chemical Bertin Pharma, Montigny-le Bretonneux, France), a specific inhibitor of CysLT1 and CysLT2 receptors.¹⁸ Then, β -adrenoceptor stimulation was performed as described in the experiment with MK571.

Western Blotting

The left ventricles were removed from anesthetized rats and frozen in liquid nitrogen. The samples were homogenated in a lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% triton, phosphatase and protease-inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich). The protein concentration was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France). After denaturation in Laemmli buffer, 60 μ g of total protein extract was loaded in each lane for separation in a sodium dodecyl sulfate 9% polyacrylamide electrophoresis gel and transferred on a nitrocellulose membrane (Hybond, Amersham, GE Healthcare, Velizy, France). After saturation in milk, each membrane was incubated overnight at 4°C with primary antibodies (anti-MRP4 1/200: M4I-80 (Abcam, Paris, France), anti-CysLT1 Receptor 1/10,000 or anti-CysLT2 receptor 1/5,000 (both from Cayman Chemical), and anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 1/1,500 (ab9485, Abcam)).⁸ The day after, membranes were washed with a Tris-saline buffer with Tween and incubated with appropriate secondary antibody (anti-rat 1/2,500, anti-rabbit 1/2,500, all from Cell Signaling, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). Relative quantification of the targeted protein was achieved by fluorescence recording on EthanDIGE reader with an ECL[®] detection system (GE Healthcare). MRP4 was detected at 150 kDa and GAPDH at 37 kDa. MRP4 expression was

quantified using Image J software (NIH, Bethesda, MA) and normalized *versus* GAPDH expression to ensure no variation in protein gel loading. In addition, Ponceau S staining was performed to confirm that GAPDH expression did not differ between young and senescent rats. Two membranes were generated and comparison was performed on ratio of MRP4/GAPDH expression normalized on the mean expression in control samples in the concerning gel.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD. We used absolute values to compare baseline characteristics between young and senescent rats and delta percent changes from baseline to compare the pharmacological effects, as previously described.^{3,13,14,16,19,20} As a matter of fact, SD of delta percent changes represents the variation of the pharmacological effect we are measuring, whereas the SD of absolute values mainly reflects interindividual differences. Moreover, some variables were expected to significantly differ at baseline because we compared young and senescent rats. The main criteria of our study was sarcomere shortening, especially PS. Assuming a baseline value of PS of $10.7 \pm 2.3\%$, an alpha risk of 0.05 and a beta risk of 0.20, we determined that a sample size of at least $n = 35$ cells per group would enable us to detect a 15% change in PS (PASS 11 software, Statistical Solutions Ltd., Cork, Ireland). Young and senescent rats or cells were studied alternatively. Experiments could not be blinded because young and senescent rats look particularly different. For *in vivo* experiments, treatment was allocated before anesthesia by manual randomization. For *in vitro* experiments, cells were parted in aliquots. Inhibitor or suspension buffer was added after manual randomization before being examined. Means were compared using the Student *t* test or one-way ANOVA with *post hoc* test Newman-Keuls. All *P* values were two-tailed and a *P* value of less than 0.05 was considered as significant. Statistical analysis was performed using NCSS 7.0 software (Statistical Solutions Ltd.).

Results

We studied a total of 21 young and 20 senescent rats. Two young and four senescent rats exhibited ventricular fibrillation or asystole during invasive arterial pressure measurement and were excluded from the analysis.

Baseline Characteristics

Baseline characteristics of rats are reported in table 1. As expected, senescent rats had significantly higher body weight and heart weight than young rats but the heart to body weight ratio was not significantly different between groups. Using echocardiography, HR in senescent rats was significantly lower in senescent than that in young rats. Both left ventricular shortening and ejection fractions were not significantly different between senescent and young rats. Under baseline conditions *in vivo*, the HR was significantly lower in senescent rats but the mean arterial pressure was

Table 1. Characteristics of Young and Senescent Rats

	Young	Senescent
General characteristics (no. of rats)	(n = 21)	(n = 20)
Body weight (g)	430 ± 60	566 ± 50*
Heart weight (mg)	(n = 12)	(n = 12)
Heart weight/body weight (mg/g)	872 ± 104	1,294 ± 274*
Echocardiography (no. of rats)	(n = 16)	(n = 16)
Heart rate (beats/min)	366 ± 33	331 ± 13*
LV ejection fraction (%)	81 ± 7	80 ± 3
LV shortening fraction (%)	47 ± 6	44 ± 4
Arterial catheterization (no. of rats)	(n = 16)	(n = 16)
HR (beats/min)	420 ± 35	355 ± 33*
Systolic arterial pressure (mmHg)	130 ± 16	135 ± 19
Diastolic arterial pressure (mmHg)	105 ± 12	105 ± 16
Mean arterial pressure (mmHg)	113 ± 13	115 ± 17
+dP/dt (mmHg/s)	2,680 ± 501	2,250 ± 665*
Sarcomere kinetics (no. of cells)	(n = 43)	(n = 41)
PS (%)	10.7 ± 2.3	9.5 ± 3.0*
TPS (ms)	11.8 ± 3.0	20.6 ± 9.6*
-dL/dt (mm/s)	-3.0 ± 0.8	-2.1 ± 1.0*
+dL/dt (mm/s)	2.7 ± 1.0	1.7 ± 1.1*
TR90 (ms)	261 ± 83	340 ± 102*
Calcium transient (no. of cells)	(n = 43)	(n = 41)
ΔFFI (arbitrary units)	0.53 ± 0.19	0.37 ± 0.27†
Tau (ms)	124 ± 25	125 ± 28

Data are mean ± SD.

* $P < 0.05$ vs. Young. †Because calibration was not performed, these values could not be compared between young and senescent rats.

-dL/dt = maximum shortening velocity; +dL/dt = maximum relengthening velocity; +dP/dt = first derivative of arterial pressure; ΔFFI = changes in Fura-2 fluorescence intensity; HR = heart rate; LV = left ventricular; PS = peak shortening; TPS = time to peak shortening; TR90 = time to 90% relengthening.

not significantly different between groups. *In vitro*, the basal characteristics of sarcomere shortening of the cardiomyocytes revealed a moderate alteration of contractility and relaxation parameters in the senescent cardiomyocytes. The cardiomyocytes from senescent rats displayed reduced PS and -dL/dt and increased time to PS. The +dL/dt was significantly lower and time to 90% relengthening was significantly higher in the senescent cardiomyocytes (table 1).

Effects of MK571, a Specific Inhibitor of MRP4

Since MK571 may also inhibit leukotrienes receptors, we verified that inhibition of CysLT1 and CysLT2 receptors by BAY-u9773 did not significantly modify the response to isoproterenol on sarcomere shortening in isolated cardiomyocytes from young rats (data not shown). Moreover, CysLT1 and CysLT2 receptors protein expression were not significantly different between young and in senescent rats (1.0 ± 0.7 vs. 1.0 ± 0.8 arbitrary units, $P = 0.99$ and 1.0 ± 0.8 vs. 1.0 ± 0.7 arbitrary units, $P = 0.90$, respectively).

Administration of saline did not significantly modify any echocardiographic variables in the senescent or young groups. In senescent rats, administration of MK571 had no significant effect on any echocardiographic variable. In contrast, in young rats, a slight but significant increase in left ventricular shortening and ejection fractions was observed (table 2). During arterial catheterization, administration

of saline or MK571 induced no significant effect on HR, mean arterial pressure, or dP/dt in any group. Nevertheless, in young rats during echocardiography, the isoproterenol-induced increase in HR seems to be blunted by MK571 (table 2), an effect not observed during arterial catheterization (table 2). We did not test the direct effect of MK571 on sarcomere shortening and calcium transient since isolated cells were incubated with or without MK571. Nevertheless, we did not observe any significant difference in the groups incubated with or without MK571 (table 2).

Effects of MK571 on β -Adrenoceptor Stimulation

In vivo, using echocardiography, the positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation was altered in senescent rats as compared with young rats. Pretreatment with MK571 restored the positive inotropic effect in the senescent group to the level observed in young rats (fig. 1).

During arterial catheterization, the increase in HR and the decrease in mean arterial pressure induced by isoproterenol were not significantly different between senescent and young rats. Pretreatment with MK571 restored the positive inotropic effect in the senescent group to the level observed in young rats (fig. 1).

In vitro, the senescent cardiomyocytes exhibited a reduced positive inotropic response to isoproterenol compared with young cardiomyocytes (fig. 2). Pretreatment with MK571 restored the positive inotropic response of sarcomere shortening in senescent cardiomyocytes returning to the level observed in young cardiomyocytes, whereas it had no significant effect in young cardiomyocytes (table 2). Calcium transient increased with β -adrenoceptor stimulation. In senescent group, calcium transient increase was more important in cardiomyocytes pretreated with MK571 than in non-pretreated cardiomyocytes (fig. 3).

Expression of MRP4

In senescent rats, MRP4 protein expression increased 3.6-fold in comparison to young rats ($P = 0.012$) (fig. 4). Using Ponceau staining, we confirmed the absence of significant variation in GAPDH expression in senescent compared to young rats (203 ± 9 vs. 211 ± 15 arbitrary units, $P = 0.70$).

Discussion

In the current study, we confirmed that the positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation is altered in senescent hearts. We observed that the expression of MRP4 was 3.6-fold increased in left ventricle of senescent rats and inhibition of MRP4 by MK571 restored the positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation in senescent rats both *in vivo* and *in vitro*. In parallel, the calcium transient was improved by MK571 pretreatment in the senescent cardiomyocytes. Consequently, these results strongly support the role of MRP4 in the altered β -adrenergic response in the senescent heart.

In vivo, our results confirm that the systolic function was preserved (left ventricular shortening and ejection

Table 2. Comparison of the Response to β -Adrenergic Stimulation in Young and Senescent Rats with or without Pretreatment by MK571

	Baseline	Saline	Isoproterenol	Baseline	MK	Isoproterenol
	Young			Young with MK571		
Echocardiography (no. of rats)	(n = 8)			(n = 8)		
HR (beats/min)	361 $\pm$ 40	358 $\pm$ 20	421 $\pm$ 30*	371 $\pm$ 28	358 $\pm$ 17	387 $\pm$ 29
LV ejection fraction (%)	79 $\pm$ 9	78 $\pm$ 7	96 $\pm$ 3*	83 $\pm$ 5	87 $\pm$ 5*	97 $\pm$ 2*
LV shortening fraction (%)	46 $\pm$ 6	45 $\pm$ 7	72 $\pm$ 8*	47 $\pm$ 5	53 $\pm$ 8*	71 $\pm$ 5*
Arterial catheterization (no. of rats)	(n = 6)			(n = 4)		
HR (beats/min)	440 $\pm$ 17	450 $\pm$ 33	530 $\pm$ 23*	389 $\pm$ 33	384 $\pm$ 41	525 $\pm$ 50*
Mean arterial pressure (mmHg)	116 $\pm$ 15	110 $\pm$ 11	61 $\pm$ 8*	109 $\pm$ 11	107 $\pm$ 12	60 $\pm$ 8*
+dP/dt (mmHg/s)	2,800 $\pm$ 566	2,600 $\pm$ 860	6,733 $\pm$ 1,115*	2,500 $\pm$ 383	2,933 $\pm$ 787	5,800 $\pm$ 1,649*
Sarcomere kinetics (no. of cells)	(n = 43)			(n = 41)		
PS (%)	10.7 $\pm$ 2.3	NA	15.4 $\pm$ 2.5	NA	9.5 $\pm$ 3.0	15.3 $\pm$ 2.4
TPS (ms)	11.8 $\pm$ 3.0		6.9 $\pm$ 1.7		20.6 $\pm$ 9.6	7.0 $\pm$ 2.6
-dL/dt (mm/s)	-3.0 $\pm$ 0.8		-5.1 $\pm$ 1.5		-2.1 $\pm$ 1.0	-5.5 $\pm$ 2.2
+dL/dt (mm/s)	2.7 $\pm$ 1.0		3.7 $\pm$ 1.4		1.7 $\pm$ 1.1	3.9 $\pm$ 1.3
TR90 (ms)	261 $\pm$ 83		214 $\pm$ 83		340 $\pm$ 102	211 $\pm$ 59
	Senescent			Senescent with MK571		
Echocardiography (no. of rats)	(n = 8)			(n = 8)		
Heart rate (beats/min)	327 $\pm$ 13	322 $\pm$ 10	333 $\pm$ 13	335 $\pm$ 12†	320 $\pm$ 23	341 $\pm$ 21
LV ejection fraction (%)	81 $\pm$ 4	80 $\pm$ 3	89 $\pm$ 3	78 $\pm$ 2	79 $\pm$ 3	92 $\pm$ 3
LV shortening fraction (%)	46 $\pm$ 4	44 $\pm$ 3	54 $\pm$ 4	42 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2	61 $\pm$ 5
Arterial catheterization (no. of rats)	(n = 4)			(n = 4)		
HR (beats/min)	351 $\pm$ 30	376 $\pm$ 19	424 $\pm$ 36*	360 $\pm$ 33	360 $\pm$ 33	446 $\pm$ 19*
Mean arterial pressure (mmHg)	118 $\pm$ 16	113 $\pm$ 28	73 $\pm$ 44*	112 $\pm$ 20	113 $\pm$ 30	71 $\pm$ 13*
+dP/dt (mmHg/s)	1,950 $\pm$ 661	2,150 $\pm$ 412	3,070 $\pm$ 1,429*	2,550 $\pm$ 598	2,750 $\pm$ 1,370	4,900 $\pm$ 744*
Sarcomere kinetics (no. of cells)	(n = 41)			(n = 41)		
PS (%)	9.5 $\pm$ 3.0	NA	11.7 $\pm$ 3.3†	NA	8.8 $\pm$ 2.9	13.2 $\pm$ 2.3
TPS (ms)	20.6 $\pm$ 9.6		14.1 $\pm$ 5.7†		20.9 $\pm$ 8.3	11.0 $\pm$ 3.2
-dL/dt (mm/s)	-2.1 $\pm$ 1.0		-3.0 $\pm$ 1.3†		-1.8 $\pm$ 0.8	-3.7 $\pm$ 1.2
+dL/dt (mm/s)	1.7 $\pm$ 1.1		1.9 $\pm$ 1.1†		1.7 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 1.5
TR90 (ms)	340 $\pm$ 102		316 $\pm$ 65†		316 $\pm$ 67	290 $\pm$ 74

Data are mean $\pm$ SD. Δ is % of baseline value.

* P < 0.05 vs. baseline; † P < 0.05 vs. Young.

-dL/dt = maximum shortening velocity; +dL/dt = maximum relengthening velocity; +dP/dt = first derivative of arterial pressure; Δ FFI = changes in Fura-2 fluorescence intensity; HR = heart rate; LV = left ventricular; NA = not applicable; PS = peak shortening; TPS = time to peak shortening; TR90 = time to 90% relengthening.

fractions) in senescent hearts, as previously observed.³ *In vitro*, the cardiomyocytes extracted from senescent rats exhibited an impaired sarcomere shortening with prolonged duration of shortening (time to peak shortening) and time to 90% relengthening consistent with the literature.^{2,4} The positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation was reduced in senescent rats both *in vivo* and *in vitro*. The senescent heart displays different mechanisms to preserve itself from an excessive work such as the reduction of positive chronotropic and inotropic effects of the β -adrenergic stimulation. β -Adrenergic dysfunction may contribute to long-term saving of heart function and senescence adaptation. Unfortunately during the perioperative period, this β -adrenergic dysfunction limits cardiac output adaptation and favors hemodynamic instability in aging patients.³ Although β -blockers have been shown to improve long-term survival in patients with chronic heart failure and may be also beneficial during the perioperative

period, deleterious effects have also been clearly demonstrated in the perioperative period when bleeding or post-operative complications occur.²¹

Several modifications in the β -adrenergic signaling pathway have been described in the senescent heart.^{2,4} Due to decreased expression of β 1- and β 2-adrenoceptors, less cAMP is produced in the senescent heart after isoproterenol. The effect of direct stimulation of adenylyl cyclase is also reduced, but the effect of a cAMP analog is preserved, confirming the crucial role of intracellular cAMP level in the β -adrenergic response.⁶ β 3-adrenoceptor induces the production of nitrite oxide by nitrite oxide synthase 1 that activates protein kinase G which increases the catabolism of cAMP by phosphodiesterase activation.³ An increase in β 3-adrenoceptor expression and activity in the senescent heart³ contributes to the reduction of the positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation as we previously observed in the diabetic cardiomyopathy.¹³

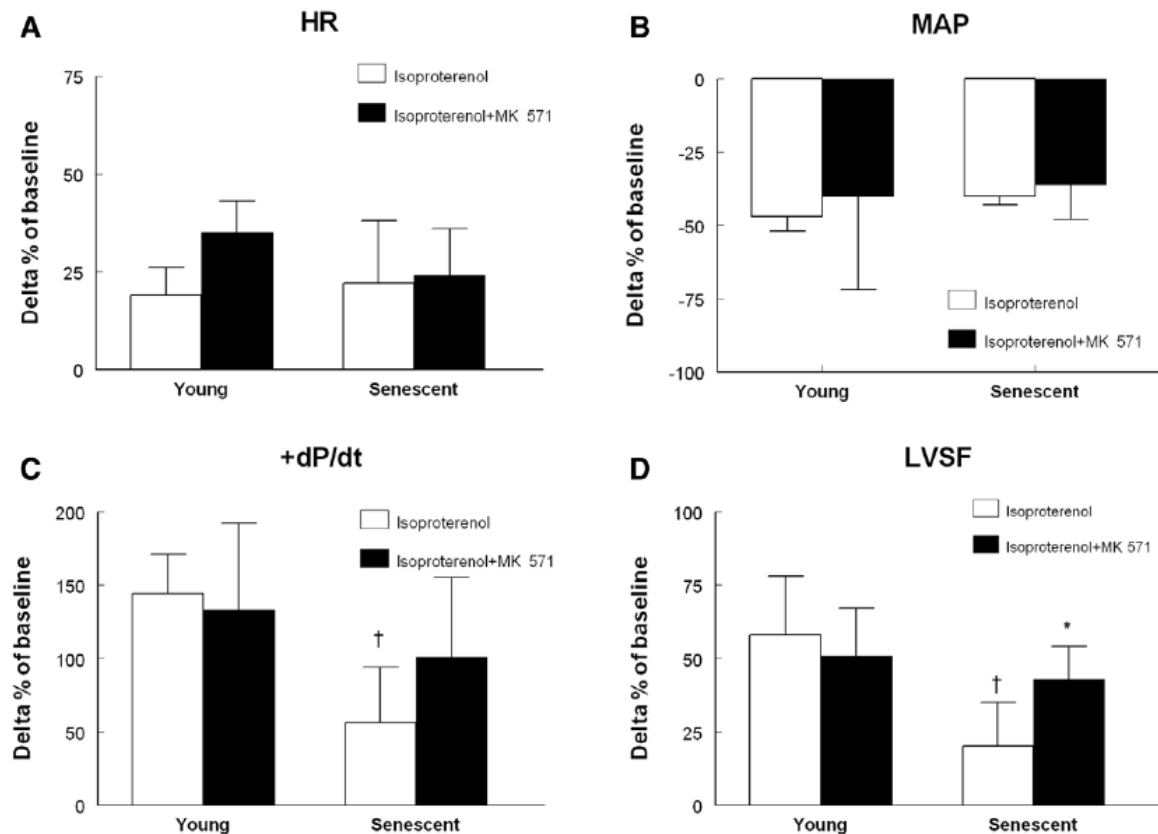


Fig. 1. Comparison of the effect of isoproterenol on heart rate (HR) (A), mean arterial blood pressure (MAP) (B), positive first derivative for maximal rates of arterial pressure development (+dP/dt) (C), and left ventricular shortening fraction (LVSF) (D) in young and senescent rats with and without MK571. HR, MAP, and +dP/dt were obtained during invasive catheterization (n = 6 and 4, respectively), and LVSF was obtained during echography (n = 8 in each group). Data are mean $\pm$ SD. * P < 0.05 versus group without MK571; $\dagger P$ < 0.05 versus Young group.

The transmembrane protein MRP4 is known as an effluent pump of cyclic nucleotides in platelets,²² hepatic,⁹ and renal cells.²³ MRP4 is overexpressed in the liver of female aging mice.²⁴ In vascular smooth cells^{8,11,25} and cardiomyocytes,⁷ MRP4 is known to control the efflux of cAMP. In cultured cells, MRP4 could regulate the submembrane pool of cAMP by efflux and interaction with phosphodiesterases.¹⁰ In this context, the large MRP4 overexpression observed in senescent rats suggests a pathway for increased removal from the myocyte of cAMP that was synthesized after β -adrenoceptor stimulation. Such cAMP elimination from the cell could markedly decrease the positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation.

MK571 has been used as a specific inhibitor of MRP4.^{7,8,11,12} The effect of MK571 is rapid and constant after intravenous administration.^{15,26} Inhibition of MRP4 by MK571 induces an elevation in cAMP intracellular concentration in vascular smooth cells^{8,11} and cardiomyocytes.¹² Combined inhibition of MRP4 and phosphodiesterases induces an elevation of cAMP more important than with isolated inhibition of MRP4 suggesting that the two mechanisms may be additive.¹¹ Inhibition of MRP4

by MK571 enhanced the chronotropic effect of isoproterenol in neonatal mice cardiomyocytes.¹² In our study, MK571 had no or little effect on *in vivo* or *in vitro* contractility before β -adrenergic stimulation. This result is consistent with the fact that MK571 is not a direct agonist of β -adrenoceptors and MRP4 only affects submembrane compartment of cAMP produced after β -adrenergic stimulation.⁷ The elevation of cAMP after isoproterenol stimulation of isolated cardiac myocytes from 9-month-old mice is increased by silencing of MRP4.⁷ In agreement with these results, we demonstrated here that MRP4 inhibition restored the positive inotropic effect of β -adrenoceptors stimulation both *in vivo* and *in vitro* in the senescent rats. MRP4 may extrude the cAMP produced by β -adrenoceptor stimulation by isoproterenol and may limit the increase in intracellular second messenger concentration. The intracellular calcium level closely reflects the contractility of a muscle as it is directly involved in the actin/myosin interaction and muscle shortening. The β -adrenergic stimulation induces a positive inotropic effect *via* cAMP production which activates the protein kinase A. Activation of protein

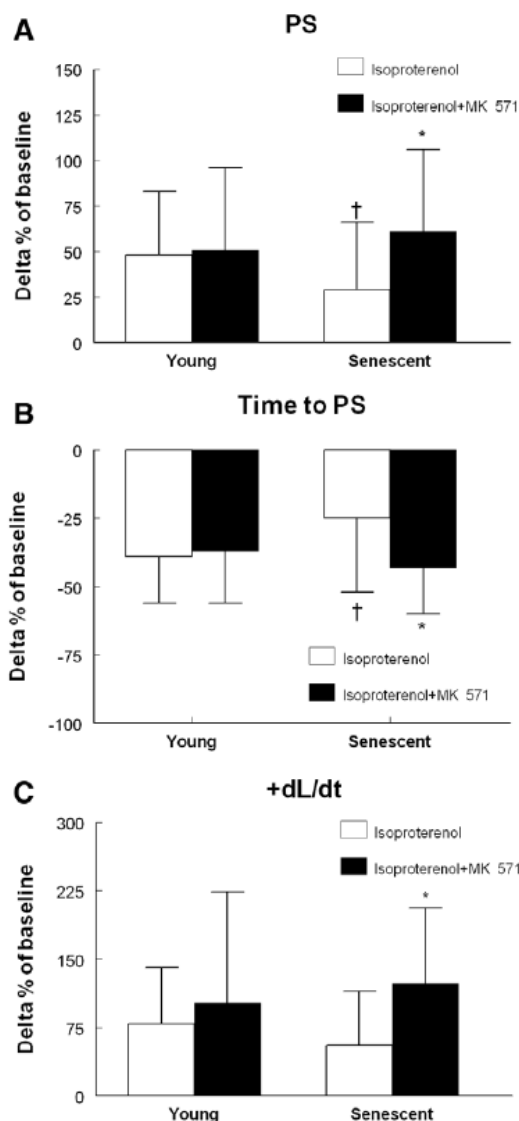


Fig. 2. Sarcomere kinetics: comparison of the effect of isoproterenol on the peak shortening (PS) amplitude (A), time to PS (B), and maximum velocity of shortening ($-dL/dt$) (C) in young and senescent rats with and without MK571 ($n = 41$ to 43 cells in each group). Data are mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ versus group without MK571; † $P < 0.05$ versus Young group.

kinase A increases calcium transient after phosphorylation of targeted proteins (calcium channel, ryanodine receptor, sarco-endoplasmic reticulum ATPase, and troponin). Since calcium transient was altered in senescent cardiomyocytes and since we observed an increase in calcium transient amplitude and sarcomere shortening induced by β -adrenergic stimulation after MK571 pretreatment, we can conclude that MRP4 overexpression plays a role in the altered inotropic response of β -adrenergic stimulation in the senescent heart.

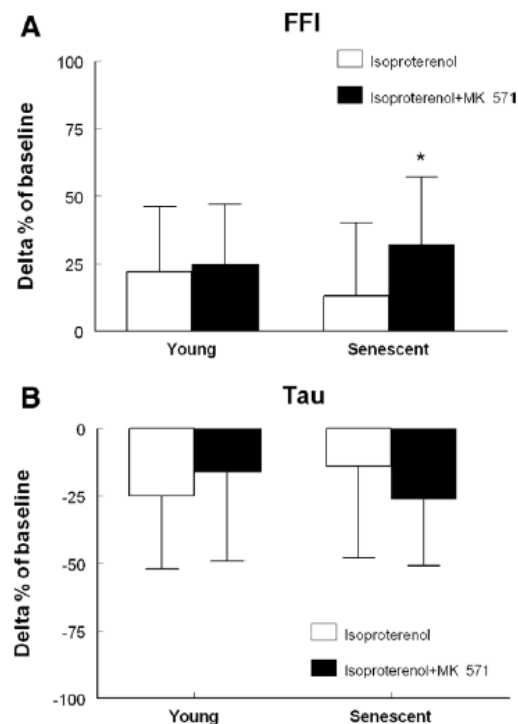


Fig. 3. Calcium transient: comparison of the effect of isoproterenol (10^{-6} M) on the amplitude of calcium transient (changes in Fura2-fluorescence intensity [ΔFFI]) (A) and time decay constant of the calcium transient (τ) (B) in isolated cardiomyocytes from young and senescent rats with and without MK571 ($n = 41$ to 43 cells in each group). Data are mean $\pm$ SD.

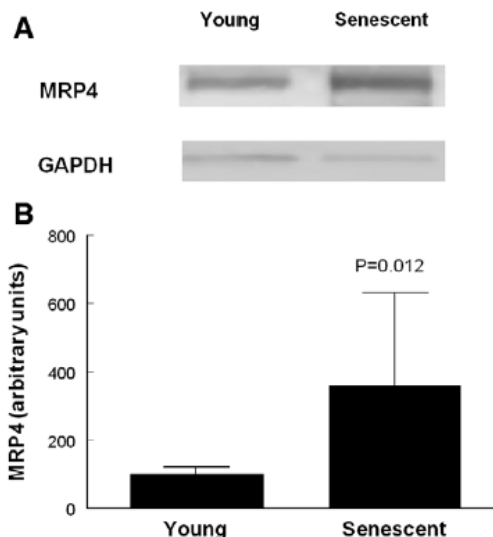


Fig. 4. Representative Western blot (A) and normalized densitometric data (B) showing left ventricular expression of multidrug resistance protein 4 (MRP4) compared with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in young and senescent rats ($n = 8$ in each group). Data are mean $\pm$ SD.

The following points have to be considered to assess the clinical relevance of our results. First, these experiments were conducted in rats and the results may not be generalized to humans as rat myocardium exhibits several differences with human myocardium, including MRP4 expression and function.²⁷ Further experiments are mandatory to confirm the increased expression and the role of MRP4 in the human senescent heart. Second, *in vivo* studies require anesthetized animals. We used isoflurane inhalation for echocardiography and pentobarbital for arterial blood pressure recordings. Halogenated agents are known to interfere with β -adrenergic stimulation in different cardiomyopathies,^{19,20} but our results are consistent, regardless of the anesthetic technique used. Since the isoproterenol-induced increase in HR seems to be blunted by MK571 in young rats during echography (*i.e.*, with isoflurane) but not during arterial catheterization (*i.e.*, with pentobarbital), we cannot rule out the hypothesis that an interaction between MK571 and baroreflex activity was differentially altered by anesthetics *in vivo*. Third, *in vitro* experiments may be affected by a selection bias as cardiomyocytes surviving to cell isolation may differ from the more disabled ones present in the total heart. Fourth, we elected not to directly measure cAMP or cyclic guanosine monophosphate concentrations since these messenger molecules are compartmentalized within the cell, and average cellular concentrations may not reflect critical concentrations at near relevant kinase mediators within the cell. Furthermore, MRP4 has been located in caveolae near from β -adrenoceptors and we think it could effectively act on this pool of cAMP, not necessarily on the whole cell cAMP mean concentration.⁷ Fifth, we used MK571 to selectively inhibit MRP4. This drug is also an inhibitor of the CysLT1 receptor for leukotrienes D4.^{15,28} The inhibition of CysLT1 and CysLT2 receptors by MK571 could alleviate the negative inotropic effect due to leukotrienes D4 in heart and be confusing in interpretation of our results.^{17,29} However, inhibition of CysLT1 and CysLT2 receptors by BAY-u9773 did not modify the response to isoproterenol in young cardiomyocytes and CysLT1 and CysLT2 receptor expressions were not significantly modified in senescent hearts. In the same manner, that we cannot rule out the possibility that the *in vivo* effects of MK571 could also be modulated by CysLT1 receptors in vascular smooth muscle.³⁰ Sixth, in a therapeutic view, chronic inhibition of MRP4 may alter other organ function or may be compensated by an increase in phosphodiesterases.

In conclusion, we observed that MRP4 is overexpressed in the heart of senescent rats and plays an important role in the altered positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation.

Acknowledgments

The authors thank David Baker, D.M., F.R.C.A. (Department of Anesthesiology and Critical Care, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France), for reviewing the manuscript

and Anne-Marie Lompré, Ph.D. (UMR INSERM 1166, Paris, France), for critical reading of the manuscript.

Dr. Carillion was the recipient of a research grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (Paris, France; FRM grant no. DEA20090616244). Dr. Jiang was the recipient of a doctoral grant from the People's Republic of China (State Scholarship Fund by China Scholarship Council; grant no. 201206270014).

Competing Interests

The authors declare no competing interests.

Correspondence

Address correspondence to Dr. Carillion: Département d'Anesthésie-Réanimation, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47–83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France. aude.carillion@psl.aphp.fr. Information on purchasing reprints may be found at www.anesthesiology.org or on the masthead page at the beginning of this issue. ANESTHESIOLOGY's articles are made freely accessible to all readers, for personal use only, 6 months from the cover date of the issue.

References

- Gajdos C, Kile D, Hawn MT, Finlayson E, Henderson WG, Robinson TN: Advancing age and 30-day adverse outcomes after nonemergent general surgeries. *J Am Geriatr Soc* 2013; 61:1608–14
- Lakatta EG: Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: Cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation* 2003; 107:490–7
- Birenbaum A, Tesse A, Loyer X, Michelet P, Andriantsitohaina R, Heymes C, Riou B, Amour J: Involvement of beta 3-adrenoceptor in altered beta-adrenergic response in senescent heart: Role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *ANESTHESIOLOGY* 2008; 109:1045–53
- Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ: Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarco-plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Circulation* 2000; 101:790–6
- Stratton JR, Cerqueira MD, Schwartz RS, Levy WC, Veith RC, Kahn SE, Abrass IB: Differences in cardiovascular responses to isoproterenol in relation to age and exercise training in healthy men. *Circulation* 1992; 86:504–12
- Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Ji X, Boluyt MO, Cheng H, Lakatta EG, Koch WJ: Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest* 1998; 101:1273–82
- Sassi Y, Abi-Gerges A, Fauconnier J, Mougenot N, Reiken S, Haghighi K, Kranias EG, Marks AR, Lacampagne A, Engelhardt S, Hatem SN, Lompre AM, Hulot JS: Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J* 2012; 26:1009–17
- Hara Y, Sassi Y, Guibert C, Gambaryan N, Dorfmueller P, Eddahibi S, Lompre AM, Humbert M, Hulot JS: Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:2888–97
- Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH, Schuetz JD: Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci* 2002; 4:E14
- Xie M, Rich TC, Scheitrum C, Conti M, Richter W: Inactivation of multidrug resistance proteins disrupts both cellular extrusion and intracellular degradation of cAMP. *Mol Pharmacol* 2011; 80:281–93

11. Sassi Y, Lipskaia L, Vandecasteele G, Nikolaev VO, Hatem SN, Cohen Aubart F, Russel FG, Mougenot N, Vrignaud C, Lechat P, Lompré AM, Hulot JS: Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest* 2008; 118:2747–57
12. Sellers ZM, Naren AP, Xiang Y, Best PM: MRP4 and CFTR in the regulation of cAMP and β -adrenergic contraction in cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* 2012; 681:80–7
13. Amour J, Loyer X, Le Guen M, Mabrouk N, David JS, Camors E, Carusio N, Vivien B, Andriantsitohaina R, Heymes C, Riou B: Altered contractile response due to increased β_3 -adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: The role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *ANESTHESIOLOGY* 2007; 107:452–60
14. Amour J, Loyer X, Michelet P, Birenbaum A, Riou B, Heymes C: Preservation of the positive lusitropic effect of β -adrenoceptors stimulation in diabetic cardiomyopathy. *Anesth Analg* 2008; 107:1130–8
15. Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Epstein CJ, Laroux S, Granger DN: Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. *Am J Physiol* 1997; 273(6 pt 1):G1326–32
16. Biais M, Jouffroy R, Carillion A, Feldman S, Jobart-Malfait A, Riou B, Amour J: Interaction of metabolic and respiratory acidosis with α and β -adrenoceptor stimulation in rat myocardium. *ANESTHESIOLOGY* 2012; 117:1212–22
17. Ren J: Attenuated cardiac contractile responsiveness to insulin-like growth factor I in ventricular myocytes from biobreeding spontaneous diabetic rats. *Cardiovasc Res* 2000; 46:162–71
18. Liu P, Misurski DA, Gopalakrishnan V: Cysteinyl leukotriene-dependent $[Ca^{2+}]_i$ responses to angiotensin II in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284:H1269–76
19. Amour J, David JS, Vivien B, Coriat P, Riou B: Interaction of halogenated anesthetics with α - and β -adrenoceptor stimulations in diabetic rat myocardium. *ANESTHESIOLOGY* 2004; 101:1145–52
20. Vivien B, David JS, Hanouz JL, Amour J, Lecarpentier Y, Coriat P, Riou B: The paradoxical positive inotropic effect of sevoflurane in healthy and cardiomyopathic hamsters. *Anesth Analg* 2002; 95:31–8
21. Le Manach Y, Collins GS, Ibanez C, Goarin JP, Coriat P, Gaudric J, Riou B, Landais P: Impact of perioperative bleeding on the protective effect of β -blockers during infrarenal aortic reconstruction. *ANESTHESIOLOGY* 2012; 117:1203–11
22. Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow LE, Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Greinacher A, Kroemer HK: The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood* 2004; 104:3603–10
23. Yacovino LL, Aleksunes LM: Renal efflux transporter expression in pregnant mice with type I diabetes. *Toxicol Lett* 2012; 211:304–11
24. Fu ZD, Csanaky IL, Klaassen CD: Effects of aging on mRNA profiles for drug-metabolizing enzymes and transporters in livers of male and female mice. *Drug Metab Dispos* 2012; 40:1216–25
25. Cheng D, Ren J, Jackson EK: Multidrug resistance protein 4 mediates cAMP efflux from rat preglomerular vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37:205–7
26. Depré M, Margolskee DJ, Hsieh JY, Van Hecken A, Buntinx A, De Lepeleire I, Rogers JD, De Schepper PJ: Plasma drug profiles and tolerability of MK-571 (L-660,711), a leukotriene D₄ receptor antagonist, in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43:427–30
27. Russel FG, Koenderink JB, Masereeuw R: Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): A versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29:200–7
28. Wong WS, Zhu H, Liao W: Cysteinyl leukotriene receptor antagonist MK-571 alters bronchoalveolar lavage fluid proteome in a mouse asthma model. *Eur J Pharmacol* 2007; 575:134–41
29. Feurstein G: Leukotrienes and the cardiovascular system. *Prostaglandins* 1984; 27:781–92
30. Mazzetti L, Franchi-Micheli S, Nistri S, Quattrone S, Simone R, Ciuffi M, Zilletti L, Failli P: The ACh-induced contraction in rat aortas is mediated by the Cys Lt1 receptor *via* intracellular calcium mobilization in smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2003; 138:707–15

2.2 Etude n° 2 : Etude de l'impact de l'obésité associée au diabète sur la stimulation β -adrénergique

Modification of the β -Adrenoceptor Stimulation Pathway in Zucker Obese and Obese Diabetic Rat Myocardium.

Jiang C, **Carillion A**, Na N, De Jong A, Feldman S, Lacorte JM, Bonnefont-Rousselot D, Riou B, Amour J

Critical Care Medicine 2015

Buts :

L'obésité est une maladie en pleine expansion démographique aux conséquences sanitaires préoccupantes en faisant une priorité de santé publique dans les pays développés. Un syndrome métabolique associant une intolérance glucidique, une dyslipidémie, une hypertension artérielle et une augmentation de l'activité sympathique est observé chez les sujets obèses. Il est responsable d'une augmentation de la mortalité péri-opératoire et du risque cardiovasculaire.

L'effet inotrope positif de la stimulation β -adrénergique est crucial pour l'adaptation péri-opératoire du débit cardiaque. Il est diminué au cours de la sénescence⁸ et effondré au cours du diabète de type 1² mais a été peu étudié dans le cadre de l'obésité. Plusieurs mécanismes ont été identifiés ces modèles pour expliquer cette dysfonction comme la diminution du rapport entre les récepteurs $\beta 1$ - et $\beta 3$ -adrénégiques² et entre la SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA2a) et le phospholamban.³

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'effet de l'obésité morbide associée ou non au diabète de type 2 sur la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques.

Méthodes :

Des rats adultes (14 semaines) Zucker obèses (fa/fa, n=7), Zucker obèses diabétiques (fa/fa, n=10) ou témoins (fa/-, n=9) ont été investigués. In vitro, sur un modèle de muscles papillaires de ventricule gauche isolé,² nous avons évalué l'effet inotrope positif de la stimulation β -adrénergique induite par des doses progressivement croissantes d'isoprotérénol (10^{-8} à 10^{-4} M), un agoniste spécifique des récepteurs β -adrénergiques. Nous avons mesuré la vitesse maximale de raccourcissement à précharge nulle en isotonie et la force active

maximale en isométrie. L'effet lusitrope a été évalué en mesurant le rapport R1 entre les vitesses maximales de contraction et de relaxation en isotonie et le rapport R2 entre les forces maximales de contraction et de relaxation en isométrie. Les courbes concentrations-effets ont été analysées en calculant l'effet maximum (Eff_{max}) et la concentration produisant 50% de l'effet maximum (EC_{50}). D'autres muscles provenant de chaque groupe de rats ont été soumis, sur le même modèle, à une stimulation directe de l'adénylate cyclase par la forskoline ou à l'administration de dibutyryl AMPc, un agoniste de l'AMPc, le second messager intracellulaire de la signalisation des récepteurs β -adrénergiques.

L'expression des récepteurs $\beta 1$ -, $\beta 2$ - et $\beta 3$ -adrénergiques, de SERCA2a, du phospholamban et de la multidrug resistance associated protein 4 (MRP4) a été évaluée par Western Blotting sur des homogénats de ventricule gauche. Les concentrations de triglycérides, cholestérol, leptine, adiponectine et peptide C ont été mesurées dans le plasma. Les résultats sont présentés en moyenne de pourcentage de la valeur de base $\pm$ DS.

Résultats :

Les concentrations plasmatiques en lipides, leptine et peptide C étaient significativement plus élevées chez l'ensemble des muscles de cœurs de rats obèses alors que l'hyperglycémie était présente uniquement chez les rats obèses et diabétiques. En l'absence de stimulation, la contraction des muscles issus des rats obèses et obèses diabétiques n'était pas significativement altérée par rapport aux témoins, hormis une augmentation de la durée de contraction dans les deux groupes de rats obèses.

Après stimulation par isoprotérénol, la réponse inotrope positive était légèrement diminuée chez les rats obèses (Eff_{max} sur la force active $183 \pm 11\%$) et fortement réduite chez les rats obèses diabétiques ($137\% \pm 18\%$) par rapport aux rats témoins ($210\% \pm 17\%$, $P < 0.05$).

chaque fois). La réponse lusitrope n'était pas significativement modifiée chez les rats obèses avec ou sans diabète par rapport aux rats témoins (Eff_{max} sur R1 respectivement $64 \pm 10\%$ et $73 \pm 13\%$ vs. $74 \pm 8\%$, $P < 0.05$)

La stimulation directe de l'adénylate cyclase par la forskoline montrait la persistance d'une dysfonction plus importante chez les rats obèses diabétiques que les rats obèses alors que l'administration du dibutyryl AMPc n'induisait pas de différence significative entre les différents types de rats obèses.

L'expression myocardique des récepteurs $\beta 1$ - et $\beta 2$ -adrenergiques était diminuée de chez les rats obèses et obèses diabétiques par rapport aux témoins. En revanche l'expression du récepteur $\beta 3$ -adrénergique du phospholamban et de MRP4 était inchangée. L'expression de SERCA2a était réduite chez les obèses diabétiques mais pas chez les obèses non diabétiques.

Conclusion :

Cette étude nous a permis de montrer que la diminution de la réponse inotrope positive à la stimulation β -adrénergique reste modérée *in vitro* dans un modèle d'obésité chez le rat mais beaucoup plus marquée en cas de diabète associé à l'obésité. La diminution de l'expression des récepteurs $\beta 1$ -adrénergiques semble expliquer une partie de cette dysfonction. Ces modifications ne s'accompagnent pas de modifications de la réponse lusitrope et du rapport entre phospholamban et SERCA2a.

Modification of the β -Adrenoceptor Stimulation Pathway in Zucker Obese and Obese Diabetic Rat Myocardium

Cheng Jiang, MD^{1,2}; Aude Carillion, MD^{1,3}; Na Na, MD^{1,4}; Audrey De Jong, MD^{3,5}; Sarah Feldman, MS¹; Jean-Marc Lacorte, MD, PhD⁶; Dominique Bonnefont-Rousselot, PharmD, PhD^{1,7,8}; Bruno Riou, MD, PhD^{1,4}; Julien Amour, MD, PhD^{1,3}

Objectives: Although metabolic syndrome is associated with increased sympathetic activity that chronically stimulates β -adrenoceptors, the β -adrenoceptor signaling pathway has been poorly studied in this situation. We studied the β -adrenoceptor signaling pathway in Zucker lean, obese, and obese diabetic rats.

¹Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, UMR INSERM-UPMC 1166, IHU ICAN, Paris, France.

²Emergency Department, Zongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, The People's Republic of China.

³Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

⁴Department of Emergency Medicine and Surgery, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

⁵Department of Anesthesia and Critical Care B, Hôpital Saint-Eloi, CHU de Montpellier, Montpellier, France.

⁶Department of Endocrinologic and Oncologic Biochemistry, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

⁷Department of Metabolic Biochemistry, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

⁸Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Université Paris Descartes, Paris, France.

Dr. Jiang did the statistics. Drs. Jiang, Riou, and Amour conceived the study and wrote the article. Drs. Jiang, Carillion, Na, and Feldman were involved in the experiments. Drs. Lacorte and Bonnefont-Rousselot performed the biochemical analysis. All authors read, corrected, and approved the final article.

Supported solely by institutional and/or departmental sources.

Dr. Jiang was the recipient of a doctoral grant from the People's Republic of China (the State Scholarship Fund by China Scholarship Council, file No. 201206270014). Dr. Carillion received grant support from the Fondation pour la Recherche Médicale. Dr. Feldman received grant support from Bourse Pierre Viars recherche 2012 and received support for article research from the Association pour la recherche clinique et expérimentale en anesthésie-réanimation de la Pitié-Salpêtrière. Dr. Riou served as a board member for LFB (Les Ulis, France); provided expert testimony for ThermoFisher (Clichy, France) and Crossject (Paris, France); lectured for ThermoFisher (Clichy, France), Sanofi (Paris, France), and LFB (Les Ulis, France); and received support for travel from ThermoFisher (Clichy, France) (all unrelated to this research). The remaining authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: bruno.riou@pslaphp.fr

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

DOI: 10.1097/CCM.0000000000000999

Design: Experimental, prospective study.

Setting: University medical research laboratory.

Subjects: Adult male Zucker lean (control), obese, and obese diabetic rats.

Interventions: The effects of β -adrenoceptor stimulation were investigated in vitro in isolated left ventricular papillary muscles in control, obese, and obese diabetic rats. β_1 , β_2 , and β_3 -adrenoceptors and multidrug resistance-associated protein 4 were quantified by Western Blotting. Triglyceride, cholesterol, leptin, adiponectin, and C-peptide plasma concentrations were measured. Data are mean $\pm$ sd.

Measurements and Main Results: Hyperlipidemia, high leptin, and C-peptide concentrations were observed in obese and obese diabetic strains, whereas hyperglycemia occurred only in the diabetic strain. The positive inotropic effect of isoproterenol was slightly reduced in obese rats ($183\% \pm 11\%$ of baseline; $p = 0.003$; $n = 7$) and markedly reduced in obese diabetic rats ($137\% \pm 18\%$ of baseline; $p < 0.001$; $n = 10$) when compared with control rats ($210\% \pm 17\%$ of baseline; $n = 9$). β_1 -adrenoceptors were down-regulated in obese (-41% ; $p = 0.02$) and diabetic (-54% ; $p = 0.003$) when compared with control rats, whereas β_3 -adrenoceptors and multidrug resistance-associated protein expression remained unchanged. Direct stimulation of adenylate cyclase with forskolin or administration of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate suggests that subtle impairments also occurred beside the down-regulation of β_1 -adrenoceptor.

Conclusions: The positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation is slightly decreased in Zucker obese rats and was more markedly decreased in Zucker diabetic rats. These decreases are mainly related to β_1 -adrenoceptor down-regulation. (*Crit Care Med* 2015; XX:00–00)

Key Words: β -adrenoceptor; cardiac muscle; catecholamines; diabetes; heart; obesity

There is a worldwide increasing burden of diabetes, obesity, and related cardiovascular diseases. Metabolic syndrome (obesity, hypertension, and diabetes) is known to be associated with increased cardiovascular risk, leading to

higher morbidity and mortality. The key elements of metabolic syndrome are obesity, impaired glucose tolerance, insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, and increased sympathetic activity, all factors that may lead to cardiac dysfunction and ultimately congestive heart failure (1). Although obesity is associated with lower perioperative mortality (known as “obesity paradox”), patients with the metabolic syndrome are exposed to a higher mortality risk during the perioperative period (2). Such obesity paradox has also been reported in critically ill patients (3), including those with severe sepsis (4). However, several large clinical studies challenge the validity of the obesity paradox (5), and obese trauma patients are at risk of higher mortality from persistent hemorrhage (6).

In diabetic patients, diastolic dysfunction and a reduced response to β -adrenoceptor stimulation are observed, which may contribute to hemodynamic instability during critical care and the perioperative period (7). Although metabolic syndrome is associated with increased catecholamine levels and increased sympathetic activity that chronically stimulates β -adrenoceptors (8), the β -adrenoceptor signaling pathway has been poorly studied in this situation. Conflicting results have been obtained in obese swine and rabbit concerning cardiac β -adrenoceptor expression (9–11). The Zucker obese rat is considered as a reliable model of metabolic syndrome (12, 13). Furthermore, this model enables the separate study of obesity and obesity associated with type 2 diabetic status (14). We have previously observed alterations in β -adrenoceptor signaling pathway in type 1 diabetic (15) and senescent rats (16). Although an increase in sympathetic nervous system activation is an important mechanism for maintaining cardiac output, the positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation is altered in type 1 diabetic rats, in part, owing to the down-regulation of β_1 -adrenoceptor and the up-regulation of β_3 -adrenoceptor, which is the source of a negative inotropic effect. Active efflux transporters, namely the multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4), also act as an independent endogenous regulator of intracellular cyclic nucleotide levels (3',5'-cyclic adenosine monophosphate, cAMP) (17) and has been recently shown to participate in β -adrenoceptor dysfunction during aging (18).

The aim of this study was to compare the effects of β -adrenoceptor stimulation in Zucker lean (as the control group), Zucker obese (also known as “Zucker fatty rats”), and Zucker obese diabetic (also known as “Zucker diabetic fatty rats”) rats *in vitro* using isolated left ventricular papillary muscle. Our hypothesis was that metabolic syndrome is associated with some degree of β -adrenergic dysfunction, which is aggravated when associated with diabetes. We precisely assessed the effects of β -adrenergic stimulation on both contraction and relaxation and particularly focused on the following possible mechanisms involved, that is, down-regulation of β_1 and up-regulation of β_3 -adrenoceptors (15, 16) and up-regulation of MRP4 (17, 18).

MATERIALS AND METHODS

Experiments were conducted in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication No. 86-23, revised 1985) in an authorized laboratory under supervision of an

authorized researcher (J.A.; A-75-20-81). The project had been approved by the relevant Animal Care Committee through the French Ministry of Higher Education and Research (Comité Régional d'Éthique en Expérimentation Animale Paris-Comité 3, Paris, France). Animals were purchased from Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France) and cared in a labeled housing place (agreement number B-75-13-08) with food and water *ad libitum*. Animals were fed with normal rat chow containing 10% of calories from fat, 67% from carbohydrates, and 23% from proteins, 2.791 kcal/g (A04-10, SAFE, Augy, France). Three groups of 15-week-old male rats were studied: 1) Zucker lean (fa/–) rats; 2) Zucker obese (fa/fa) rats; and 3) Zucker obese (fa/fa) diabetic rats (12, 14). Because of the obvious morphological differences between groups, blinding was not possible.

Biological Measurements

Total cholesterol and triglyceride concentrations were determined by automated enzymatic methods (19, 20), and glucose concentration was assayed by hexokinase-mediated reaction (21) on a Modular P chemistry analyzer (Roche Diagnostics, Meylan, France). C-peptide was measured by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit provided by Mercodia France (Paris, France). Rat leptin and rat total adiponectin levels were quantified using ELISA kits provided by BioVendor (Eurobio, Courtabeuf, France) and Alpco (Eurobio), respectively, and measurements were performed according to the manufacturer's instructions.

Isolated Left Ventricle Papillary Muscle

Shortly after induction of general anesthesia with pentobarbital, the heart was removed in bloc, dissected, and weighed. The left ventricular papillary muscles were carefully excised and suspended vertically in a Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 1.1 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 2.5 mM CaCl_2 , and 4.5 mM glucose) maintained at 29°C with a thermostatic water circulator and bubbled with 95% oxygen and 5% CO_2 as previously described (22). The papillary muscles were stimulated at 12 pulses/min for 60-minute stabilization period at the initial muscle length (L_{max}) at the apex of length–active isometric tension curve. The electromagnetic lever system has been described previously (22). All analyses were made from digital records of force and length obtained with a computer. Conventional mechanical variables at L_{max} were calculated from three twitches. The first twitch was isotonic and loaded with the preload corresponding to L_{max} . The second twitch was rapidly clamped to zero load just after the electrical stimulus with a critical damping. The third twitch was fully isometric at L_{max} . We determined the maximum unloaded shortening velocity (V_{max}) using the zero-load technique, and we determined maximum shortening ($_{\text{max}}\text{Vc}$) and lengthening ($_{\text{max}}\text{Vr}$) velocities and time to peak shortening (TPS) of the twitch with preload only. In addition, the maximum isometric active force normalized for cross-sectional area (AF), the peaks of the positive ($+dF/dt$) and the negative ($-dF/dt$) force derivatives at L_{max} normalized for cross-sectional area,

and the time to peak force (TPF) from the isometric twitch were recorded. Because changes in the contraction phase induce coordinated changes in the relaxation phase, indices of contraction–relaxation coupling have been developed to study lusitropy (23). The R1 coefficient ($R1 = \frac{V_c}{V_r}$) studies the coupling between contraction and relaxation under low load and thus lusitropy, in a manner that is independent of inotropic changes. R1 tests sarcoplasmic reticulum (SR) calcium uptake function (23). The R2 coefficient ($+dF/dt/-dF/dt$) studies the coupling between contraction and relaxation under high load and thus lusitropy, in a manner that is less dependent on inotropic changes, and reflects the myofilament calcium sensitivity (23). The cross-sectional area was calculated from the length and weight of papillary muscle, assuming a density of 1.

Since the contractility is nearly maximum at a calcium concentration of 2.5 mM in the rat myocardium, the extracellular calcium concentration was decreased from 2.5 to 0.5 mM to assess the inotropic response to β -adrenoceptor stimulations, as previously described (23). A decrease in AF between 45% and 65% of baseline was required when calcium concentration was decreased. β -adrenoceptor stimulation was induced with increasing concentrations of isoproterenol (10^{-8} to 10^{-4} M), a nonselective β -adrenoceptor agonist, in the presence of phentolamine (10^{-6} M) to block α -adrenoceptors (13). The effect of isoproterenol was expressed by the percentage of baseline value of the maximal effect of isoproterenol on AF and $V_{\max}$ ($\text{Eff}_{\max}$) and the concentration of isoproterenol producing 50% of the maximal effect (C_{50}) (23).

We also studied the effects of stimulation of adenylate cyclase using forskolin (5×10^{-5} M) and the direct effect of dibutyryl cAMP (5×10^{-4} M) as previously described (24). All drugs were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (l'Isle d'Abeau-Chesnes, France) and added volumes never exceed 2% of the total.

Immunoblotting

The left ventricles were removed from anesthetized rats and frozen in liquid nitrogen. Total proteins were extracted in a Triton 1% buffer with anti-phosphatase/protease inhibitor (Sigma-Aldrich). All protein concentrations were determined using Bradford reagent (BioRad, Marne-La-Coquette, France). After denaturation in Laemmli buffer, a fixed amount of mixed proteins was loaded in each lane of a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (9–15%). Proteins are separated by electrophoresis in a migration buffer and then transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond, GE Healthcare, Vélizy, France). After saturation in milk or bovine serum albumin, each membrane was incubated overnight at 4°C with primary antibodies: anti-sarcoplasmic reticulum Calcium ATPase (SERCA-2a) (1:2,500, Abcam, Paris, France), antiphospholamban (1:1,000, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), anti- β_1 -adrenoceptor (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Le Perray en Yvelines, France), anti- β_2 -adrenoceptor (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology), anti- β_3 -adrenoceptor (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology), and anti-MRP4 (multidrug-resistance protein 4) (1:200, Abcam), respectively. The following day, membranes were washed with Tris-buffered saline Tween and incubated

with appropriate secondary antibody. Relative quantification of targeted protein was achieved by fluorescence recording on EthernDIGE reader with an ECL detection system (GE Healthcare, Vélizy, France). The SERCA 2a protein was detected at 110 kDa, phospholamban at 25 kDa, β_1 -adrenoceptor at 65 kDa, β_2 -adrenoceptor at 56–85 kDa, β_3 -adrenoceptor at 44 kDa, and MRP4 at 150 kDa. All Western blot experiments were quantified using Image J software (NIH, Bethesda, MD) and normalized versus glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (37 kDa), ensuring no variation in protein gel loading.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD. Comparison of means was performed using the repeated-measures analysis of variance and Newman-Keuls test. All *p* values were two-tailed, and a *p* value of less than 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using NCSS 2007 software (Statistical Solutions, Cork, Ireland). Concentration response curves were determined by fitting the data to the Hill sigmoid pharmacological model according to the following equation: $\text{Eff}_o = \text{Eff}_{\max} (1 + (C_{50}/C)^n)^{-1}$ in which Eff_o is the observed effect, $\text{Eff}_{\max}$ is the maximum effect, C_{50} is the concentration that results in 50% of $\text{Eff}_{\max}$, *C* is the studied concentration, and *n* is the Hill coefficient. Iterative nonlinear regression curve fitting was used to obtain the best fit (Matlab 1.2c software; The MathWorks, South Natick, MA). The main endpoint of our study was the $\text{Eff}_{\max}$ of the concentration-response curve of AF with isoproterenol. Assuming a value of $\text{Eff}_{\max}$ of $179\% \pm 15\%$ in the control group (15), an α risk of 0.05, and a β risk of 0.20, we determined that a sample size of at least *n* = 7 papillary muscle per group would enable us to detect a 15% change in $\text{Eff}_{\max}$ (PASS 11 software, Statistical Solutions).

RESULTS

Characterization of the Experimental Models

Obese rats had significantly higher body weight and heart weight than control rats, whereas obese diabetic rats did not significantly differ from control rats. The heart weight to body weight ratio was significantly decreased in obese rats mainly due to the greater increase in body weight than in heart weight (Table 1). Blood glucose levels were elevated (four times) only in obese diabetic rats. The C-peptide level, which reflects the insulin secretion, was markedly increased in obese rats while it was moderately increased in obese diabetic rats despite high blood glucose levels, suggesting β -cell dysfunction. Total cholesterol and triglycerides levels in both obese and obese diabetic rats were significantly higher than control rats. The leptin levels were significantly increased in both obese and obese diabetic rats. Adiponectin levels were not significantly modified in both obese and obese diabetic rats when compared with control rats (Table 1).

We measured the baseline characteristics of left ventricular papillary muscles in the different group of rats (Table 1). Although $V_{\max}$ was not significantly modified, a significant increase in AF was observed in obese and obese diabetic rats. Prolongation of the duration of contraction was observed in

TABLE 1. General Characteristics of Zucker Lean (Control), Obese, and Obese Diabetic Rats

Variables	Control	Obese	Obese Diabetic
General characteristics (no. of rats)	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 18
Body weight (g)	358 ± 25	498 ± 41 ^a	346 ± 23 ^b
Heart weight (mg)	921 ± 61	1,031 ± 77 ^a	888 ± 50 ^b
Heart weight/body weight (mg/g)	0.26 ± 0.01	0.21 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.01 ^b
Biological measurement (no. of rats)	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9
Blood glucose (mmol/L)	8.6 ± 1.6	8.6 ± 1.2	36.1 ± 4.9 ^{ab}
Total cholesterol (mmol/L)	2.58 ± 0.22	6.26 ± 0.71 ^a	4.64 ± 0.42 ^{ab}
Triglycerides (mmol/L)	1.39 ± 0.69	3.73 ± 1.38 ^a	3.00 ± 1.59 ^a
	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 9
Leptin (μg/L)	5.2 ± 1.9	61.0 ± 11.8 ^a	10.0 ± 1.4 ^{ab}
Adiponectin (mg/L)	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.5	4.3 ± 1.0
C-peptide (μmol/L)	1.29 ± 0.51	6.59 ± 2.25 ^a	1.85 ± 0.53 ^{ab}
Mechanical properties (no. of muscles)	<i>n</i> = 28	<i>n</i> = 25	<i>n</i> = 24
L_{max} (mm)	4.2 ± 1.5	3.9 ± 1.8	3.1 ± 1.2 ^{ab}
Cross-sectional area (mm ²)	0.55 ± 0.13	0.54 ± 0.20	0.43 ± 0.16 ^{ab}
Maximal unloading isotonic shortening velocity (L_{max} /s)	2.35 ± 0.38	2.43 ± 0.37	2.41 ± 0.50
Active force normalized per cross-sectional area during isometric contraction (mN/mm ²)	51 ± 8	59 ± 11 ^a	67 ± 13 ^{ab}
Time to peak shortening (ms)	164 ± 9	173 ± 12 ^a	196 ± 13 ^{ab}
Time to peak force (ms)	152 ± 11	160 ± 13 ^a	179 ± 16 ^{ab}
Ratio of maximum shortening to maximum shortening velocity to maximum lengthening velocity (i.e., contraction relaxation coupling under low load)	0.55 ± 0.10	0.57 ± 0.16	0.60 ± 0.11
Ratio of the peak of positive force derivative to the peak negative force derivative (i.e., contraction relaxation coupling under low load)	1.71 ± 0.23	1.87 ± 0.28	2.08 ± 0.40 ^a

L_{max} = initial muscle length.

^a*p* < 0.05 versus control group.

^b*p* < 0.05 between obese and obese diabetic rats.

Data are mean ± sd.

obese and obese diabetic rats as shown by the prolongation of TPS and TPE. No significant difference was observed in contraction-relaxation coupling under low load (R1, Table 1). By contrast, contraction-relaxation coupling under high load (R2) was significantly increased in obese diabetic rats (Table 1).

β-Adrenergic Stimulation

β-adrenoceptor stimulation induced a marked positive inotropic effect in control rats (Fig. 1 and Table 2). A slight decrease in this inotropic response was observed in obese rats and a marked decrease was observed in obese diabetic rats in low (V_{max}) and high (AF) loading conditions (Fig. 1 and Table 2).

In control rats, β-adrenoceptor stimulation induced a positive lusitropic effect under low load (R1) but not under high load (R2) (Table 2). Comparable effects were observed in control, obese, and obese diabetic rats, and there was no significant difference between strains (Table 2).

Figure 2 shows the comparison of the stimulation of β-adrenoceptors by isoproterenol, the stimulation of adenylate cyclase by forskolin, or direct stimulation by dibutyryl cAMP. The results obtained with forskolin were consistent with those obtained with isoproterenol, indicating a moderate impairment in the positive inotropic response in obese rats and a marked impairment in obese diabetic rats. By contrast, using dibutyryl cAMP, the degree of impairment in the positive inotropic response did not significantly differ between obese and obese diabetic rats (Fig. 2).

Immunoblotting

In agreement with the functional changes observed in the papillary muscle experiments, we found that the abundance of proteins for β₁-adrenoceptor were significantly reduced by 40% (*p* = 0.02) in obese rats and 54% (*p* = 0.003) in obese diabetic rats compared with levels measured in control rats

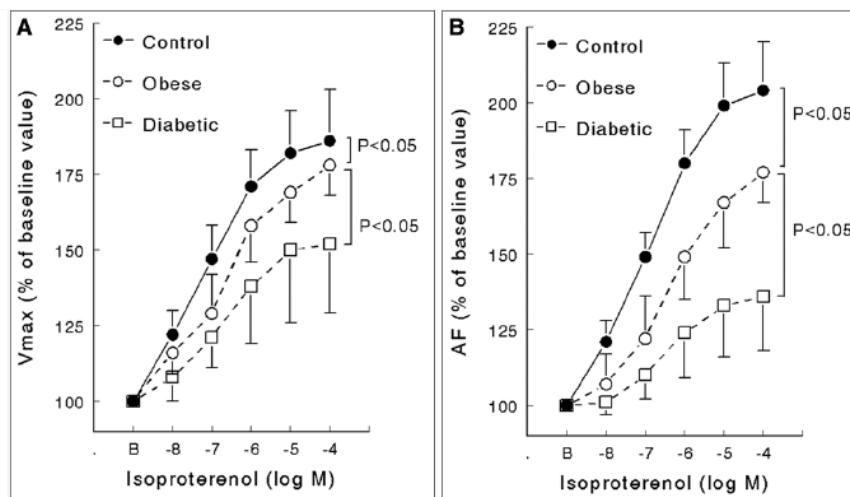


Figure 1. Inotropic response to β -adrenoceptor stimulation (isoproterenol) in control ($n=9$), obese ($n=7$), and obese diabetic ($n=10$) Zucker rats under low (A) and high (B) loads. Data are mean percentage of baseline value $\pm$ SD. The p values refer to the comparison of the maximum effect reported in Table 2. AF = isometric active force normalized by cross-sectional area, $V_{\max}$ = maximum shortening velocity.

(Fig. 3A). A similar decrease was observed in β_2 -adrenoceptor protein (Fig. 3B). By contrast, β_3 -adrenoceptors were not significantly modified in obese and obese diabetic rats ($p=0.97$) (Fig. 3C). Consequently, the β_1/β_3 and β_2/β_3 ratios were significantly decreased in obese rats (2.4 ± 1.3 , $p=0.01$ and 1.8 ± 1.3 ,

DISCUSSION

In the present study, we observed a slight decrease in the positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation in obese rats. In obese diabetic rats, the decrease was more pronounced but not as severe as that previously observed in type 1 diabetic

$p=0.03$, respectively) and in obese diabetic rats (2.0 ± 1.0 , $p=0.003$ and 1.3 ± 0.8 , $p=0.02$, respectively) when compared with control rats (4.2 ± 1.3 and 4.8 ± 4.0 , respectively). No significant changes were noted for phospholamban ($p=0.71$) (Fig. 3D) and MRP4 ($p=0.64$) (Fig. 3F). The abundance of SERCA 2a protein was significantly reduced by 40% ($p=0.03$) in obese rats but not significantly modified in obese diabetic rats ($p=0.67$) (Fig. 3E). But the SERCA 2a/phospholamban ratio was not significantly decreased ($p=0.61$) in obese rat (3.5 ± 1.8) and obese diabetic rats (3.5 ± 1.8) when compared with control rats (3.9 ± 2.5).

TABLE 2. Comparison of the Inotropic Response to β -Adrenoceptor Stimulation (Isoproterenol) in Zucker Lean (Control), Obese, and Obese Diabetic Rats

Variables	Control ($n=9$)	Obese ($n=7$)	Obese Diabetic ($n=10$)
Maximum unloaded shortening velocity			
Eff _{max} (% of baseline)	193 $\pm$ 18	182 $\pm$ 14	156 $\pm$ 26 ^{ab}
C ₅₀ (μ mol/L)	0.05 $\pm$ 0.05	0.27 $\pm$ 0.41	0.20 $\pm$ 0.09
Maximum isometric active force normalized by cross-sectional area			
Eff _{max} (% of baseline)	210 $\pm$ 17	183 $\pm$ 11 ^a	137 $\pm$ 18 ^{ab}
C ₅₀ (μ mol/L)	0.11 $\pm$ 0.11	0.53 $\pm$ 0.63 ^a	0.53 $\pm$ 0.32 ^a
Ratio of maximum shortening velocity to maximum lengthening velocity (i.e., contraction relaxation coupling under low load)			
Eff _{max} (% of baseline)	74 $\pm$ 8	73 $\pm$ 13	64 $\pm$ 10
C ₅₀ (μ mol/L)	0.15 $\pm$ 0.30	0.14 $\pm$ 0.26	0.39 $\pm$ 0.48
Ratio of the peak of positive force derivative to the peak of negative force derivative (i.e., contraction relaxation coupling under high load)			
Eff _{max} (% of baseline)	90 $\pm$ 17	100 $\pm$ 27	89 $\pm$ 25
C ₅₀ (μ mol/L)	ND	ND	ND

C₅₀ = concentration of isoproterenol producing 50% of Eff_{max}; Eff_{max} = maximum effect in percentage of baseline value, n = number of papillary muscles, ND = not determined.

^a $p < 0.05$ versus control.

^b $p < 0.05$ between obese and obese diabetic rats.

Data are mean $\pm$ SD.

C₅₀ was not determined when Eff_{max} was not significantly different from baseline values.

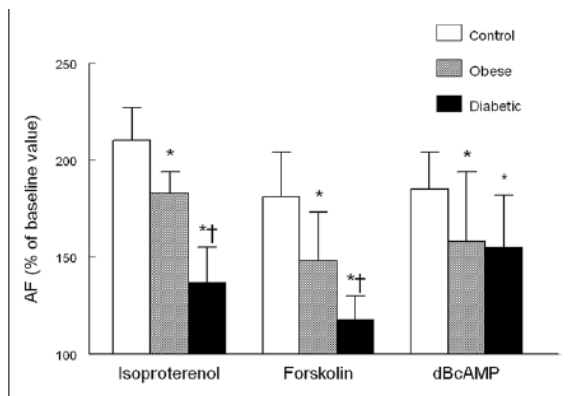


Figure 2. Comparison of the positive inotropic effects of isoproterenol (10^{-4} M), forskolin (5×10^{-5} M), and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dBcAMP; 5×10^{-4} M) in left ventricular papillary muscles from Zucker control, obese, and obese diabetic rats. Data are mean percentage of baseline value $\pm$ SD ($n = 9-10$ per group). * $p < 0.05$ versus control; † $p < 0.05$ versus obese. AF = isometric active force normalized by cross-sectional area.

rats (11) (Fig. 4). The main mechanism involved is probably the down-regulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors, which occurred without up-regulation of β_3 -adrenoceptor and without modification in MRP4.

In Zucker obese rats, a single mutation A to C at nucleotide 880 (called "fa") in the leptin receptor gene on chromosome 5 causes a Gln to Pro substitution at residue 269 of the leptin receptor, leading to nonfunctional receptor. Zucker obese diabetic strain is a substrain selectively inbred for hyperglycemia, which carries an autosomal recessive defect in pancreatic β -cell transcription that is inherited independently of the fa mutation (25). The gene involved in this diabetic profile has not been yet identified but requires the fa mutation to induce diabetes. The Zucker obese rat model is associated with moderate hypertension without significant cardiac dysfunction, whereas the Zucker obese diabetic model is associated with no hypertension but mild diastolic cardiac dysfunction. We observed important metabolic changes with a different profile in obese and obese diabetic rats. These two strains are known to be associated with hyperlipidemia due to high low-density lipoprotein and high-density lipoprotein cholesterol, increased lipoprotein lipase activity, hyperinsulinemia, and insulin resistance, whereas hyperglycemia is observed only in the obese diabetic strain (male only) (25).

We did not observe noticeable myocardium dysfunction in obese and obese diabetic rats. AF was significantly increased in both obese and obese diabetic rats and associated with a prolongation of the contraction phase (increase in TPS and TPF). This prolongation of contraction has been previously reported in type I diabetic rats (15) and has been related to a slower cross-bridge cycling rate, a slower Ca^{2+} release from the SR, and an alteration of I_{Kr} potassium current.

A slight decrease in the positive inotropic response of β -adrenergic stimulation was observed in obese rats and a marked decrease in obese diabetic rats (Fig. 1 and Table 2).

Conflicting results have been obtained in obese swine and obese rabbit (high-fat diet model) concerning cardiac β -adrenoceptor signaling pathway (9–11). Lima-Leopoldo et al (26) concluded that no change occurs in cardiac function after β -adrenoceptor stimulation in obese rats, but a significant decrease was observed only at the highest concentration of isoproterenol, and the magnitude of the effect was comparable to our results. Our results suggest that the impairment in β -adrenergic signaling pathway is less severe in obese than in obese diabetic rats and less severe in obese diabetic than that previously observed in type 1 diabetic rats (15).

The observed decreases in the responses to β -adrenoceptor stimulation in both obese and obese diabetic Zucker rats are consistently explained by the down-regulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors (Fig. 3A). In Zucker obese rats, two earlier studies reported a decrease in β -adrenoceptor density but without separating β -adrenoceptor subtypes (27, 28). Our results markedly differ from those previously observed in type 1 diabetic rats (streptozotocin-induced diabetes) in which β_1 -adrenoceptor down-regulation is associated with β_3 -adrenoceptor up-regulation (15). This important difference may explain why the decrease in β -adrenoceptor stimulation was moderate in obese and obese diabetic Zucker rats in comparison to type 1 diabetic rats (15). It is well established now that the stimulation of β_3 -adrenoceptors results in nitric oxide synthase-derived nitric oxide which is at the beginning of cyclic guanosine monophosphate production. Thereafter, cyclic guanosine monophosphate activates inhibitory G proteins and phosphodiesterases that increase the catabolism of the cAMP produced by the β_1 - and β_2 -adrenoceptors stimulation (29) and thus results in a negative inotropic effect (15, 30). The down-regulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in the heart of obese rats is consistent with the chronic sympathetic activation associated with the metabolic syndrome (31) and the catecholamine resistance of adipose tissue (32). In contrast with type 1 diabetes (15), the lack of β_3 -adrenoceptor overexpression observed in obese and obese diabetic rats did not impact the inotropic effect induced by β_1 - and β_2 -adrenoceptors stimulation. In this way, we still observed a decreased response with dibutyryl cAMP administration in both obese and obese diabetic rats.

However, down-regulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors is probably not the sole mechanism involved in the decreased response to β -adrenoceptor stimulation. When the papillary muscles were directly stimulated by dibutyryl cAMP, we still observed a decreased response in both obese and obese diabetic rats, which were not significantly different between these two strains (Fig. 2). This suggests that some abnormality occurs downstream the adenylate cyclase level. Further studies are required to elucidate that mechanism, although our study clearly eliminates the role of MRP4 (Fig. 3E), which has been recently demonstrated to be overexpressed during aging and to contribute to the decrease in β -adrenoceptor stimulation observed in old rats (19). In the present study, the lack in overexpression of MRP4 and the modest decrease in cardiac contractile responsiveness observed in obese rats (Fig. 1) suggest

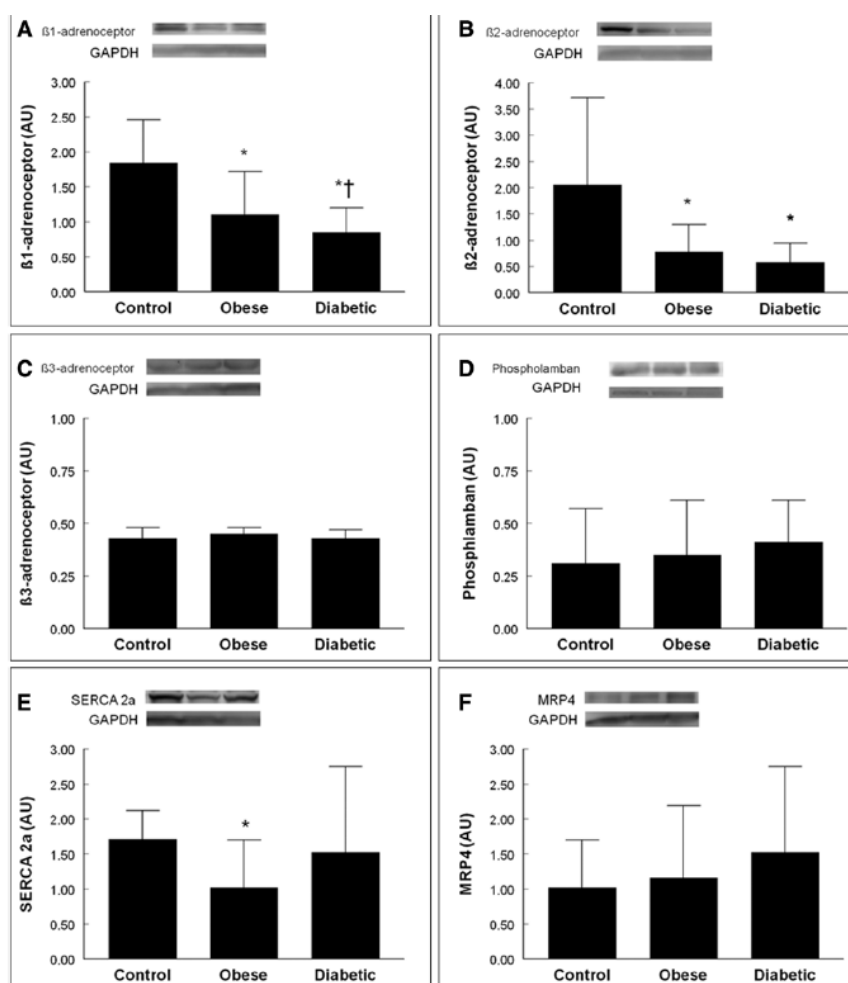


Figure 3. Representative Western blot and densitometric analysis reflecting β_1 -adrenoceptor (A), β_2 -adrenoceptor (B), β_3 -adrenoceptor (C), phospholamban (D), SERCA 2a (E), and multidrug resistance-associated protein (MRP4) (F) protein expression in Zucker control, obese, and obese diabetic rats ($n = 7$ in each group). Data are mean $\pm$ so. * $p < 0.05$ versus control; † $p < 0.05$ versus obese. GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, SERCA2a = sarcoplasmic reticulum Calcium ATPase.

that this mechanism is of limited importance. To support this conclusion, when the production of cAMP by adenylate cyclase was directly stimulated using forskolin (Fig. 2), we still observed a decreased response in both obese and obese diabetic rats, which was more pronounced in obese diabetic rats. These results contrast with those obtained in isolated membrane of heart cells in Zucker obese rats (25). This discrepancy may be explained by the use of isolated membrane preparation and not intact papillary muscle. Thus, it is likely that several other mechanisms participate in the impairment in the β -adrenergic signaling pathway, one situated at the level of adenylate cyclase and the other downstream, beside the down-regulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors.

Lusitropy plays an important role in the maintenance of cardiac output. The lusitropic effect of β -adrenoceptor stimulation

was not modified in either obese or obese diabetic rats. The decrease in SERCA 2a, which occurred without significant changes in the SERCA 2a/phospholamban ratio, did not impact the positive lusitropic effect of β -adrenergic stimulation. These results are consistent with those reported in type 1 diabetic rats in which the lusitropic effects of β -adrenoceptor stimulation were preserved, despite diabetic cardiomyopathy (33). Such discrepancies between inotropic and lusitropic effects have been reported in other situations (24) and are probably related to the fact that smaller concentrations of cAMP are required to induce a maximal lusitropic effect (34).

Catecholamines are widely used in critically ill patients but considerable intra- and inter-individual variability exists in the response. Most previous studies have tried to elucidate pharmacokinetic and pharmacodynamic differences in catecholamine response (35, 36), but very few have considered differences which may be linked to the baseline characteristics of the patient. Recently, Bauman et al (37) demonstrated that ethnic differences may be associated with significant difference in vasopressor requirements in patients with septic shock, but these authors did not look

at genetic or phenotypic characteristics that might explain these differences. This study reported that the required doses of vasopressors were higher in Afro-American patients compared with white patients. However, the proportion of diabetic patients was also markedly different (68% vs 32%), and it is likely that the proportion of obese patients may also have been different, although this was not stated in the article. Future clinical research on the catecholamine requirements in the ICU should focus not only on genetic and phenotypic profile and catecholamine pharmacokinetics (35, 36) but also on the pathophysiologic conditions that may modify adrenoceptor signaling pathway.

The following limitations should be considered when assessing the clinical relevance of our results. First, this study was performed in rat myocardium, which differs from human myocardium.

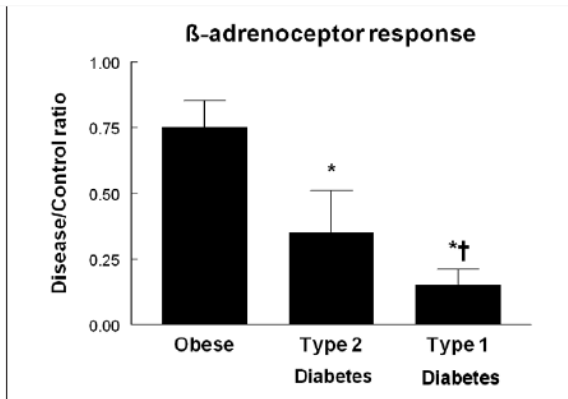


Figure 4. Comparison of the β -adrenergic stimulation (isoproterenol) response in Zucker obese, Zucker obese diabetic (type 2), and Wistar diabetic (type 1) rats. The ratio is the ratio of Eff_{max} in the disease strain to Eff_{max} in their respective control strain. Eff_{max} is the maximum effect on active isometric force of the concentration-effect curve of left ventricular papillary muscles exposed to increasing concentrations of isoproterenol. Data from type 1 diabetic rats (streptozotocin-induced diabetes) were obtained from Amour et al (15). Data are mean $\pm$ s.d. * $p < 0.05$ versus Zucker obese; $\dagger p < 0.05$ versus Zucker obese diabetic rats.

Second, no animal model of obesity and diabetes completely mimicks diseases observed in humans, and thus, it is important to acknowledge the limitations of the leptin/leptin receptor-based rodent model. For example, Zucker obese rats have only moderate hypertension, do not develop premature atherosclerosis, and their endothelium-dependent relaxation is not impaired, and Zucker obese diabetic rats do not develop sympathetic neuroaxonal dystrophy (25). Thus, further studies in humans are required to validate our results. Third, we did not study changes observed after treatment of diabetes or food restriction in obesity. For example, it has been shown that food restriction may improve β -adrenergic stimulation in obese rats (28).

In conclusion, we observed a slight decrease in the positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation in Zucker obese rats, which was more pronounced in Zucker obese diabetic rats and mainly related to the down-regulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. David Baker, DM, FRCA (Department of Anesthesiology and Critical Care, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris), for reviewing the article and Dr. Michèle Guerre-Millo (Research Director, UMR-S INSERM 1166, IHU ICAN, Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Paris, France) for scientific advice.

REFERENCES

- Gallagher EJ, LeRoith D, Karnieli E: The metabolic syndrome—From insulin resistance to obesity and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008; 37:559–579, vii
- Glance LG, Wissler R, Mukamel DB, et al: Perioperative outcomes among patients with the modified metabolic syndrome who are undergoing noncardiac surgery. *Anesthesiology* 2010; 113:859–872
- Pickkers P, de Keizer N, Dusseljee J, et al: Body mass index is associated with hospital mortality in critically ill patients: An observational cohort study. *Crit Care Med* 2013; 41:1878–1883

- Prescott HC, Chang VW, O'Brien JM Jr, et al: Obesity and 1-year outcomes in older Americans with severe sepsis. *Crit Care Med* 2014; 42:1766–1774
- Arabi YM, Dara SI, Tamim HM, et al; Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock (CATSS) Database Research Group: Clinical characteristics, sepsis interventions and outcomes in the obese patients with septic shock: An international multicenter cohort study. *Crit Care* 2013; 17:R72
- Nelson J, Billeter AT, Seifert B, et al: Obese trauma patients are at increased risk of early hypovolemic shock: A retrospective cohort analysis of 1,084 severely injured patients. *Crit Care* 2012; 16:R77
- Amour J, Kersten JR: Diabetic cardiomyopathy and anesthesia: Bench to bedside. *Anesthesiology* 2008; 108:524–530
- Straznicki NE, Grima MT, Sari CI, et al: Neuroadrenergic dysfunction along the diabetes continuum: A comparative study in obese metabolic syndrome subjects. *Diabetes* 2012; 61:2506–2516
- Dincer UD: Cardiac β -adrenoceptor expression is markedly depressed in Ossabaw swine model of cardiometabolic risk. *Int J Gen Med* 2011; 4:493–499
- Carroll JF, Jones AE, Hester RL, et al: Reduced cardiac contractile responsiveness to isoproterenol in obese rabbits. *Hypertension* 1997; 30:1376–1381
- Carroll JF, Kyser CK, Martin MM: β -adrenoceptor density and adenylyl cyclase activity in obese rabbit heart. *Int J Obesity* 2002; 26:627–632
- Zucker LM, Zucker TF: Fatty a new mutation in the rat. *J Heredity* 1961; 52:275–278
- Kanasaki K, Koya D: Biology of obesity: Lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:197636
- Friedman JE, de Venté JE, Peterson RG, et al: Altered expression of muscle glucose transporter GLUT-4 in diabetic fatty Zucker rats (ZDF/Drt-fa). *Am J Physiol* 1991; 261:E782–E788
- Amour J, Loyer X, Le Guen M, et al: Altered contractile response due to increased beta3-adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: The role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology* 2007; 107:452–460
- Birenbaum A, Tesse A, Loyer X, et al: Involvement of beta 3-adrenoceptor in altered beta-adrenergic response in senescent heart: Role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology* 2008; 109:1045–1053
- Sassi Y, Abi-Gerges A, Fauconnier J, et al: Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J* 2012; 26:1009–1017
- Carillon A, Feldman S, Jiang C, et al: Overexpression of cyclic adenosine monophosphate effluent protein MRP4 induces an altered response to β -adrenergic stimulation in the senescent rat heart. *Anesthesiology* 2015; 122:334–342
- Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20:470–475
- Fossati P, Prencipe L: Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982; 28:2077–2080
- Yee HY: Automated hexokinase procedure for assaying glucose in urine, serum, or plasma. *Clin Chem* 1972; 18:1416–1419
- Riou B, Lecarpentier Y, Vias P: Inotropic effect of ketamine on rat cardiac papillary muscle. *Anesthesiology* 1989; 71:116–125
- Hanouz JL, Riou B, Massias L, et al: Interaction of halothane with alpha- and beta-adrenoceptor stimulations in rat myocardium. *Anesthesiology* 1997; 86:147–159
- David JS, Vivien B, Lecarpentier Y, et al: Extracellular calcium modulates the effects of protamine on rat myocardium. *Anesth Analg* 2001; 92:817–823
- Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ: Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: Relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2014; 10:131–145
- Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, et al: Myocardial dysfunction and abnormalities in intracellular calcium handling in obese rats. *Arq Bras Cardiol* 2011; 97:232–240
- Strassheim D, Houslay MD, Milligan G: Regulation of cardiac adenylyl cyclase activity in rodent models of obesity. *Biochem J* 1992; 283(Part 1):203–208

28. Chatelain P, Robberecht P, De Neef P, et al: Impairment of hormone-stimulated cardiac adenylyate cyclase activity in the genetically obese (fa/fa) Zucker rat. *Plugers Arch* 1981; 390:10–16
29. Khamssi M, Brodde OE: The role of cardiac beta1- and beta2-adrenoceptor stimulation in heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16(Suppl 5):S133–S137
30. Gauthier C, Leblais V, Moniotte S, et al: The negative inotropic action of catecholamines: Role of beta3-adrenoceptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78:681–690
31. Canale MP, Manca di Villahermosa S, Martino G, et al: Obesity-related metabolic syndrome: Mechanisms of sympathetic overactivity. *Int J Endocrinol* 2013; 2013:865965
32. Reynisdottir S, Wahrenberg H, Carlström K, et al: Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of beta 2-adrenoceptors. *Diabetologia* 1994; 37:428–435
33. Amour J, Loyer X, Michelet P, et al: Preservation of the positive lusitropic effect of beta-adrenoceptors stimulation in diabetic cardiomyopathy. *Anesth Analg* 2008; 107:1130–1138
34. Coudray N, Beregi JP, Lecarpentier Y, et al: Effects of isoproterenol on myocardial relaxation rate: Influence of the level of load. *Am J Physiol* 1993; 265:H1645–H1653
35. Abboud I, Lerolle N, Urien S, et al: Pharmacokinetics of epinephrine in patients with septic shock: Modelization and interaction with endogenous neurohormonal status. *Crit Care* 2009; 13:R120
36. Beloeil H, Mazoit JX, Benhamou D, et al: Norepinephrine kinetics and dynamics in septic shock and trauma patients. *Br J Anaesth* 2005; 95:782–788
37. Bauman ZM, Killu KF, Rech MA, et al: Racial differences in vasopressor requirements for septic shock. *Shock* 2014; 41:188–192

2.3 : Etude n° 3 : Etude de l'impact du diabète et de l'atorvastatine sur la stimulation β -adrénergique

Atorvastatin Reduces β -Adrenergic Dysfunction in Rats with Diabetic Cardiomyopathy.

Carillion A; Feldman S, Na N; Biais M; Carpentier W. Birenbaum A; Cagnard N; Loyer X; Bonnefont-Rousselot D; Hatem S; Riou B; Amour J.

Submitted

Buts :

L'altération de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques observée chez les diabétiques participe à l'instabilité hémodynamique observée en péri-opératoire ou en situation de stress, en partie par le déséquilibre de la balance entre signalisation β_1 - et β_3 -adrénergique.

Les inhibiteurs de l'HMG CoA réductase, ou statines, ont pris une place primordiale dans l'arsenal thérapeutique des pathologies cardio-vasculaires. Elles ont des effets bénéfiques sur la mortalité et la morbidité des patients diabétiques, attribués à des effets « pléiotropiques ».¹¹²

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de l'atorvastatine sur la dysfonction de la réponse β -adrénergique chez les diabétiques et de déterminer les mécanismes potentiellement impliqués

Méthodes :

Pour répondre à cet objectif nous avons utilisés des rats sains ou diabétiques (6 semaines après une injection de streptozotocine) prétraités par atorvastatine (80mg.kg^{-1}) ou placebo tous les jours pendant 15 jours à.

L'effet de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques a été évalué 1/ *in vivo* par échocardiographie en mesurant la fraction de raccourcissement (FRVG) et la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) avant et pendant traitement par isoprotérénol ($10\mu\text{g.kg.min}^{-1}$) ; 2/ *ex vivo*, sur *muscle papillaire* de ventricule gauche en mesurant la force active et la vitesse maximale de contraction lors de la stimulation β -adrénergique par des doses progressivement croissantes d'isoprotérénol (10^{-8} à 10^{-4} M).

Sur homogénats de ventricules gauches des rats de chaque groupe, l'expression de 22 523 gènes a été évaluée par une analyse transcriptomique sur une puce Illumina® et un traitement statistique des données de micro-array pour identifier les gènes significativement modulés dans le diabète et lors du traitement par atorvastatine. La variation d'expression des protéines correspondantes a été confirmée par Western Blotting sur des homogénats de ventricule gauche. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur de base.

Résultats :

Le traitement par atorvastatine a restauré l'effet inotrope positif de la stimulation β -adrénergique à la fois *in vivo* et *ex vivo*. L'atorvastatine n'a pas corrigé la dysfonction diastolique chez les rats diabétiques. Le traitement par atorvastatine a modifié l'expression de 9 gènes impliqués dans la voie de signalisation β -adrénergique. L'atorvastatine a corrigé l'expression du récepteur β_1 -adrénergique, le ratio récepteur β_1/β_3 -adrénergique et l'expression de MRP4 (multidrug resistance protéine 4). L'inhibition de la nitrite oxyde synthase (NOS) a aboli l'effet bénéfique de l'atorvastatine sur la réponse β -adrénergique.

Conclusion:

Cette étude nous a permis de montrer que l'atorvastatine restaure l'effet inotrope positif de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques chez les diabétiques.

Cet effet passe par la modification de l'expression de plusieurs protéines de la voie de signalisation β -adrénergique et en particulier par l'action de l'oxyde nitrique.

Atorvastatin Reduces β -Adrenergic Dysfunction in Rats with Diabetic Cardiomyopathy

Aude Carillion MD^{1,2,5}; Sarah Feldman, MsSci¹; Na Na, MD^{1,3} Matthieu Biais, MD, PhD⁶;
Wassila Carpentier, PhD,¹ Aurélie Birenbaum, MD²; Nicolas Cagnard, MsSci⁸; Xavier Loyer,
PhD⁹; Dominique Bonnefont-Rousselot, PharmD, PhD^{1,4,7}; Stéphane Hatem, MD, PhD¹;
Bruno Riou, MD, PhD^{1,3}; Julien Amour, MD, PhD^{1,2}

From ¹Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, UMR INSERM 1166 and Post-Genomic Platform, IHU ICAN, Paris, France; ²Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, ³Department of Emergency Medicine and Surgery, ⁴Department of Metabolic Biochemistry, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁵Université de Reims Champagne-Ardenne, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Robert Debré Hospital, Reims; ⁶Université Bordeaux Segalen, Department of Anesthesiology and Critical Care, Hôpital Pellegrin, Bordeaux; ⁷Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, ⁸Post-Genomic Platform, and ⁹UMRS INSERM U970, Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

Address Correspondence to: Dr. Aude Carillion, Département d'Anesthésie-Réanimation, Institut de Cardiologie, CHU Pitié-Salpêtrière, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: (33) 1 84 82 73 87; Fax: (33) 1 42 16 56 39; E-mail: aude.carillion@gmail.com

Support: Support was provided solely from institutional and/or departmental sources. Dr. Aude Carillion was the recipient of a research grant (FRM grant number DEA200961244) from the Fondation pour la Recherche Médicale (Paris, France).

Acknowledgement: We thank Dr. David Baker DM, FRCA, (Department of Anesthesiology and Critical Care, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris) for reviewing the manuscript.

Running head: Statin reverses β -adrenoceptor dysfunction in diabetes

Word counts: Abstract: 264; Introduction: 456 words; Discussion: 1556 words.

Competing interests: The authors have disclosed that they do not have any potential conflict of interest.

Contribution: Dr. Carillion, Pr. Riou, and Pr. Amour conceived the study and wrote the manuscript. Dr. Carillion, Feldman, Na, Birenbaum, and Biais were involved in the experiments. Dr. Carillion did the statistics. Pr. Bonnefont-Rousselot performed the biochemical analysis, Dr. Carpentier

and Dr. Cagnard did the genomic analysis, Dr. Loyer did the β -adrenoceptor immunoblotting analysis. All authors read, corrected, and approved the final manuscript.

Abstract (word count: 264)

Objective: In the diabetic heart the positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation is altered partly by down-regulation of the β 1-adrenoceptor, reducing its positive inotropic effect and up-regulation of the β 3-adrenoceptor, increasing its negative inotropic effect. Statins have clinical benefits on morbidity and mortality in diabetic patients which are attributed to “pleiotropic” effects. The objective of our study was to investigate the role of statin treatment on β -adrenergic dysfunction in diabetic rat cardiomyocytes and the possible associated mechanisms.

Design: Experimental, prospective study

Setting: University medical research laboratory

Subjects: Healthy and streptozotocin-induced diabetic adult Wistar rats.

Interventions: β -adrenergic responses were investigated *in vivo* (echocardiography) and *ex vivo* (left ventricular papillary muscles) in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats, who were pre-treated or not by oral atorvastatin over 15 days (50 mg.kg⁻¹.day⁻¹). Micro-array analysis and immunoblotting were performed in left ventricular homogenates. Data are presented as mean percentage of baseline $\pm$ SD.

Measurements and Main results: Atorvastatin restored the impaired positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation in diabetic hearts compared with healthy hearts both *in vivo* and *ex vivo* but did not suppress the diastolic dysfunction of diabetes. Atorvastatin changed the RNA expression of 9 genes in the β -adrenergic pathway and corrected the protein expression of β 1-adrenoceptor and β 1/ β 3-adrenoceptor ratio, and multidrug resistance protein 4 (MRP4). Nitric oxide (NO) synthase inhibition

abolished the beneficial effects of atorvastatin on the β -adrenoceptor response.

Conclusions: Atorvastatin restored the positive inotropic effect of the β -adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy. This effect is mediated by multiple modifications in expression of proteins in the β -adrenergic signaling pathway, particularly through the NO-synthase pathway.

Key words: Diabetes; statins; β -adrenoceptor; nitric oxide synthase; cardiac muscle; heart

INTRODUCTION

Several years after the onset of diabetes mellitus and even in well-controlled expressions of the disease, most patients develop diabetic cardiomyopathy (1-4), which may lead to diastolic heart failure (5). Diabetes worsens perioperative prognosis partly due to more frequent cardiovascular complications (2,3). In intensive care units, diabetic patients represent usually 30% of the population and they are known to be at increased risk of cardiac overload and mortality (4). The β -adrenergic pathway plays a crucial role for maintaining cardiac output and the response to β -adrenergic stimulation is known to be altered in the diabetic cardiomyopathy (5,6). The prime mechanisms of diabetic cardiomyopathy appear to be hyperglycemia and advanced generation of glycation end-products, leading to endothelial dysfunction and fibrosis and increase in inflammation and oxidative stress (7,8). Several alterations of cardiomyocytes also contribute to cardiac dysfunction as changes in contractile proteins and impair excitation-contraction coupling by increase in the phospholamban/sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase ratio (9). In addition, the positive inotropic effect of β_1 -adrenoceptor stimulation is reduced by a down-regulation in β_1 -adrenoceptor expression while the negative inotropic effect of β_3 -adrenoceptor stimulation is enhanced by β_3 -adrenoceptor overexpression. β_3 -adrenoceptors couple with G_i inhibitory G-proteins and neuronal nitric oxide (NO) synthase (NOS1), activate the phospho-inositide 3-Kinase (PI3K)/Akt pathway in the cardiomyocyte which enhances NO and cyclic guanosine monophosphate production via Rho and Ras protein activation (9,10).

Statins are competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A (HMG CoA) reductase, initially developed as cholesterol-

lowering drugs and a consistent reduction of heart failure and major cardiovascular adverse events has been described in large scale studies (11-14). In the perioperative period, statin therapy has been reported to reduce morbidity and mortality, increasingly with high-dose of statins (15,16) whatever cholesterol blood level (13,15,17), suggesting a beneficial pleiotropic cardiovascular effect (12). In addition, pleiotropic effects of statins decrease mortality in critically ill diabetic patients (4,18, 19). In this context, statins may have a protective effect against cardiac overload (4). Statins have anti-inflammatory properties (12,13), reduce ischemia/reperfusion injury (20), oxidative stress and fibrosis (21), all increased in diabetes mellitus. Statins can prevent the development of cardiovascular remodeling and limit both the progression of glucose intolerance and the elevation of pro-inflammatory/fibrogenic cytokines in diabetic cardiomyopathy (22). Many cardiac effects of statins are mediated by the preservation of the endothelial cell function but cardiomyocytes also benefit from statin treatment, through the activation of the PI3K/Akt pathway and increase in NO production from endothelial cell via endothelial NOS3 (23). In diabetic rats, the decreased expression of NOS3 is normalized by statin treatment (22). In contrast impact of statin treatment on altered β -adrenergic pathway signaling has not, as yet, been investigated.

The aim of this study was to test the hypothesis that atorvastatin restores at least partially the β -adrenergic signaling pathway in diabetic cardiomyopathy.

METHODS

Animals

All animals were cared according to the *European Union Guidelines for the care and use of laboratory animals* and under supervision of authorized researchers in an approved laboratory (agreement number B 75-13-08). The project had been approved by the relevant Animal Care Committee through the French Ministry of Higher Education and Research (Comité Régional d'Ethique en Expérimentation Animale Paris-Comité 3, Paris, France). Food and water were given *ad libitum*. Animals were fed with normal rat chow containing 10 % of calories from fat, 67 % from carbohydrates, and 23 % from proteins, 2.791

Kcal/g (A04-10, SAFE, Augy, France). Six-week-old male Wistar rats (Janvier, Le Genest-St Isle, France) were divided into a healthy group and a diabetic group. Diabetes mellitus was induced by streptozotocin (65 mg.kg⁻¹, single intravenous bolus; Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) as previously described (6). After 6 weeks, rats from healthy or diabetic groups were assigned to orally receive over 15 days either vehicle or atorvastatin (50 mg.kg⁻¹.day⁻¹ per os, Pfizer, Paris, France) (24). Diabetes mellitus was assessed by major glycosuria from 8 days after streptozotocin injection. Glucose and bicarbonate levels were determined on a blood sample withdrawn immediately after heart removing to ensure diabetes (*i.e.* blood glucose level > 35 mM, *i.e.* 631 mg.dL⁻¹) without acidosis. Mild diabetic rats with blood glucose level lower than 35 mM despite streptozotocin injection were excluded. Total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides blood levels were also measured from the same samples by automated enzymatic methods.

Echocardiography

Transthoracic stress echocardiography was performed with a 8-14MHz linear probe and a Vivid™ 7 cardiovascular ultrasound system (General Electric, Aulnay-sous-Bois, France) on rats maintained under light general anesthesia with isoflurane (1-2 %). Left ventricular systolic and diastolic diameters, left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular shortening fraction (LVSF) were determined on parasternal long- and short-axis views. Cardiac filling pressures and diastolic function were evaluated by Doppler imaging on an apical window. Left ventricular trans-mitral filling flow was described by early filling velocity (the E wave), and atrial filling velocity (the A wave). High cardiac frequency in small animals often results in E and A wave fusion. The end-diastolic left ventricle pressure was estimated by the E/Ea ratio between the E wave and the systolic velocity of lateral mitral annulus Ea, measured by Doppler tissue imaging. The diastolic function was assessed by the trans-mitral filling flow with the isovolumetric relaxation time (IRVT) and the deceleration time of the E wave. All measurements were performed in duplicate and after stabilization of the heart rate, before and 6 min after β -adrenergic stimulation by isoproterenol (10 μ g.kg⁻¹.min⁻¹, continuously intravenous infused).

Isolated Left Ventricle Papillary Muscle

Shortly after induction of general anesthesia with pentobarbital, the heart was removed *in bloc*, dissected and weighed. The left ventricular papillary muscles were carefully excised and suspended vertically in a Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution at 29°C and bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ as previously described (6). The papillary muscles were stimulated at 12 Hz for 60-min stabilization period at the initial muscle length at the apex of length–active isometric tension curve (L_{max}). The extracellular concentration of Ca²⁺ was decreased for all measurements from 2.5 mM to 0.5 mM because rat myocardial contractility is nearly maximal at 2.5 mM. A sequence of three twitches was applied to each muscle to determine the value of usual parameters: the maximum unloaded shortening velocity (V_{max}) and the maximum isometric active force (AF), the time to peak force (TPF), and the time to peak shortening (TPS) (6). The active force AF was normalized for cross-sectional area (calculated from the length and weight of papillary muscle, assuming a density of 1). β -adrenoceptor stimulation was induced with cumulative concentrations of isoproterenol (10⁻⁸ to 10⁻⁴ M), a non-selective β -adrenoceptor agonist, in the presence of phentolamine (10⁻⁶ M). The effect of isoproterenol was expressed by the percentage of baseline value of the maximal effect of isoproterenol on AF and V_{max} ($_{max}Eff$) and the concentration of isoproterenol producing 50% of the maximal effect (C_{50}) (6).

Microarray Analysis of Whole-Genome Gene Expression

Left ventricles were harvested immediately after left ventricular papillary muscles had been excised. Three biological replicates were used for the gene expression profiling, *i.e.* samples from three animals of each group, healthy or diabetic rats and treated or not by atorvastatin. Total RNA from frozen left ventricle samples was extracted with an RNeasy extraction kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) following the protocol and quantified using NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). RNA purity and integrity were assessed on a RNA NanoChip (Bioanalyzer Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Only the samples with RNA integrity number (RIN) > 8 were used for gene expression profiling. RNA was prepared with

the Illumina® TotalPrep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France) with reverse transcription and labeling of newly transcribed RNA with biotin-16-UTP. For each sample the labeled cRNA was hybridized according to the protocol on a microarray using Illumina Rat Ref – 12 expression Beadchip. RNA molecules matched with the corresponding probe between the 22 523 probes lining on the chip. After washing, the chip was exposed to a laser and, using the Illumina IScan (Illumina, Inc, San Diego, CA), we quantified the intensity of the emitted signal in each location of the chip, measuring the relative abundance of the RNA targeted by the local probe.

Data were normalized with the quantile function of BeadStudio Software (Illumina, Inc). The quality of the signal was assessed by the signal to noise ratio and the number of normalized signals that differed from the background. First, biological replicates were compared two by two, with a required correlation coefficient > 0.98 to detect procedure abnormalities. Second, we conducted an unsupervised analysis with hierarchical clustering using the Spearman correlation similarity measure and ward linkage algorithm to confirm the correct identity of samples by expression similarities. The expression of the 22 523 targeted genes was then analyzed in the four groups. A difference of 1.5 fold in gene expression and a *p* value <0.05 between two groups was considered as significant. Data were subsequently subjected to Ingenuity pathway analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc., Redwood City, CA) to model relationships among genes and proteins and to construct putative pathways and relevant biological processes.

Protein Expression by Immunoblotting

The left ventricles were removed from anesthetized rats and frozen in liquid nitrogen. Total proteins were extracted in a Triton 1% buffer with anti-protease inhibitor (Sigma–Aldrich). All protein concentrations were determined using the Bradford reagent (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). After denaturation in Laemmli buffer, a fixed amount of mixed proteins was loaded in each lane of a 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Proteins were separated by electrophoresis in a migration buffer then transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond, GE Healthcare, Vélizy, France). After saturation in milk, each membrane was incubated overnight at 4°C with primary antibodies:

respectively anti-β₁-adrenoceptor (1:1000, Affinity Bioreagents, Saint-Quentin en Yvelines, France), anti-β₃-adrenoceptor (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Le Perray en Yvelines, France), and anti-multidrug resistance protein 4 (MRP4) (1:200, Abcam, Paris, France). The day after, membranes were washed with Tris-buffer saline Tween and incubated with appropriate secondary antibody. Relative quantification of targeted protein was achieved by fluorescence recording on EthanDIGE reader with an ECL® detection system (GE Healthcare, Vélizy, France). The β₁-adrenoceptor proteins were detected at 55 kDa, β₃-adrenoceptor at 44 kDa, and MRP4 at 150 kDa. All Western blot experiments were quantified using Image J software (NIH, Bethesda, MA) and normalized versus GAPDH (37kDa) or total proteins using Ponceau S solution to ensure no variation in protein gel loading.

NO synthase blockade

An additional group of diabetic rats (treated with atorvastatin) was exposed to N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME, 10⁻⁵ M, Sigma-Aldrich), an unspecific NO synthase inhibitor, as previously described (6). β-adrenoceptor stimulation was induced with cumulative concentrations of isoproterenol in isolated left ventricular muscle as described above.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD. Means were compared using Student's *t* test or one-way analysis of variance with post-hoc test Newman-Keuls. We used absolute values to compare baseline characteristics and delta percent changes from baseline to compare the pharmacological effects since SD of delta percent changes represents the variation of the pharmacological effect measured whereas the SD of absolute values mainly reflects inter-individual variation. Moreover, some variables were expected to significantly differ at baseline between groups. All *p* values were two-tailed and a *p*<0.05 was considered as significant. Statistical analysis was performed using NCSS 7.0 software (Statistical solutions Ltd., Cork, Ireland).

Results

We studied 48 healthy and 56 diabetic rats. Despite streptozotocin injection, 3 rats were excluded for insufficient blood glucose level (<35 mM), 2 in the statin diabetic group and 1 in the untreated diabetic group. Physical characteristics, blood chemistry results, baseline echocardiography and papillary muscle variables are shown in Table 1. All diabetic rats had significant lower body weight and heart weight than healthy rats. The heart weight/body weight ratio was slightly increased in diabetic untreated rats but corrected by atorvastatin. Atorvastatin had no significant effect on body or heart weight in healthy rats. Blood glucose level increased more than 4-fold in diabetic rats compared to healthy rats. Total and LDL cholesterol blood level were slightly increased in diabetic rats compared to healthy rats. Atorvastatin did not significantly modify elevated blood glucose or cholesterol level in statin diabetic rats. Serum bicarbonate levels were not significantly different between groups, indicating that no ketoacidosis occurred.

During basal echocardiography, the heart rate was slower in the diabetic rats compared with healthy rats. The LVEF and the LVSF were slightly reduced in diabetic statin rats compared to other groups but remained in normal range. The IVRT was increased in diabetic rats compared to control rats and partially restored by atorvastatin in diabetic group. The E/E_a ratio was slightly increased in untreated diabetic group compared with healthy group (Table 1).

In isolated papillary muscles, during basal studies AF was preserved in diabetic rats whereas $V_{\max}$ was reduced in diabetic rats and not corrected by atorvastatin. Both TPF and TPS were increased in diabetic rats and not corrected by atorvastatin (Table 1).

Effect of Atorvastatin on *in Vivo* Response to β -Adrenergic Stimulation

Echocardiographic parameters of *in vivo* responses to isoproterenol infusion are shown in Table 2. The heart rate was moderately increased in all groups after isoproterenol. The inotropic response was reduced in diabetic rats compared to healthy rats with reduced increase in LVEF and LVSF. Atorvastatin improved this inotropic response in diabetic rats, returning to that of healthy

rats. Atorvastatin had no effect on response to β -adrenergic stimulation in healthy rats.

Effect of Atorvastatin on *ex Vivo* Response to β -Adrenergic Stimulation

The main characteristics of the inotropic response of left ventricle papillary muscle of healthy and diabetic rats statin pretreated or not are summarized in Figure 1 and Table 3. $\max$ Eff on both AF and $V_{\max}$ was reduced in diabetic untreated rats compared with healthy rats and partially corrected by atorvastatin. C_{50} on both AF and $V_{\max}$ was reduced in diabetic rats, treated or non-treated with atorvastatin. Atorvastatin had no effect on healthy rats but increased $\max$ Eff on both AF and $V_{\max}$ in diabetic rats (Table 3).

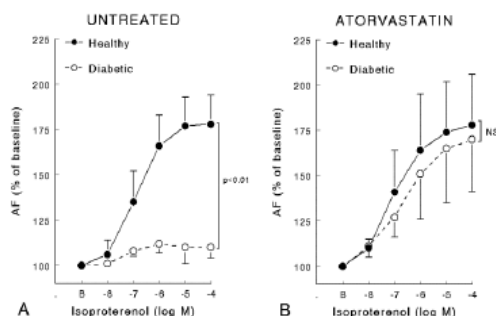


Figure 1. Active force (% of baseline value) variation of left ventricle papillary muscle of healthy and diabetic rats (Panel A) or pretreated (Panel B) with atorvastatin ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) during 15 days (8 rats per group) on *in vitro* inotropic response to isoproterenol. Data are expressed as mean $\pm$ SD. P values refers to comparison between healthy and diabetic rats. NS= non-significant.

Transcriptomic Effect of Atorvastatin

The main findings of the microarray analysis on the transcriptome of left ventricles of healthy and diabetic rats with and without statin pretreatment are summarized in Figure 2. The RNA expression profiles revealed numerous genes differently expressed in diabetic versus healthy left ventricles (Fig. 2A) with a strong effect of the disease on left ventricular gene expression. 626 genes were significantly differently expressed (fold change $>\pm 1.5$ and $p\text{-value} < 0.05$) in diabetic versus healthy left ventricles (Fig. 2C). The mRNA of 286 genes was more abundant in diabetic versus healthy left

ventricles whereas the mRNA of 340 genes was less abundant. Atorvastatin also significantly modified gene expression in the left ventricles of diabetic rats but within a less important magnitude than that of diabetes itself (Fig. 2B). 446 genes were significantly differently expressed (fold change ≥ 1.5 and $p < 0.05$) in statin treated diabetic versus untreated diabetic left ventricles (Fig. 2D). The mRNA of 205 genes was more abundant in diabetic statin diabetic versus untreated diabetic left ventricles whereas the mRNA of 241 genes was less abundant. The effect of diabetes and atorvastatin on gene expression was opposite in 6 genes (Fig. 2E). Down-regulation in diabetes compared with healthy and up-regulation by treatment in diabetes was observed only for eNOS. Up-regulation in diabetes compared to healthy and down-regulation following treatment in diabetes was observed for 5 genes: NUDT4, GSMT5, predicted NUBPL, predicted RGD1306157 and LOC362480.

Only 8 probes found differences between statin healthy and untreated healthy left ventricles; none of these genes were involved in cardiac contraction or β -adrenergic signaling (data not shown).

Transcriptomic Effect of Atorvastatin on β -Adrenergic Signaling Pathway

Among genes involved in β -adrenergic signaling, micro-array analysis identified 9 genes differently expressed in diabetic left ventricles compared with diabetic left ventricles treated by atorvastatin (Table 4). All except phosphodiesterase 2A (PDE2A) and Ras-related associated with diabetes (RRAD) were also differently expressed in diabetic versus healthy left ventricles. NOS3 mRNA was 3.5 fold more abundant in diabetic left ventricles treated by atorvastatin than in non-treated diabetic left ventricles, whereas it was reduced 2 fold in diabetic versus healthy left ventricles. This was the only gene where we found an adverse effect of diabetes and atorvastatin. Adenylate cyclase 4 mRNA, arrestin domain containing 1 (ARRDC1), calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (Camk2n1) and phospholipase A2G1VB mRNAs were respectively 1.9, 1.6, 1.7 and 1.7 fold more abundant in diabetic left ventricles treated by atorvastatin than in non-treated diabetic left ventricles. All were already respectively 1.6, 1.4, 1.6, 1.5 fold more abundant than in healthy left ventricles. Troponin C1 and phospholipase A2G5 mRNAs were respectively 2.0 and 2.1 fold less abundant in diabetic left ventricles treated with

atorvastatin than in non-treated diabetic left ventricles, where they were already respectively 2.0 and 1.9 fold less abundant than in healthy left ventricles. PDE2A mRNA was 1.6 fold more abundant in diabetic left ventricles treated by atorvastatin than in non-treated diabetic left ventricles, where it was not different from healthy left ventricles. RRAD mRNA was 2.0 fold less abundant in diabetic left ventricles treated by atorvastatin than in non-treated diabetic left ventricles, whereas it was not modified in diabetic versus healthy left ventricles.

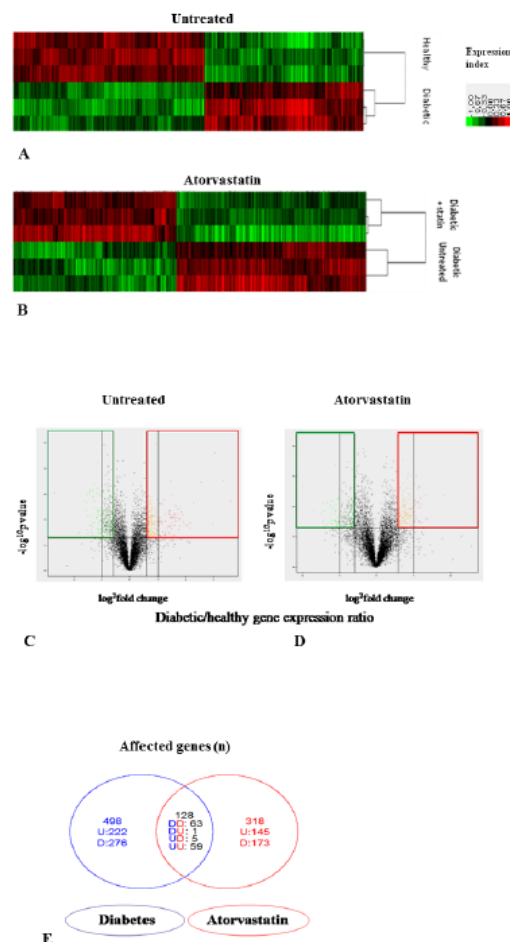


Figure 2. Effects of atorvastatin on the transcriptome of left ventricles of healthy or diabetic rats. **Panel A-B** Heat Map of RNA expression profiles in diabetic versus healthy left ventricles (**Panel A**) or in statin diabetic versus untreated diabetic left ventricles (**Panel B**); Color scale indicate relative expression ratio for each gene in diabetic versus healthy left ventricle (**Panel A**) or in statin versus untreated diabetic left ventricle. **Panel**

C-D Volcano Plot for the modification of genes expression by diabetes in heart ventricle (Panel C) and by atorvastatin in diabetic left ventricle (Panel D). The vertical axis represents the p value ($-\log^{10} p$ value) and the horizontal axis range the fold change ($\log^2$ ratio) between diabetic and healthy left ventricles (Panel C) or statin diabetic versus untreated diabetic left ventricles (Panel D) (by t -test). Genes in the area delimited in red have a fold change greater than 1.5 with a p value < 0.05 . Genes in the area delimited in green have a fold change greater than -1.5 (ratio < 0.67) with a p value < 0.05 . Panel E Venn diagram representing the differently expressed genes in diabetic versus healthy left ventricles in blue and in statin diabetic versus untreated diabetic left ventricles in red ($p < 0.05$). D is for down-regulation in diabetic versus healthy left ventricles, U for up-regulation. The overlapping part represents the genes modified by diabetes as well as statin, with up- or down-regulation for each comparison.

Expressions of Proteins Involved in β -Adrenergic Signaling

Protein expressions in left ventricles of healthy or diabetic rats, treated or not by atorvastatin (6 hearts in each group) are represented in Figure 3. The expression of $\beta 1$ -adrenoceptor was reduced in diabetic untreated rats compared with healthy rats but corrected by atorvastatin (Fig. 3A). In contrast, $\beta 3$ -adrenoceptor increased in both untreated and atorvastatin diabetic rats compared with healthy rats (Fig. 3B). There was no significant difference in diabetic group with or without pre-treatment with atorvastatin. Atorvastatin did not modify $\beta 3$ -adrenoceptor expressions in healthy rats left ventricles. The cAMP transporter MPR4 was increased in diabetic untreated rats compared to healthy rats and corrected by atorvastatin (Fig. 3C).

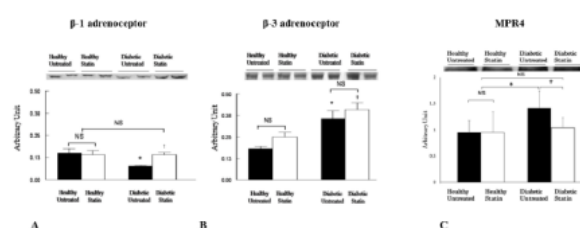


Figure 3. Representative Western Blot and densitometric data reflecting protein expressions of

$\beta 1$ -adrenoceptor (Panel A), $\beta 3$ -adrenoceptor (Panel B), multidrug resistance protein 4 (MRP4, Panel C), in left ventricles homogenates of healthy or diabetic rats, treated or not by atorvastatin ($50 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$) during 15 days. Western blot experiments were normalized using proteins using Ponceau S solution ($\beta 1$ - and $\beta 3$ -adrenoceptor), or GAPDH (37kDa). Data are means $\pm$ SD ($n=4$ to 9). *: $p < 0.05$ versus healthy untreated rats; †: $p < 0.05$ diabetic statin versus diabetic untreated rats. NS= no significant difference between groups.

NO synthase blockade

L-NAME, a non specific NO synthase inhibitor, abolished the beneficial effects of atorvastatin on the β -adrenoceptor response in diabetic left ventricular papillary muscle (Fig. 4).

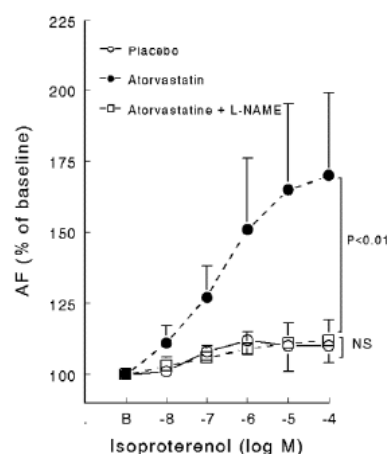


Figure 4. Active force (% of baseline value) variation of left ventricle papillary muscle exposed to isoproterenol in diabetic rats pretreated with statin (atorvastatin, $50 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$) during 15 days (8 rats per group) with or without L-NAME administration. Control refers to diabetic rats not receiving statin. AF/s = active force normalized per cross-sectional area during isometric contraction. Data are expressed as mean $\pm$ SD. NS: non-significant.

Discussion

The study reported here has shown that, in rats with diabetic cardiomyopathy, atorvastatin restored the positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation *in vivo* and *in vitro*

whereas atorvastatin did not correct the basal diastolic dysfunction. We have further shown that atorvastatin treatment corrected altered expressions in diabetic rats by countering the down-regulation of β 1-adrenoceptor protein expression and the up-regulation of phospholamban and MRP4. In contrast, up-regulation of β 3-adrenoceptor protein expression remained after atorvastatin treatment. These results suggest that the pleiotropic effects of atorvastatin contribute to reducing the β -adrenergic dysfunction in diabetic hearts. Therefore, one explanation for the clinical benefits of statins in diabetic patients (16) may be related to the improvement in cardiac adrenergic response, restoring a functional reserve for challenging times such as critically ill conditions or the perioperative period. Moreover, catecholamines are widely used in intensive care unit but considerable intra and inter-individual variability exists in the response and most previous studies have tried to elucidate pharmacokinetic and pharmacodynamic differences in catecholamine response but very few have considered differences linked to the baseline characteristics of the patient such as diabetes and chronic treatment with statins (25).

Diabetic cardiomyopathy is associated with a worsen perioperative prognosis independently of other cardiovascular disease or complication. Apart from changes in basal function and contractile proteins (7), we have previously demonstrated the importance of β -adrenergic dysfunction in diabetic hearts from the dysregulation of β 1- and β 3-adrenoceptors, the predominance of the NO pathway signaling (6,9). Inflammation is another key process in diabetic cardiomyopathy, due to hyperglycemia, and increases in levels of free fatty acids and reactive oxygen species (7,10). In diabetic hearts chronic activation of the PI3K/Akt pro-inflammatory pathway results in more Rho and Ras active proteins and contributes to excitation-contraction coupling abnormalities, myocardial fibrosis and cardiomyocyte apoptosis (10).

Statins have clinical benefits on morbidity and mortality in a wide range of diseases and particularly in diabetic patients (14,16,17). Previous experimental studies have explained this positive effect on diabetic hearts by a normalization of RhoA signaling and an increase in NOS3 expression (22,26,27). Atorvastatin and fluvastatin have been reported to limit the over-expression of pro-inflammatory cytokines, development of cardiac fibrosis and left ventricle remodeling after

myocardial infarction in experimental diabetic cardiomyopathy (22, 26-28). Fewer data are available on the effects of statins on cardiac contraction and excitation-contraction coupling in diabetic cardiomyopathy and this area is somewhat controversial. *In vivo*, statins improve basal LVEF in diabetic cardiomyopathy only when it was reduced on basal measurements (27-29). *In vitro*, simvastatin improved contraction in neonatal cardiomyocytes of healthy rats (29). Fluvastatin improved the response of heart rate, arterial pressure and systolic rise of left ventricular pressure to phenylephrine and nitroprusside (30). Only one study described in neonatal cardiomyocytes a reduction in cAMP elevation in response to isoproterenol after atorvastatin treatment, mediated by down-regulation of α sG-proteins (31). To our knowledge, although statins have been recently proven to inhibit β -adrenoceptor stimulated apoptosis (32), no consistent data have been published on the impact of atorvastatin treatment on the cardiac response to β -adrenergic stimulation in diabetic cardiomyopathy.

In our study, atorvastatin corrected β -adrenergic cardiac dysfunction in diabetic rats but did not affect basal diastolic dysfunction. As previously reported in diabetic hearts (6), we observed normal systolic function with normal LVEF and LVSF using echocardiography and normal AF in papillary muscles in basal conditions. The positive inotropic response to β -adrenergic stimulation was markedly decreased in diabetic compared to healthy rats as previously described (6). Prolonged contraction of papillary muscles with increased TPF and TPS and a diastolic dysfunction with a prolonged IVRT are also common features of the diabetic cardiomyopathy (9). We observed that atorvastatin partly corrected β -adrenergic dysfunction but did not influence consistently diastolic function in diabetic rats that remained altered compared with healthy rats. A strength of our study is the consistent effects of atorvastatin treatment that were observed both *in vivo* by echocardiography and *ex vivo* on papillary muscles. Atorvastatin did not affect body or heart weight, total and LDL cholesterol or blood glucose level in healthy or diabetic rats, in contrast with previously reported data (30). These results show that atorvastatin corrected β -adrenergic dysfunction in diabetic rats but did not suppress the features of diabetic cardiomyopathy, strongly suggesting modifications in the β -adrenergic signaling pathway.

In isolated neonatal cardiomyocytes, atorvastatin has been shown to decrease the inotropic response to β -adrenoceptor stimulation via reduced isoprenylation of G γ protein, without significant changes in β -adrenoceptor density and cAMP production (31). However, in adult rat cardiomyocytes, Pugh et al. (33) observed that simvastatin potentiated the inotropic response to β_2 - but not β_1 -adrenoceptor stimulation. However, in our *in vivo* and *in vitro* study, we did not observe any direct effect of atorvastatin on the β -adrenoceptor function in healthy rats.

From the microarray analysis of diabetic hearts and pathway analysis, we evaluated the expression of several proteins involved in the β -adrenergic signaling pathway. As post-transcriptional modifications or microarray biases are possible we confirmed our results by Western blotting. In the current study, atorvastatin improved the β_1/β_3 -adrenoceptor ratio in diabetic hearts contributing to the positive inotropic effect of cardiac β -adrenergic stimulation. The expression of β_1 -adrenoceptor was reduced in diabetic untreated rats compared with healthy rats but corrected by atorvastatin. In contrast, the expression of β_3 -adrenoceptor increased in both untreated and atorvastatin diabetic rats compared with healthy rats. In diabetic hearts the positive inotropic effect induced by β_1 -adrenoceptor stimulation is reduced by the down-regulation of β_1 -adrenoceptor expression (6). Moreover it is balanced by an increased negative inotropic effect from β_3 -adrenoceptor stimulation due to β_3 -adrenoceptor up-regulation (6). After atorvastatin treatment, the positive inotropic effect from β_1 -adrenoceptor stimulation is increased by normalization of β_1 -adrenoceptor expression and counteracts more effectively the β_3 -adrenoceptor negative inotropic effect even if unchanged. In contrast, statins increase PDE2 RNA production as well, which is known to be involved in β_3 -adrenoceptor pathway. Nevertheless, the increase in PDE2 RNA production is probably not enough to limit the benefit of the up-regulation of the β_1 -adrenoceptor pathway in treated diabetic rats.

MRP4, an active efflux transporter known to act as an independent endogenous regulator of cAMP is upregulated in diabetic (34) and elderly rats (35). Our study (Fig. 5) confirmed this result. MRP4 overexpression contributes to a decrease in the positive inotropic effect induced by cytosolic cAMP production after β_1 -adrenoceptor

stimulations. Our data suggest that atorvastatin decreased the over-expression of MRP4 proteins in treated diabetes, which leads to an increase in the cytosolic cAMP concentration. This decrease in MRP4 expression may be associated with the over-expression of β_1 -adrenoceptor pathway proteins for off-setting over-expression of PDE2 after atorvastatin treatment. However, we cannot conclude if MRP4 abnormalities observed in diabetes participates to β -adrenoceptor dysfunction or is only a consequence. Anyway, atorvastatin treatment was responsible for normalization of MRP4.

The cholesterol-independent, so-called the "pleiotropic" effects of statins seems to be predominantly related to up-regulation and activation of NOS3, mainly through the inhibition of the Rho/ROCK and PI3K/protein kinase Akt pathways, respectively (21). The activation of NOS3 by statins occurs through scavenger β_1 -adrenoceptor, Gi protein, phospholipase C and entry of calcium (36). More recently, rosuvastatin has been shown to reverse isoproterenol-induced acute myocardial infarction in the rat, at least partly related to upregulation of NOS2 (37). We observed that L-NAME, a non-specific NO synthase inhibitor, abolished the beneficial effects of atorvastatin on the β -adrenoceptor response in diabetic rats (Fig. 4). This suggests that the main mechanism involved in the protective effect of statins on the β -adrenoceptor response is also related to either upregulation and/or activation of NOS3 and/or NOS2. These results are also in agreement with previous results obtained in a non-diabetic rat model of high-fat diet-induced obesity in the rat showing that rosuvastatin restores both adrenergic and nitrenergic functions in mesenteric arteries (38).

Several points should be taken into consideration in interpreting these results. First, this study was conducted in rat myocardium, which differs from human myocardium. Second, we employed an animal model of type-1 diabetes produced by streptozotocin injection and we studied only short term effects of diabetes and without insulin treatment. This model requires careful extrapolation to human diabetes, particularly type 2 diabetes (39), although it is considered to be a well-established and reliable model for diabetes mellitus. Third, analysis of gene expression using a microarray has its own limitations related to tissue selection, presentation and interpretation of vast amounts of data. Selected results were confirmed by

Western blotting but not for all modified genes. Fourth, the dose of atorvastatin used in the study is higher than in human treatment but is the common regimen used in experimental studies (26). The effects of other statin drugs have not been evaluated here. Since statins often exhibit class effects, some differences may be expected (40). Lastly, some concerns have been raised about an increased risk of diabetes onset after high-dose statin treatment (41). However the benefits of statins in overt diabetes have been widely studied and are not subject to controversy. In contrast, the benefit of statin in critically ill patients remained to be determined (42,43).

In conclusion, we have demonstrated that, in diabetic cardiomyopathy, atorvastatin restored the positive inotropic effect of the β -adrenoceptor stimulation. This effect is consistent with the pleiotropic effect of statins and is not only due to a single protein change but to the results of a combination of multiple modifications in different steps of β -adrenergic signaling pathway, particularly through the NO-synthase pathway.

REFERENCES

- Amour J, Kersten JR: Diabetic cardiomyopathy and anesthesia: bench to bedside. *Anesthesiology* 2008; 108: 524-530
- Dernellis J, Panaretou M: Assessment of cardiac risk before non-cardiac surgery: brain natriuretic peptide in 1590 patients. *Heart* 2006; 92: 1645-1650
- Hammill BG, Curtis LH, Bennett-Guerrero E, et al.: Impact of heart failure on patients undergoing major noncardiac surgery. *Anesthesiology* 2008; 108: 559-567
- Koh GC, Vlaar AP, Hofstra JJ, et al.: In the critically ill patient, diabetes predicts mortality independent of statin therapy but is not associated with acute lung injury: a cohort study. *Crit Care Med* 2012; 40: 1835-1843
- Roth DM, White CD, Hamilton CD, et al.: Adrenergic desensitization in left ventricle from streptozotocin diabetic swine. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2315-2325
- Amour J, Loyer X, Le Guen M, et al.: Altered contractile response due to increased β_3 -adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: the role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology* 2007; 107: 452-460
- Boudina S, Abel ED: Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11: 31-39
- Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF: Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. *Heart Fail Rev* 2011; 17: 324-344.
- Amour J, Loyer X, Michelet P, et al.: Preservation of the positive lusitropic effect of β -adrenoceptors stimulation in diabetic cardiomyopathy. *Anesth Analg* 2008; 107: 1130-8
- Sharma V, McNeill JH: Parallel effects of β -adrenoceptor blockade on cardiac function and fatty acid oxidation in the diabetic heart: Confronting the maze. *World J Cardiol* 2011; 3: 281-302
- The Scandinavian Simvastatin Survival Study group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-1389
- Le Manach Y, Coriat P, Collard CD, Riedel B: Statin therapy within the perioperative period. *Anesthesiology* 2008; 108: 1141-6
- Prinz V, Endres M: The acute (cerebro)vascular effects of statins. *Anesth Analg* 2009; 109: 572-584
- Chen YH, Feng B, Chen ZW: Statins for primary prevention of cardiovascular and cerebrovascular events in diabetic patients without established cardiovascular diseases: A meta-analysis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012; 120: 116-120
- Ouattara A, Benhaoua H, Le Manach Y, et al.: Perioperative statin therapy is associated with a significant and dose-dependent reduction of adverse cardiovascular outcomes after coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009; 23: 633-638
- Olafsdottir E, Aspelund T, Sigurdsson G, et al.: Effects of statin medication on mortality risk associated with type 2 diabetes in older persons: The population-based AGES-Reykjavik Study. *BMJ Open* 2011; 1: e000132
- Silva S, Lourenco P, Paulo C, et al.: Statin-induced low cholesterol is not associated with poor outcome in chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011; 17: 284-290
- Janda S, Young A, Fitzgerald JM, Etminan M, Swiston J. The effect of statins on mortality from severe infections and sepsis: a systematic review and meta-analysis. *J Crit Care* 2010; 25: 656.e7-22.
- Thomsen RW, Hundborg HH, Johnsen SP, et al.: Statin use and mortality within 180 days after bacteremia: a population-based cohort study. *Crit Care Med* 2006; 34: 1080-1086.
- Birnbaum Y, Ye Y, Rosanio S, et al.: Prostaglandins mediate the cardioprotective effects of atorvastatin against ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 345-355
- Balakumar P, Kathuria S, Taneja G, et al.: Is targeting eNOS a key mechanistic insight of cardiovascular defensive potentials of statins? *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52: 83-92
- Yu Y, Ohmori K, Chen Y, et al.: Effects of pravastatin on progression of glucose intolerance and

- cardiovascular remodeling in a type II diabetes model. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 904-913
23. Gu W, Kehl F, Krolkowski JG, et al.: Simvastatin restores ischemic preconditioning in the presence of hyperglycemia through a nitric oxide-mediated mechanism. *Anesthesiology* 2008; 108: 634-642
 24. Kang L, Ge CJ, Hu SJ: Beneficial effect of atorvastatin on left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology* 2007; 80: 120-126
 25. Beloeil H, Mazoit JX, Benhamou D, et al.: Norepinephrine kinetics and dynamics in septic shock and trauma patients. *Br J Anaesth* 2005; 95: 782-778
 26. Van Linthout S, Riad A, Dhayat N, et al.: Anti-inflammatory effects of atorvastatin improve left ventricular function in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* 2007; 50: 1977-1986
 27. Dai QM, Lu J, Liu NF: Fluvastatin attenuates myocardial interstitial fibrosis and cardiac dysfunction in diabetic rats by inhibiting over-expression of connective tissue growth factor. *Chin Med J* 2011; 124: 89-94
 28. Martin JH, Connelly KA, Boyle A, et al.: Effect of atorvastatin on cardiac remodelling and mortality in rats following hyperglycemia and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2010; 143: 353-360
 29. Zheng X, Hu SJ: Effects of simvastatin on cardiac performance and expression of sarcoplasmic reticular calcium regulatory proteins in rat heart. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 696-704
 30. Xie F, Sun C, Sun LH, Li JY, et al.: Influence of fluvastatin on cardiac function and baroreflex sensitivity in diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32: 321-338
 31. Muhlhauser U, Zolk O, Rau T, et al.: Atorvastatin desensitizes beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes via reduced isoprenylation of G-protein gamma-subunits. *FASEB J* 2006; 20: 785-787
 32. Ito M, Adachi T, Pimentel DR, et al.: Statins inhibit β -adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes via a Rac1-dependent mechanism. *Circulation* 2004; 110: 412-418
 33. Pugh SD, MacDougall DA, Agarwal SR, et al.: Caveolin contributes to the modulation of basal and β -adrenergic stimulated function of the adult rat ventricular myocyte by simvastatin: a novel pleiotropic effect. *PLoS One* 2014; 9: e106905
 34. Sassi Y, Abi-Gerges A, Fauconnier J, et al.: Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J* 2011; 26: 1009-1017
 35. Carillion A, Feldman S, Jiang C, et al.: Overexpression of cyclic adenosine monophosphate effluent protein MRP4 induces an altered response to β -adrenergic stimulation in the senescent rat heart. *Anesthesiology* 2015; 122: 334-342
 36. Datar R, Kaesemeyer WH, Chandra S, et al.: Acute activation of eNOS by statins involves scavenger receptor-B1, G protein subunit Gi, phospholipase C and calcium influx. *Br J Pharmacol* 2010; 160: 1765-1772
 37. Zaintone S, Abo-Gresha NM: Rosuvastatin promotes angiogenesis and reverses isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats: Role of iNOS and VEGF. *Eur J Pharmacol* 2012; 691: 134-142
 38. Blanco-Riveiro J, de las Heras N, Martin-Fernandez B, et al.: Rosuvastatin restored adrenergic and nitregic function in mesenteric arteries from obese rats. *Br J Pharmacol* 2011; 162: 271-285
 39. Jiang C, Carillion A, Na N, et al.: Modification of the β adrenoceptor stimulation pathway in Zucker obese and obese diabetic rat myocardium. *Crit Care Med* 2015; 43 Epub Ahead.
 40. Chen Y, Ohmori K, Mizukawa M, et al.: Differential impact of atorvastatin vs pravastatin on progressive insulin resistance and left ventricular diastolic dysfunction in a rat model of type II diabetes. *Circ J* 2007; 71: 144-52
 41. Preiss D, Seshasai SR, Welsh P, et al.: Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis. *JAMA* 2011; 305: 2556-64
 42. Papazian L, Roch A, Charles PE, et al.: Effect of statin therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia: a randomized clinical trial. *JAMA* 2013; 310: 1692-1700.
 43. McAuley DF, Laffey JG, O'Kane CM, et al.: Simvastatin in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2014; 371: 1695-1703.

TABLE 1. General Characteristics of Healthy and Diabetic Treated (atorvastatin, 50 mg.kg⁻¹.day⁻¹) and Control rats

	Healthy Untreated	Healthy Statin	Diabetic Untreated	Diabetic Statin
General characteristics (no. of rats)	(n=23)	(n=25)	(n=20)	(n=33)
Body weight (g)	380 ± 66	405 ± 81	240 ± 44*	238 ± 57*‡
Heart weight (mg)	828 ± 173	850 ± 174	575 ± 120*	559 ± 160*‡
Heart weight/ body weight (mg.g ⁻¹)	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.4 ± 0.3*	2.3 ± 0.2†
Blood glucose (mM)	9.8 ± 1.2	9.6 ± 1.7	41.7 ± 5*	44.1 ± 8.1*‡
Plasma bicarbonate (mM)	28 ± 5	27 ± 5	28 ± 7	27 ± 4
Lipid Measurement (no. of rats)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
Total cholesterol (g.L ⁻¹)	0.50 ± 0.03	0.43 ± 0.23	0.69 ± 0.12*	0.67 ± 0.13*
Triglycerides (g.L ⁻¹)	0.96 ± 0.21	1.03 ± 0.32	0.55 ± 0.29	0.87 ± 0.49
LDL cholesterol (g.L ⁻¹)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.14 ± 0.03*	0.12 ± 0.03*†
Echocardiography (no. of rats)	(n=18)	(n=18)	(n=17)	(n=16)
Heart rate (beats.min ⁻¹)	352 ± 34	342 ± 18	309 ± 26*	298 ± 37*
Left ventricle ejection fraction (%)	83 ± 8	84 ± 7	87 ± 5	79 ± 7†
Left ventricle shortening fraction (%)	49 ± 7	49 ± 9	52 ± 7	44 ± 6*†
E (ms)	0.92 ± 0.17	0.88 ± 0.14	0.92 ± 0.17	0.89 ± 0.11
IVRT (ms)	18 ± 5	19 ± 6	31 ± 9*	24 ± 7*†‡
DT (ms)	41 ± 11	37 ± 10	36 ± 9	43 ± 11
E/E _a	17 ± 4	17 ± 4	21 ± 6*	20 ± 5
Mechanical Properties of muscles	(no (n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=15)
V _{max} (L _{max} .s ⁻¹)	3.40±0.27	3.32±0.65	2.70±0.25*	2.51±0.31*‡
AF/s (mN.mm ⁻²)	65±22	64±19	67±13	66±26
TPS (ms)	165±8	175±11	222±14*	205±17*†‡
TPF (ms)	144±10	167±16*†	203±18*	184±23*†

Data are mean ± SD; *: $p < 0.05$ versus untreated healthy group; †: $p < 0.05$ between statin and untreated rats in each group healthy or diabetic rats; ‡: $p < 0.05$ between healthy statin rats and diabetic statin rats. IVRT= Isovolumic relaxation time; E= peak velocity of early mitral flow; DT= deceleration time of E wave, E/E_a= E peak velocity of early mitral flow/E_a early diastolic velocity of lateral mitral annulus ratio; V_{max} = maximal unloading isotonic shortening velocity (L_{max} . s⁻¹); AF/s = active force normalized per cross-sectional area during isometric contraction; TPF = time to peak force; TPS = time to peak shortening.

TABLE 2. Echocardiographic Measurement of Inotropic and Lusitropic Response to the β -Adrenoceptor Stimulation in Healthy and Diabetic Rats Pretreated or Not With Atorvastatin.

% baseline value	Healthy Untreated (n= 10)	Healthy Statin (n= 10)	Diabetic Untreated (n= 9)	Diabetic Statin (n = 8)
Heart rate	118 $\pm$ 17*	110 $\pm$ 40*	130 $\pm$ 17*	114 $\pm$ 18*
LVEF	123 $\pm$ 13*	120 $\pm$ 9*	108 $\pm$ 6*	128 $\pm$ 11* [†]
LVSF	160 $\pm$ 19*	157 $\pm$ 25*	125 $\pm$ 16*	167 $\pm$ 30* [†]
IVRT	94 $\pm$ 21	61 $\pm$ 14 [†]	71 $\pm$ 34	82 $\pm$ 25
DT	99 $\pm$ 24	102 $\pm$ 35	100 $\pm$ 28	91 $\pm$ 40
E/Ea	102 $\pm$ 28	121 $\pm$ 47	84 $\pm$ 38	99 $\pm$ 21

Data are mean percentages of baseline values $\pm$ SD. * $p < 0.05$ vs. baseline value; *: $p < 0.05$ versus untreated healthy group; [†]: $p < 0.05$ between statin and untreated rats in each group healthy or diabetic rats; [‡]: $p < 0.05$ between healthy statin rats and diabetic statin rats. LVEF= left ventricular ejection fraction; LVSF= left ventricular shortening fraction; IVRT= isovolumic relaxation time; E= peak velocity of early mitral flow; DT= deceleration time of E wave, E/Ea= E peak velocity of early mitral flow/Ea early diastolic velocity of lateral mitral annulus ratio.

TABLE 3. Comparison of Inotropic Response to β -adrenergic Stimulation of Left Ventricle Papillary Muscles of Healthy or Diabetic rats, Pretreated or Not With Atorvastatin.

Isoproterenol	Healthy Untreated (n=8)		Healthy Statin (n=8)		Diabetic Untreated rats(n=8)		Diabetic Statin (n=8)	
	$V_{\max}$	AF/s	$V_{\max}$	AF/s	$V_{\max}$	AF/s	$V_{\max}$	AF/s
$_{\max}\text{Eff} (\%)$	181 $\pm$ 11*	184 $\pm$ 22*	194 $\pm$ 30*	177 $\pm$ 22*	128 $\pm$ 7*	112 $\pm$ 15* [†]	174 $\pm$ 27* [‡]	158 $\pm$ 34* ^{†‡}
$C_{50} (\mu\text{M})$	0.16 $\pm$ 0.15	0.20 $\pm$ 0.15	0.91 $\pm$ 1.14	0.81 $\pm$ 1.15	0.07 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.08	0.28 $\pm$ 0.34

Data are mean $\pm$ SD; *: $p < 0.05$ versus untreated healthy group; [†]: $p < 0.05$ between statin and untreated rats in each group healthy or diabetic rats; [‡]: $p < 0.05$ between healthy statin rats and diabetic statin rats. $V_{\max}$ = maximal unloading isotonic shortening velocity; AF/s= active force normalized per cross-sectional area during isometric contraction; $_{\max}\text{Eff}$ = maximal effect of isoproterenol on AF as percentage of baseline value; C_{50} = concentration of isoproterenol producing 50% of the maximal effect.

2.4 : Etude n° 4 : Etude du rôle de MRP4 dans la dysfonction β -adrénergique de la cardiopathie diabétique

Atorvastatin Reduces β -Adrenergic Dysfunction in Rats with Diabetic Cardiomyopathy.

Carillion A; Feldman S, Hatem S; Hulot JS; Riou B; Amour J.

Submitted

Buts :

Le diabète induit en quelques années une cardiopathie indépendamment de toute comorbidité et même en cas de contrôle glycémique optimal. Les principales caractéristiques sont une dysfonction diastolique avec une fonction systolique préservée au repos mais une diminution de la réponse inotrope positive lors de la stimulation β -adrénergique.² Cette dysfonction favorise l'instabilité hémodynamique en péri-opératoire par exemple Elle est en partie expliquée par une surexpression des récepteurs β_3 -adrénergiques et une augmentation de la dégradation de l'AMPc, second messenger intracellulaire de la signalisation β -adrénergique.² Néanmoins, la correction de ces altérations n'a qu'un effet de restauration partiel suggérant une atteinte à d'autres niveaux de la signalisation.

Le canal effluent MRP4 (multidrug resistance associated protein 4) participe à la régulation de la concentration intracellulaire d'AMPc.²¹ Ce transporteur efflue des cardiomyocytes l'AMPc produit en particulier lors de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques. Chez les diabétiques, l'expression de MRP4 est augmentée dans le foie et les reins de souris diabétiques⁵⁷ mais n'a à notre connaissance jamais été évaluée dans le cœur des diabétiques.

L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer le rôle de MRP4 dans l'altération de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans la cardiopathie diabétique.

Méthodes :

Pour répondre à cette question, nous avons comparé des rats jeunes adultes sains à des rats de même âge rendus diabétiques par une injection de streptozotocine (15mg.kg^{-1} en intraveineux direct, analyse 6 semaines après). La fonction contractile a été évaluée *in vivo*

par échocardiographie sur la fraction de raccourcissement (FRVG) et la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) et *in vitro* par Ionoptix® sur des cardiomyocytes isolés, par la mesure du raccourcissement des sarcomères (amplitude, vitesse maximale, délai de pic normalisé), et de la transitoire calcique par la mesure des variations d'amplitude de l'intensité de fluorescence de la sonde Fura2-AM. La stimulation des récepteurs β -adrénergiques a été réalisée par l'application d'isoprotérénol, un agoniste des récepteurs β -adrénergiques ($10\mu\text{g.kg}^{-1}$ *in vivo* et 10^{-6}M *in vitro*). Les expériences ont été menées avec une inhibition sélective du transporteur MRP4 par le MK571 pour déterminer le rôle de ce transporteur (30mg.kg^{-1} *in vivo* et 10^{-6}M *in vitro*). L'expression de la protéine MRP4 a été évaluée par Western Blotting sur des homogénats de ventricule gauche. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ DS.

Résultats :

Nous avons retrouvé une contractilité basale normale et une altération de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques chez les animaux diabétiques comme dans les études déjà effectuées sur ce modèle. L'effet inotrope positif de l'isoprotérénol était réduit chez les rats diabétiques *in vivo* (FEVG 108 ± 7 vs. 124 ± 14 , $P=0.009$, sur 8 rats par groupe, en % en de la valeur de base) comme *in vitro* (amplitude de raccourcissement 105 ± 21 vs. 138 ± 36 , $P=0.09$, temps au pic de raccourcissement 84 ± 9 vs. 7 ± 20 , $P=0.046$, vitesse maximale de raccourcissement 134 ± 53 vs. 177 ± 77 , $P=0.036$, en % en de la valeur de base) par rapport aux rats sains.

L'expression de MRP4 était 2,4 fois supérieure dans les ventricules gauches de rats sénescents comparés aux jeunes adultes ($P=0.045$ sur 5 rats par groupe).

L'inhibition de MRP4 par MK571 a restauré l'effet inotrope positif, *in vivo*, chez les rats diabétiques en comparaison aux rats diabétiques non traités (FEVG $124 \pm 9\%$ vs FEVG 108 ± 7 , en % de valeur de base respectivement; $P=0.05$) et *in vitro* (amplitude de raccourcissement $135 \pm 28\%$ vs 84 ± 9 , en % de valeur de base respectivement, $P=0.001$) vitesse maximale de raccourcissement 176 ± 57 idem, $P=0.024$ par rapport aux cardiomyocytes diabétiques non traités). Après l'inhibition de MRP4 par le MK571, l'effet inotrope positif de la stimulation β -adrénergique était restauré *in vivo* et *in vitro* dans les cœurs diabétiques par rapport au cœur sains.

Conclusion :

Dans ce travail nous avons pu montrer que l'inhibition du transporteur MRP4 restaure la réponse inotrope positive à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans la cardiopathie diabétique *in vivo* comme *in vitro*. La surexpression de MRP4 dans les cœurs diabétiques semble lui donner un rôle particulier dans cette condition physiologique en augmentant l'extrusion de l'AMPc produit lors de la stimulation β -adrénergique.

Over-expression of cAMP effluent protein MRP4 induces an altered response to β -adrenergic stimulation in the diabetic rat heart

Aude Carillion, M.D.,* Sarah Feldman,# Fabrice Atassi, Ph.D.,¶ Nathalie Mougenot,||, + Jean-Sébastien Hulot, M.D., Ph.D.,†† Bruno Riou, M.D., Ph.D.,‡ Julien Amour, M.D., Ph.D.**

Abstract

Background: In the diabetic heart, the positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation is reduced, partly by the dysregulation of β 1- and β 3-adrenoceptors. The multi-drug resistance protein MRP4 takes part in the control of intracellular cAMP concentration and contributes to the β -adrenergic dysfunction of the senescent heart but its role in the diabetic heart remains unknown.

Materials and Methods: The β -adrenergic responses to isoproterenol were investigated *in vivo* (stress echocardiography) and *in vitro* (isolated cardiomyocyte by Ionoptix® with sarcomere shortening and calcium transient) in healthy and diabetic rats (6 weeks after streptozotocin injection), with pretreatment or not with MK571, a specific MRP4 inhibitor. MRP4 was quantified in left ventricular homogenates by Western Blotting. Data are mean $\pm$ SD expressed as % of baseline value.

Results: The positive inotropic effect of isoproterenol was significantly reduced in diabetic rats *in vivo* (left ventricular shortening fraction $108 \pm 7\%$ vs. $124 \pm 14\%$, $P=0.009$, $n=15$ rats) and tending to be reduced *in vitro* (sarcomere shortening $105 \pm 21\%$ vs. $138 \pm 36\%$, $P=0.09$, $n=15$ cells by group) as compared to healthy rats. MRP4 expression increased 2.4-fold in diabetic compared to healthy rat myocardium ($P=0.045$, $n=5$ rats per group). In diabetic rats the inhibition of MRP4 by MK571 restored the positive inotropic effect of isoproterenol *in vivo* ($124 \pm 9\%$, $n=8$ rats). *In vitro* in diabetic cardiomyocytes pretreated with MK571, both sarcomere shortening ($135 \pm 28\%$ vs. $105 \pm 21\%$, $P=0.01$, $n=15$ cells per group) increased significantly.

Conclusions: MRP4 over-expression contributes to the reduction of the positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation in the diabetic heart.

* Assistant Professor, Université de Reims Champagne-Ardenne, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Robert Debré Hospital, Reims, UMR Inserm-UPMC 1166, Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Research Student, UMR Inserm-UPMC 1166, Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Paris.

¶ Research assistant, UMR Inserm-UPMC 1166, Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Paris.

|| Research Ingeneer, UMR Inserm-UPMC 1166, Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Paris.

†† Professor of Pharmacology, UMR Inserm-UPMC 1166, Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Paris, Department of Pharmacology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Paris

‡ Professor of Anesthesiology and Critical Care, UMR Inserm-UPMC 1166 Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Chairman, Department of Emergency Medicine and Surgery, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris.

** Professor of Anesthesiology and Critical Care, UMR Inserm-UPMC 1166, Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Hôpital

Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Paris.

From Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, UMR INSERM-UPMC 1166, Paris ; Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France; Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Robert Debré Hospital, Reims, France.

Correspondence should be addressed to: Dr. Aude Carillion, Département d'Anesthésie-Réanimation, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex13, France.

Email: aude.carillion@psl.aphp.fr; Phone : 0033+184827387; Fax : 0033+1 42 16 56 39

Support: Support was provided solely from institutional and/or departmental sources. Dr. Aude Carillion was the recipient of a research grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (Paris, France) (FRM grant number DEA20090616244).

Introduction

In the diabetic heart, diastolic dysfunction¹⁻³ and a reduced response to β -adrenoceptor stimulation are observed which may contribute to hemodynamic instability during the perioperative period.² Down-regulation of β 1- and β 2-adrenoceptors impair the positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation¹ whereas over-expression of β 3-adrenoceptor increases nitric oxide (NO) production via NO synthase 1 (NOS1), activates protein kinase G and then promotes the increased hydrolysis of cAMP by activation of phosphodiesterases.¹ However, these abnormalities only partly contribute to the alteration of the β -adrenergic pathway.

A complementary mechanism of regulation of cAMP has been recently described, the multi-drug resistance protein 4 (MRP4).^{4, 5} This channel was first described in resistance to chemotherapy as it allows malignant cells to extrude the drug and survive⁶ but further studies revealed its role as transporter of cyclic nucleotides.⁷⁻⁹ In cardiomyocytes and vascular smooth cells, MRP4 is located at the plasma membrane level⁴ and extrudes cAMP.^{4, 6, 9} In vitro inhibition of MRP4 increased intracellular cAMP level and protein kinase A (PKA) activity,⁵ leading to a greater positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation. In mice with genetic deletion of MRP4, an increase in cAMP has been observed in cardiomyocytes after adenylyl cyclase stimulation.⁴ We have recently shown that in senescent heart, MRP4 overexpression contributes to the reduced response to β -adrenoceptor stimulation.¹⁰ However, the involvement of MRP4 in the β -adrenergic dysfunction in the diabetic heart had not yet been studied.

This study tested the hypothesis that an over-expression of MRP4 contributes to the altered response of the β -adrenoceptor stimulation in the diabetic heart.

Materials and Methods

Animals

Experiments were conducted in an authorized laboratory under supervision of an authorized researcher (JA, A-75-20-81). Young adults Wistar male rats (3 months old) have been studied in two groups: healthy rats and diabetic rats (6 weeks after a single intravenous injection of

mg.kg⁻¹ streptozotocin). Animals were purchased from Janvier (Le Genest St Isle, France) and cared according to the *Guiding Principles in the Care and Use of Animals* in a labeled housing place (B-75-13-08) with food and water *ad libitum*. The heart was removed under anesthesia after the measurements of arterial blood pressure and weighed, except for the hearts used for the isolation of cardiomyocytes, in order to shorten the time of ischemia. Then the left ventricle was carefully dissected and frozen in liquid nitrogen for Western Blotting experiments.

Stress Echocardiography

Transthoracic stress echocardiography was performed on anesthetized rats under 1-2% isoflurane using a General Electric Vivid 7 instrument (Aulnay-sous-Bois, France) as previously described.^{1, 3, 10, 11} Systolic function and inotropy were studied with left ventricular shortening (LVSF) and ejection (LVEF) fractions using a modified version of Simpson's analysis on parasternal short-axis and long-axis views in M mode. These variables were measured in basal conditions and under β -adrenergic stimulation using isoproterenol (10 μ g.kg⁻¹.min⁻¹, continuous intravenous administration) with or without intravenous pretreatment with MK571 (30 mg.kg⁻¹, Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) a specific inhibitor of MRP4^{4, 5, 12} or the same volume of NaCl 0.9% as control.¹⁰ Stress values were determined after stabilization of heart rate (HR) 6 min after each drug administration.

Arterial pressure measurements

In vivo, at least two days after the echocardiographic assessment, the rats were anesthetized using pentobarbital (50 mg.kg⁻¹ intraperitoneally) to measure arterial blood pressure. Pressure transducer catheter (size 2F, Millar Micro-tip catheter transducer, model SPR-407; Millar Instruments, Inc, Houston), was introduced into the right carotid artery and connected to a pressure transducer (Gould Electronic, Cleveland, OH). After stabilization, the arterial systolic, mean (MAP) and diastolic pressures were recorded. From the arterial blood pressure tracings, the HR and the maximum positive values of first derivative of arterial pressure (+dP.dt⁻¹) were quantified. The cardiac variables were recorded under baseline conditions and under β -adrenergic stimulation using isoproterenol (10 μ g.kg⁻¹.min⁻¹, continuous intravenous administration through the tail vein) with or without pretreatment with MK571 (6 minutes after an intravenous administration of 30 mg.kg⁻¹ through the

tail vein)^{4, 12} or the same volume of normal saline as a control.¹⁰ Stress values were determined after stabilization of HR.

Measurements of intracellular calcium transient and contractile function in isolated cardiomyocytes

Ventricular cardiomyocytes were isolated from rat hearts removed under intravenous anesthesia (pentobarbital 65 mg.kg⁻¹, intraperitoneally) on a Langendorf apparatus using enzymatic digestion by collagenase A (Roche Diagnostics, Meylan, France) in a HEPES buffer (117mM NaCl, 5.7 mM KCl, 1.5mM KH₂PO₄, 4.4mM NaHCO₃, 1.7 mM MgCl₂, 11.7 mM glucose, 10 mM creatine, 21 mM HEPES and 20 mM taurine, all from Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, Saint-Quentin Fallavier, France) as previously described^{10, 13}. The cells were filtered and washed and calcium was progressively added to reach 0.5 mM. Freshly isolated cardiomyocytes were used in the same day after loading for 20 min at room temperature with Fura2-AM (1μM, Molecular Probes, Invitrogen, Saint-Aubin, France). Contractility and calcium transient of the cardiomyocytes electrically stimulated at 1 Hz and 8 Volts in a room at 25°C were assessed on each cell with a Ionoptix[®] platform (Ionoptix Corporation, Milton, MA).¹⁴ Only ventricular rod-shaped cardiomyocytes with sharp edges were studied. Cardiomyocytes with spontaneous contraction or sarcolemal blebs were avoided. The contractile properties of the cardiac myocytes were analyzed with the IonWizard[®] software (Ionoptix Corporation) from the trace of the sarcomere shortening by peak shortening (PS), time to PS and the maximum shortening velocity (-dL.dt⁻¹) for the shortening phase and time to 90% relengthening (TR90) and the maximum relengthening velocity (+dL.dt⁻¹) for the relengthening phase were recorded. Myocytes were alternatively exposed to a light of 340 and 380 nm by the Fluorescence System Interface with Hyperswitch (Ionoptix Corporation). Fura2-AM is a fluorescent dye whose emission wavelength depends on the calcium concentration and the ratio 340/380 of fluorescence of the Fura2-AM is correlated to the intracellular calcium level.¹⁴ The changes in Fura2-fluorescence intensity (FFI) reflect the variation of the intracellular calcium level during the cardiac cycle, also known as calcium transient. The calcium transient was described in our study by the ΔFFI, amplitude of the FFI increase after twitch (peak FFI-baseline FFI) and the time course of the fluorescence constant decay (tau). The inhibition of MRP4 was provided by a pretreatment with MK571 (10⁻⁷M). The contraction and

fluorescence ratio of the cardiomyocyte were recorded continuously at basal condition and after adjunction of isoproterenol (10⁻⁶ M). Since calibration was not performed, only percent changes with isoproterenol and baseline values of ΔFFI could be compared between groups. Stress values were evaluated at maximal cell contraction. Contraction and fluorescence of 10 representative cells were recorded on each slide and the mean value was used for statistics.

Western Blotting

The left ventricles were removed from anesthetized rats and frozen in liquid nitrogen. The samples were homogenated in a lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% triton, phosphatase and protease-inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich). The protein concentration was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France). After denaturation in Laemmli buffer, 60 μg of total protein extract was loaded in each lane for separation in a SDS 9% PAGE gel and transferred on a nitrocellulose membrane (Hybond, Amersham, GE Healthcare, Velizy, France). After saturation in milk, each membrane was incubated overnight at 4°C with primary antibodies (anti-MRP4 1/200: M4I-80 (Abcam, Paris, France) and anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 1/1500 (ab9485, Abcam)).^{5, 10} The day after, membranes were washed with TBS Tween and incubated with appropriate secondary antibody (anti-rat 1/2500, anti-rabbit 1/2500, all from Cell Signaling, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). Relative quantification of the targeted protein was achieved by fluorescence recording on EthanDIGE reader with an ECL[®] detection system (GE Healthcare, Velizy, France). MRP4 was detected at 150 kDa and GAPDH at 37kDa. MRP4 expression was quantified using Image J software (NIH, Bethesda, MA) and normalized versus GAPDH expression to ensure no variation in protein gel loading.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD. We used absolute values to compare baseline characteristics between healthy and diabetic rats and delta percent changes from baseline to compare the pharmacological effects.^{1, 3, 10, 11, 13, 15, 16} As a matter of fact, SD of delta percent changes represents the variation of the pharmacological effect we are measuring whereas the SD of absolute values mainly reflects inter-individual differences. Moreover, some variables were expected to significantly differ at baseline because we compared healthy and diabetic

rats. The main criteria of our study was sarcomere shortening, especially peak shortening (PS). Means were compared using the Student t test or one-way analysis of variance with post-hoc test Newman-Keuls. All *P* values were two-tailed and a *P* value of less than 0.05 was considered as significant. Statistical analysis was performed using NCSS 7.0 software (Statistical solutions Ltd.).

Results

Baseline characteristics

Baseline characteristics of rats are reported in Table 1. We studied a total of 21 healthy and 21 diabetic rats. As expected diabetic rats had significantly lower body weight and heart weight than healthy rats but the heart to body weight ratio was not significantly different between groups. Diabetic rats exhibited a higher glucose blood level without acidosis.

In vivo using echocardiography, HR in diabetic rats was significantly lower in diabetic than that in healthy rats (Table 1). Both LVEF and LVSF were not significantly different between diabetic and healthy rats. Diastolic function was altered in diabetic rats with a prolonged isovolumic relaxation (27 ± 6 vs. 13 ± 3 sec., $p < 0.05$) without elevation of cardiac filling pressure. During invasive pressure recording, 2 healthy and 5 diabetic rats exhibited ventricular fibrillation or asystole and were excluded from the analysis. At baseline conditions *in vivo*, the HR and the MAP were also significantly lower in diabetic rats (Table 1). *In vitro* the cardiomyocytes from diabetic rats displayed reduced PS and increased time to PS (Table 1).

The inotropic effect of isoproterenol was reduced *in vivo* in diabetic rats with a reduced increase in LVEF and LVSF as compared to healthy rats (Fig. 1). The increase in heart rate was not significantly different between diabetic and healthy rats. *In vitro*, isoproterenol induced a non-significant increase in PS in diabetic cardiomyocytes (Table 2) (Fig. 2). The positive inotropic and lusitropic effect of isoproterenol was reduced in diabetic cells compared to healthy cells with an altered reduction of TPS and a reduced increase in $-dL/dt^{-1}$ and $+dL/dt^{-1}$ (Table 2) (Fig. 2). In diabetic group, calcium transient increase was less important than in healthy group (Fig 3).

Table 1. Characteristics of healthy and diabetic rats.

	Healthy	Diabetic
General characteristics		
(no. of rats)	(n=21)	(n=21)
Body weight (g)	334 ± 10	$199 \pm 10^{\dagger}$
Heart weight (mg)	448 ± 29	$334 \pm 10^{\dagger}$
(no. of rats)	(n=16)	(n=16)
Heart weight/ body weight ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	2.2 ± 0.7	2.1 ± 0.6
Glucose blood level (mM)	10 ± 1	47 ± 7
Bicarbonate blood level (mM)	26 ± 4	24 ± 4
Echocardiography		
(no. of rats)	(n=16)	(n=16)
Heart rate ($\text{beats} \cdot \text{min}^{-1}$)	366 ± 33	$293 \pm 32^{\dagger}$
LV ejection fraction (%)	81 ± 7	81 ± 6
LV shortening fraction (%)	47 ± 6	46 ± 7
Arterial catheterization		
(no. of rats)	(n=10)	(n=7)
HR ($\text{beats} \cdot \text{min}^{-1}$)	420 ± 35	$326 \pm 32^{\dagger}$
Systolic arterial pressure (mmHg)	130 ± 16	115 ± 15
Diastolic arterial pressure (mmHg)	105 ± 12	$89 \pm 14^{\dagger}$
Mean arterial pressure (mmHg)	113 ± 13	$97 \pm 14^{\dagger}$
$+dP/dt^{-1}$ ($\text{mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$)	2680 ± 501	1857 ± 1088
Sarcomere kinetics		
(no. of slides / from no. rats)	(n=15 / 5)	(n=15 / 5)
PS (%)	9.6 ± 2.6	$10.1 \pm 2.1^{\dagger}$
TPS (ms)	116 ± 22	$189 \pm 26^{\dagger}$
$-dL/dt^{-1}$ ($\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$)	-2.9 ± 0.9	-2.3 ± 0.9
$+dL/dt^{-1}$ ($\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$)	2.6 ± 1.2	$2.5 \pm 1.$
TR90 (ms)	284 ± 11	354 ± 60
Calcium transient		
(no. of slides)	(n=15)	(n=15)
ΔFFI (arbitrary units)	84 ± 26	$72 \pm 24^{\ast}$
Tau (ms)	125 ± 16	$186 \pm 39^{\ast}$

Data are mean $\pm$ SD. † : $P < 0.05$ vs Healthy. * : Because calibration was not performed, these values could not be compared between Healthy and Diabetic rats.

Effects of MK 751, a specific inhibitor of MRP4

Administration of saline or MK571 did not significantly modify any hemodynamic variables in the diabetic or healthy groups *in vivo* (Table 2). Nevertheless, in healthy rats during echocardiography, the isoproterenol-induced increase in HR seems to be blunted by MK571 (Table 2), an effect not observed during arterial catheterization (Table 2). We did not test the direct effect of MK571 on sarcomere shortening and calcium transient since isolated cells were incubated with or without MK571. Nevertheless, we did not observe any significant difference in the groups incubated with or without MK571 except for a reduced TPS in diabetic cells with MK571 (Table 2).

Effects of MK571 on β -adrenoceptor stimulation

In vivo, using echocardiography, the positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation was altered in diabetic rats as compared with healthy

rats. Pre-treatment with MK571 restored the positive inotropic effect in the diabetic group to the level observed in healthy rats on echocardiographic as well as invasive pressure parameters (Fig. 1).

Pretreatment with MK571 restored the positive inotropic response of sarcomere shortening in diabetic cardiomyocytes returning to the level observed in healthy cardiomyocytes whereas it had no significant effect in healthy cardiomyocytes (Table 2) (Fig. 2). The increase in calcium transient was not significantly increased in diabetic cardiomyocytes pretreated with MK571 than in non-pretreated diabetic cells ($P=0.70$) (Fig. 3).

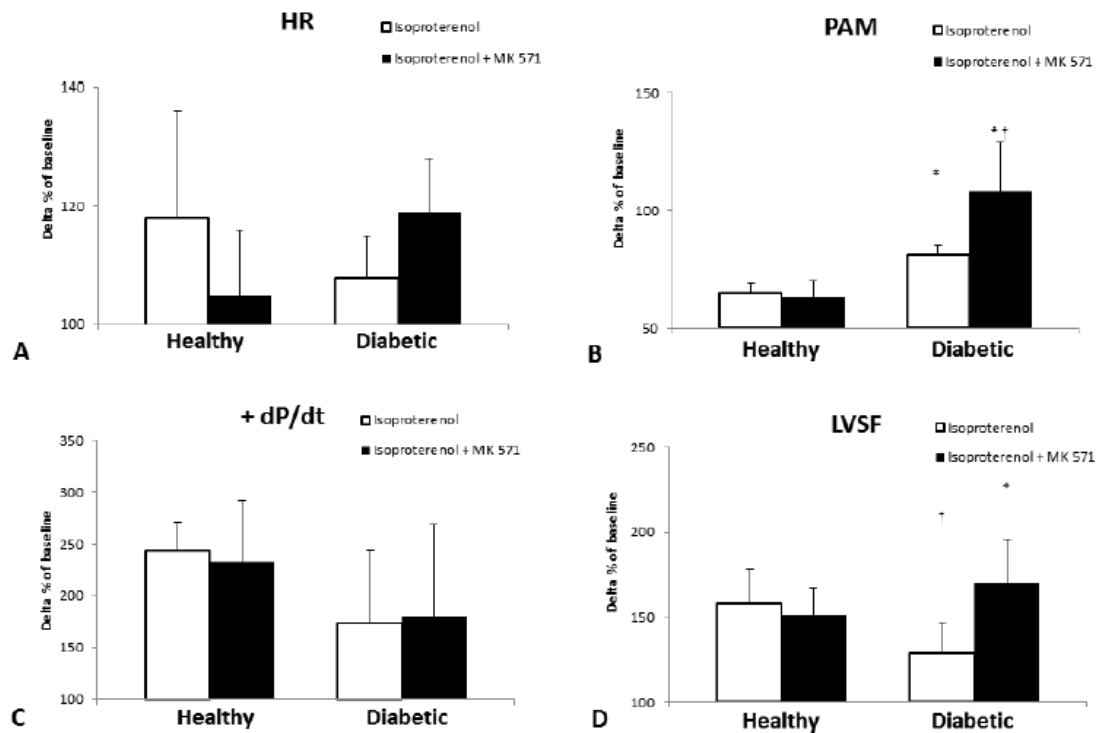


Figure 1. Comparison of the effect of isoproterenol on heart rate (HR, panel A), mean arterial blood pressure (MAP, Panel B), and positive first derivative for maximal rates of arterial pressure development ($+dP/dt$, Panel C), and left ventricular shortening fraction (LVSF, panel D) in healthy and diabetic rats with and without MK 571. HR, MAP, and ($+dP/dt$) were obtained during invasive catheterization ($n=8$ in each group), and LVSF was obtained during echography ($n=8$ in each group). Data are mean $\pm$ SD. *: $P<0.05$ vs group without MK571; †: $P<0.05$ vs Healthy group.

Table 2. Comparison of the Response to Beta-Adrenergic Stimulation in Healthy and Diabetic rats With or Without Pretreatment by MK571.

	Healthy			Healthy with MK571		
	Baseline	Saline	Iso	Baseline	MK571	Iso
Echocardiography (no. of rats)	(n=8)			(n=8)		
Heart rate (beats.min ⁻¹)	361 ± 40	358 ± 20	421 ± 30*	371 ± 28	358 ± 17	387 ± 29
LV ejection fraction (%)	79 ± 9	78 ± 7	96 ± 3*	83 ± 5	87 ± 5*	97 ± 2*
LV shortening fraction (%)	46 ± 6	45 ± 7	72 ± 8*	47 ± 5	53 ± 8*	71 ± 5*
Invasive catheterism (no. of rats)	(n=6)			(n=4)		
HR (beats.min ⁻¹)	440 ± 17	450 ± 33	530 ± 23*	389 ± 33	384 ± 41	525 ± 50*
Mean art pressure (mmHg)	116 ± 15	110 ± 11	61 ± 8*	109 ± 11	107 ± 12	60 ± 8*
+dP.dt ⁻¹ (mmHg.s ⁻¹)	2800±566	2600±860	6733±1115*	2500±383	2933±787	5800±1649*
Sarcomere kinetics (no. of slides)	(n=15 / 5)			(n=15 / 5)		
PS (%)	9.6 ± 2.6	NA	11.3 ± 3.0*	7.9 ± 2.6	NA	13.1 ± 4.3*
TPS (ms)	116 ± 22		107 ± 14	129 ± 29		108 ± 16*
-dL.dt ⁻¹ (mm.s ⁻¹)	-2.9 ± 0.9		-4.9 ± 1.1*	-2.4 ± 0.9		-4.3 ± 1.1*
+ dL.dt ⁻¹ (mm.s ⁻¹)	2.6 ± 1.2		3.6 ± 1.5*	1.9 ± 1.0		3.4 ± 1.1*
TR90 (ms)	284 ± 11		221 ± 54	293 ± 12		217 ± 48*
	Diabetic			Diabetic with MK571		
	Baseline	Saline	Iso	Baseline	MK571	Iso
Echocardiography (no. of rats)	(n=8)			(n=8)		
Heart rate (beats.min ⁻¹)	307 ± 23	310 ± 20	388 ± 54*	274 ± 34	256 ± 26	327 ± 19*†‡
LV ejection fraction (%)	84 ± 5	80 ± 4	90 ± 6*†	81 ± 5	80 ± 3	97 ± 3*†‡
LV shortening fraction (%)	48 ± 7	47 ± 5	63 ± 15*	45 ± 5	44 ± 3	72 ± 9*
Invasive catheterism (no. of rats)	(n=4)			(n=3)		
HR (beats.min ⁻¹)	330 ± 35†	300 ± 49†	405 ± 75*	320 ± 35†	320 ± 34†	480 ± 1*†‡
Mean art pressure (mmHg)	97 ± 12	107 ± 12	70 ± 6*	98 ± 20	100 ± 19	71 ± 16 *
+dP.dt ⁻¹ (mmHg.s ⁻¹)	2500±200	2300±476	2600±1211†	2333±1701	2200±1637	3300±1652
Sarcomere kinetics (no. of slides)	(n=15 / 5)			(n=15 / 5)		
PS (%)	10.1±2.1†	NA	10.7 ± 2.8	9.1 ± 2.0†	NA	12.0±1.9*†‡
TPS (ms)	189 ± 26†		157 ± 17*†	169±30†‡		147 ± 12*†
-dL.dt ⁻¹ (mm.s ⁻¹)	-2.3 ± 0.9		-3.0 ± 1.1*	-2.2 ± 0.6		-3.8 ± 1.1*
+ dL.dt ⁻¹ (mm.s ⁻¹)	2.5 ± 1.0		2.8 ± 1.1	2.3 ± 0.6		3.3 ± 0.6*
TR90 (ms)	354 ± 60		276 ± 34*†	328 ± 70†		256 ± 29*

Data are mean ± SD. *: $P < 0.05$ vs. baseline; †: $P < 0.05$ vs. healthy; ‡: $P < 0.05$ vs. non treated; NA : not applicable, Iso : isoproterenol, Mean art pressure : mean arterial pressure.

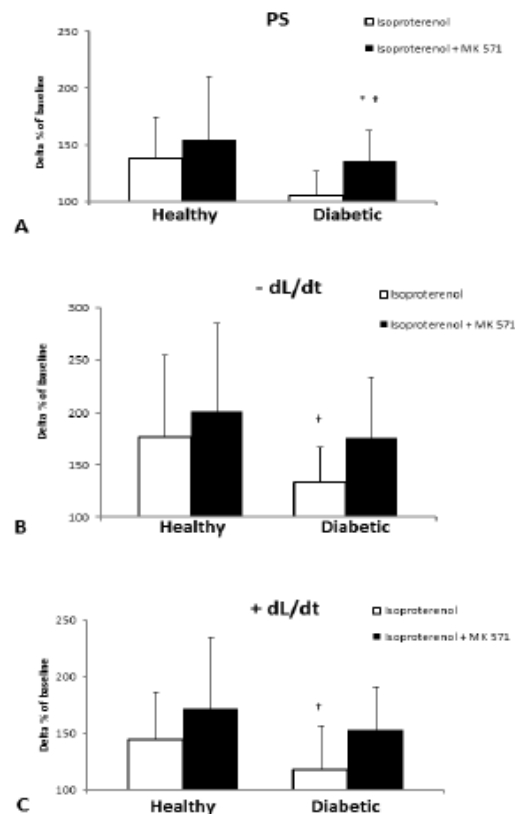


Figure 2. Sarcomere kinetics: comparison of the effect of isoproterenol on the peak shortening amplitude (PS, panel A), maximum velocity of shortening ($-dL/dt$, panel B), and maximum velocity of relengthening ($+dL/dt$, panel C) in healthy and diabetic rats with and without MK571 ($n=15$ cells in each group). Data are mean $\pm$ SD. *: $P<0.05$ vs group without MK571; †: $P<0.05$ vs Healthy group.

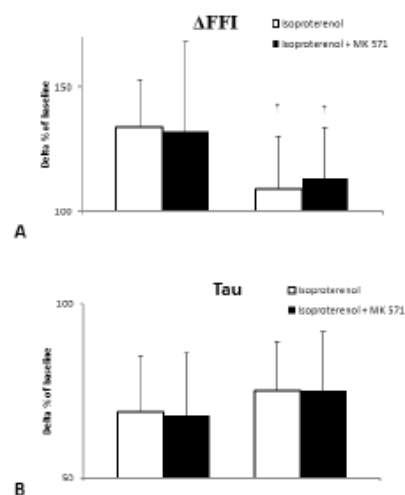


Figure 3. Calcium transient: comparison of the effect of isoproterenol (10^{-6} M) on the amplitude of calcium transient (ΔFFI , panel A) and time decay constant of the calcium transient (τ , panel B) in isolated cardiomyocytes from healthy and diabetic rats with and without MK571 ($n=41$ to 43 cells in each group). Data are mean $\pm$ SD. *: $P<0.05$ vs group without MK571; †: $P<0.05$ vs Healthy group.

Expression of MRP4

In diabetic rats, MRP4 protein expression increased 2.4-fold in comparison to healthy rats ($P=0.045$) (Fig. 4).

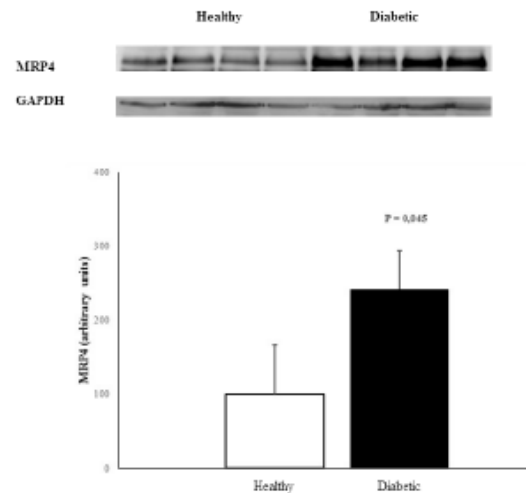


Figure 4: Representative Western blot (Panel A) and normalized densitometric data (Panel B) showing left ventricular expression of MRP4 protein in healthy and diabetic rats ($n=5$ in each group). Data are mean $\pm$ SD.

Discussion

In the current study we confirmed that the positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation is altered in diabetic hearts. We observed that the expression of MRP4 was 2.4 fold increased in left ventricle of diabetic rats and inhibition of MRP4 by MK571 restored the positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation in diabetic rats both *in vivo* and *in vitro*. Consequently these results strongly support the role of MRP4 in the altered β -adrenergic response in the diabetic heart.

In vivo, our results confirm that the basal systolic function was preserved (LVEF and LVSF) in diabetic hearts with diastolic dysfunction, as previously observed.³ *In vitro*, the cardiomyocytes extracted from diabetic rats exhibited an impaired sarcomere shortening with prolonged duration of shortening (TPS) and re-lengthening (TR90) consistent with *in vivo* results and the literature.^{2,4} The positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation was reduced in diabetic rats both *in vivo* and *in vitro*. The diabetic heart displays different mechanisms to preserve itself from an excessive work, such as the reduction of positive chronotropic and inotropic effects of the β -adrenergic stimulation. β -adrenergic dysfunction may contribute to long-term saving of heart function and senescence

adaptation. Unfortunately during critical time, this β -adrenergic dysfunction limits cardiac output adaptation and favors hemodynamic instability in aging patients.³ Although β -blockers have been shown to improve long-term survival in patients with chronic heart failure and may be also beneficial during the perioperative period, deleterious effects have also been clearly demonstrated in the perioperative period when bleeding or postoperative complications occur.¹⁹

Several modifications in the β -adrenergic signaling pathway have been described in the diabetic heart.²⁴ Due to decreased expression of β 1- and β 2-adrenoceptors, less cAMP is produced in the diabetic heart after isoproterenol. The effect of direct stimulation of adenylyl cyclase is also reduced but the effect of a cAMP analog is preserved, confirming the crucial role of intracellular cAMP level in the β -adrenergic response.⁶ β 3-adrenoceptor induces the production of NO by NOS1 that activates protein kinase G which increases the catabolism of cAMP by phosphodiesterase activation.³ An increase in β 3-adrenoceptor expression and activity in the diabetic heart³ contributes to the reduction of the positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation as we also described in the senescent cardiomyopathy.¹¹

The trans-membrane protein MRP4 is known as an effluent pump of cyclic nucleotides in platelets,²⁰ hepatic⁹ and renal cells.²¹ MRP4 is over-expressed in the liver of female aging mice.²² In vascular smooth cells^{8,11,23} and cardiomyocytes,⁷ MRP4 is known to control the efflux of cAMP. In cultured cells, MRP4 could regulate the sub-membrane pool of cAMP by efflux and interaction with phosphodiesterases.¹⁰ We have recently demonstrated that in the senescent heart MRP4 overexpression is responsible for an increased effluent ability for cAMP synthesized after β -adrenoceptor stimulation and strongly impacts the magnitude of the positive inotropic effect of β -adrenergic signaling pathway. In this context, the significant over-expression of MRP4 observed in diabetic rats suggests a similar role of MRP4 in the diabetic cardiomyopathy.

MK571 has been used as a specific inhibitor of MRP4.^{7-8,11,12} The effect of MK571 is rapid and constant after intravenous administration.^{15,24} Inhibition of MRP4 by MK571 induces an elevation in cAMP intracellular concentration in vascular smooth cells^{8,11} and cardiomyocytes.¹² Combined inhibition of MRP4 and phosphodiesterases induces an elevation of cAMP more important than with

isolated inhibition of MRP4 suggesting that the two mechanisms may be additive.¹¹ Inhibition of MRP4 by MK571 enhanced the chronotropic effect of isoproterenol in neonatal mice cardiomyocytes.¹² In our study, MK571 had no or little effect on *in vivo* or *in vitro* contractility before β -adrenergic stimulation. This result is consistent with the fact that MK571 is not a direct agonist of β -adrenoceptors and MRP4 only affects submembrane compartment of cAMP produced after β -adrenergic stimulation.⁷ The elevation of cAMP after isoproterenol stimulation of isolated cardiac myocytes from 9 month-old mice is increased by silencing of MRP4.⁷ In agreement with these results, we demonstrated here that MRP4 inhibition restored the positive inotropic effect of β -adrenoceptors stimulation both *in vivo* and *in vitro* in the diabetic rats. MRP4 may extrude the cAMP produced by β -adrenoceptor stimulation by isoproterenol and may limit the increase in intracellular second messenger concentration. The intracellular calcium level closely reflects the contractility of a muscle as it is directly involved in the actin/myosin interaction and muscle shortening. The β -adrenergic stimulation induces a positive inotropic effect via cAMP production which activates the protein kinase A. Activation of protein kinase A increases calcium transient after phosphorylation of targeted proteins (calcium channel, ryanodine receptor, sarcoplasmic reticulum ATPase and troponin). Since calcium transient was altered in diabetic cardiomyocytes and since we observed an increase in calcium transient amplitude and sarcomere shortening induced by β -adrenergic stimulation after MK571 pre-treatment, we can conclude that MRP4 over-expression plays a role in the altered inotropic response of β -adrenergic stimulation in the diabetic heart.

The following points have to be considered to assess the clinical relevance of our results. First, these experiments were conducted in rats and the results may not be generalized to humans as rat myocardium exhibits several differences with human myocardium, including MRP4 expression and function.²⁵ Further experiments are mandatory to confirm the increased expression and the role of MRP4 in the human diabetic heart. Second, *in vivo* studies require anesthetized animals. We used isoflurane inhalation for echocardiography and pentobarbital for arterial blood pressure recordings. Halogenated agents are known to interfere with β -adrenergic stimulation in different cardiomyopathies^{26,27} but our results are consistent, regardless of the anesthetic technique used. Since the isoproterenol-induced increase in HR seems to be blunted by

MK571 in healthy rats during echography (i.e. with isoflurane) but not during arterial catheterization (i.e. with pentobarbital) we cannot rule out the hypothesis that an interaction between MK571 and baroreflex activity was differentially altered by anesthetics in vivo. Third, *in vitro* experiments may be affected by a selection bias as cardiomyocytes surviving to cell isolation may differ from the more disabled ones present in the total heart. Fourth, we used MK571 to selectively inhibit MRP4. This drug is also an inhibitor of the CysLT1 receptor for leukotrienes D4^{15,28}. The inhibition of CysLT1 and CysLT2 receptors by MK571 could alleviate the negative inotropic effect due to leukotrienes D4 in heart and be confusing in interpretation of our results.^{17,29} We have previously shown that the effect of the MK571 observed in the senescent heart was not related to an action on CysLT1 and CysLT2 receptors. However, we cannot rule out an implication of these receptors in the diabetic heart or the possibility that the *in vivo* effects of MK571 could also be modulated by CysLT1 receptor in vascular smooth muscle.³⁰ Fifth, in a therapeutic view, chronic inhibition of MRP4 may alter other organ function or may be compensated by an increase in phosphodiesterases.

In conclusion, we observed that MRP4 is over-expressed in the heart of diabetic rats and plays an important role in the altered positive inotropic response to β -adrenoceptor stimulation.

Acknowledgement

We thank Dr. David Baker DM, FRCA, (Department of Anesthesiology and Critical Care, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris) for reviewing the manuscript.

References

- Amour J, Loyer X, Le Guen M, Mabrouk N, David JS, Camors E, Carusio N, Vivien B, Andriantsitohaina R, Heymes C and Riou B. Altered contractile response due to increased beta3-adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: the role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology*. 2007;107:452-60.
- Amour J and Kersten JR. Diabetic cardiomyopathy and anesthesia: bench to bedside. *Anesthesiology*. 2008;108:524-30.
- Amour J, Loyer X, Michelet P, Birenbaum A, Riou B and Heymes C. Preservation of the positive lusitropic effect of beta-adrenoceptors stimulation in diabetic cardiomyopathy. *Anesthesia and analgesia*. 2008;107:1130-8.
- Sassi Y, Abi-Gerges A, Fauconnier J, Mougenot N, Reiken S, Haghighi K, Kranias EG, Marks AR, Lacampagne A, Engelhardt S, Hatem SN, Lompre AM and Hulot JS. Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26:1009-17.
- Hara Y, Sassi Y, Guibert C, Gambaryan N, Dorfmueller P, Eddahibi S, Lompre AM, Humbert M and Hulot JS. Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:2888-97.
- Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH and Schuetz JD. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS pharmSci*. 2002;4:E14.
- Xie M, Rich TC, Scheitrum C, Conti M and Richter W. Inactivation of multidrug resistance proteins disrupts both cellular extrusion and intracellular degradation of cAMP. *Molecular pharmacology*. 2011;80:281-93.
- Sellers ZM, Naren AP, Xiang Y and Best PM. MRP4 and CFTR in the regulation of cAMP and beta-adrenergic contraction in cardiac myocytes. *European journal of pharmacology*. 2012;681:80-7.
- Sassi Y, Lipskaia L, Vandecasteele G, Nikolaev VO, Hatem SN, Cohen Aubart F, Russel FG, Mougenot N, Vrignaud C, Lechat P, Lompre AM and Hulot JS. Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118:2747-57.
- Carillion A, Feldman S, Jiang C, Atassi F, Na N, Mougenot N, Besse S, Hulot JS, Riou B and Amour J. Overexpression of cyclic adenosine monophosphate effluent protein MRP4 induces an altered response to beta-adrenergic stimulation in the senescent rat heart. *Anesthesiology*. 2015;122:334-42.
- Birenbaum A, Tesse A, Loyer X, Michelet P, Andriantsitohaina R, Heymes C, Riou B and Amour J. Involvement of beta 3-adrenoceptor in altered beta-adrenergic response in senescent heart: role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology*. 2008;109:1045-53.
- Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Epstein CJ, Laroux S and Granger DN. Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. *The American journal of physiology*. 1997;273:G1326-32.
- Biais M, Jouffroy R, Carillion A, Feldman S, Jobart-Malfait A, Riou B and Amour J. Interaction of metabolic and respiratory acidosis with alpha and beta-adrenoceptor stimulation in rat myocardium. *Anesthesiology*. 2012;117:1212-22.
- Ren J. Attenuated cardiac contractile responsiveness to insulin-like growth factor I in ventricular myocytes from biobreeding spontaneous diabetic rats. *Cardiovascular research*. 2000;46:162-71.
- Vivien B, David JS, Hanouz JL, Amour J, Lecarpentier Y, Coriat P and Riou B. The paradoxical positive inotropic effect of sevoflurane in healthy and

cardiomyopathic hamsters. *Anesthesia and analgesia*. 2002;95:31-8, table of contents.

16. Amour J, David JS, Vivien B, Coriat P and Riou B. Interaction of halogenated anesthetics with alpha- and beta-adrenoceptor stimulations in diabetic rat myocardium. *Anesthesiology*. 2004;101:1145-52.

CRITIQUES ET LIMITES DES METHODES

L'interprétation de nos résultats doit prendre en compte certaines limites des modèles et techniques utilisés.

1. Modèles animaux

1.1 Espèce animale

Tout d'abord, les expérimentations ont été conduites sur des rats et les résultats demandent à être confirmés chez l'homme. Les rongeurs sont très utilisés dans les études cardiovasculaires car ils sont résistants au développement de l'athérosclérose et permettent une étude des effets propres de l'âge, du diabète ou du syndrome métabolique sur le cœur sans pathologie coronaire interférente comme souvent chez l'humain. Par ailleurs beaucoup de traits communs ont été mis en évidence entre les modèles de rongeurs et le diabète humain au niveau du cœur: hypertrophie ventriculaire gauche, dysfonction diastolique, augmentation du captage et de l'utilisation des acides gras, diminution de l'efficacité énergétique, défaut du métabolisme mitochondrial, augmentation du stockage des acides gras dans le myocarde, altération du recaptage du calcium. Les expérimentations ont ainsi été principalement menées chez des rats Wistar qui sont bien adaptés aux techniques employées (faible coût, taille suffisante pour une étude des muscles papillaires et un isolement des cardiomyocytes). Les différences entre myocarde de rat et le myocarde humain doivent rester présentes à l'esprit (fréquence cardiaque de base à 250-300 battements par minute, modifications de la relation force-fréquence et du potentiel d'action, rôle prédominant du réticulum sarcoplasmique par rapport à l'échangeur NCX, prédominance de l'expression de l'isoforme V1 de la myosine).

Un problème d'interaction entre le contexte physiopathologique ou les traitements étudiés et le fond génétique peut également exister et altérer la transposabilité de nos résultats chez l'homme.

1.2 Modèles de cardiopathie

Les rats sénescents utilisés sont des Wistar âgés de 24 mois. Leur âge correspond à 80 ans pour un sujet humain. Ils présentent une fonction systolique normale avec une dysfonction diastolique⁸ comme décrite chez les sujets humains. Ils sont les survivants de leur cohorte, élevés en animalerie spécialisée jusqu'à cet âge.

Les rats Zucker sont porteurs d'une mutation génétique sur le récepteur de la leptine appelée « fa » qui le rend non fonctionnel et induit une obésité, une hypertension artérielle modérée, une dyslipémie et constituent un modèle robuste de syndrome métabolique sans dysfonction cardiaque.^{101, 104} L'existence d'une sous-population d'animaux diabétiques par un défaut de transcription pancréatique des cellules β permet de comparer les effets de l'obésité associée ou non au diabète de type 2.¹⁰⁴ Les rats Zucker obèses diabétiques ne présentent pas d'hypertension artérielle et une dysfonction diastolique modérée par rapport aux rats Zucker non diabétiques.

Le modèle de cardiopathie diabétique induite chez le rat par la streptozotocine utilisé ici est l'un des plus étudiés dans la littérature.^{2, 3, 113, 114} La streptozotocine détruit les îlots de Langerhans responsables de la synthèse d'insuline. Il s'agit donc d'un modèle de diabète de type 1. Un délai de 6 semaines permet l'installation de la cardiopathie avec une fonction systolique préservée, une dysfonction diastolique et une altération de la réponse β -adrénergique.^{2, 3} Les altérations constatées sont comparables à celle des sujets humains diabétiques de type 2 même si le mécanisme sous-jacent est une privation et non une

résistance à l'insuline. Toutefois, le mécanisme exact d'action de la streptozotocine n'est pas complètement expliqué et la molécule présente des effets génotoxiques directs divers : formation d'ADN double brin, d'adduits d'ADN, anomalies chromosomiques, induction ou inhibition d'expression génique, échanges chromatiques, mutagénèse, apoptose et mort cellulaire. Ces altérations ont surtout été étudiées dans contexte d'utilisation humaine de la streptozotocine comme anti-néoplasique mais des perturbations existent aux doses habituellement utilisées dans la création du diabète (25 à 150mg.kg⁻¹ en administration unique). Les lésions de l'ADN sont visibles jusqu'à 20 jours après l'injection et une augmentation des tumeurs a été objectivée dans les modèles animaux de diabète induits par la streptozotocine.¹¹⁵ Des effets directs de la streptozotocine sur la contractilité des cardiomyocytes ne sont pas non plus complètement exclus. L'exposition aiguë in-vitro de cardiomyocytes à la streptozotocine induit une production d'espèces réactives de l'oxygène, une diminution de l'amplitude du raccourcissement des sarcomères et des mouvements calciques et une augmentation du temps de relaxation.¹¹⁶

2. Evaluation de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques *in vivo*

L'évaluation *in vivo* de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques est soumise à plusieurs limites d'interprétation.

Les mesures *in vivo* nécessitent des animaux compliant à l'examen et sont donc effectués sous anesthésie générale. Différentes interactions entre la fonction cardiaque et les médicaments d'anesthésie ont été décrits, en particulier une interférence entre les agents halogénés et la réponse inotrope et lusitrope à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques.¹¹³ Cette technique reste cependant largement employée pour les évaluations par échocardiographie.^{2, 3, 21, 42} Nos résultats sont concordants avec les mesures de pression

invasive effectuées sous pentobarbital ce qui suggère une interférence limitée des anesthésiques dans nos résultats.

In vivo, la contractilité cardiaque est influencée par de nombreux facteurs (retour veineux, post-charge, système nerveux autonome, mécanismes neuro-humoraux, circulation coronaire,...) en plus du contexte physiopathologique ou du traitement étudié qui peuvent moduler nos résultats. Les conditions d'examen ont été standardisées au maximum pour limiter ces facteurs confondants.

Concernant les techniques d'évaluation elles-mêmes, l'échocardiographie est un outil fondamental dans l'évaluation de la fonction cardiaque en recherche comme en thérapeutique. Même si toutes les mesures ont été réalisées par le même opérateur formé et entraîné, l'examen reste opérateur-dépendant. La mesure de pression invasive est un outil complémentaire avec des paramètres dérivés reflétant la contractilité cardiaque. Elle n'a cependant pas pu être réalisée chez une partie des animaux qui ont présenté une mauvaise tolérance au cathétérisme (fibrillation ventriculaire, hypotension artérielle profonde). Il est possible que les sujets les plus atteints ne soient ainsi pas représentés dans nos résultats.

3. Evaluation de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques *in vitro*

L'interprétation des analyses *ex vivo* et *in vitro* est elle aussi soumise à plusieurs limites. Par nature, seule la contractilité intrinsèque du muscle ou du cardiomyocyte est évaluée indépendamment des facteurs modulateurs mis en jeu *in vivo*.

Le modèle d'étude du muscle papillaire *ex vivo* étudie la performance d'un muscle entier plongé dans un milieu de Krebs-Henseleit oxygéné à 29°C et soumis à une stimulation à basse fréquence (12/min). La température comme la fréquence de contraction modifient la

contractilité musculaire mais ce protocole permet une contraction et une relaxation stables dans la durée et d'assurer que les modifications observées sont le reflet des traitements pharmacologiques appliqués et non d'une ischémie ou d'une fatigue musculaire.

L'analyse des cardiomyocytes *in vitro* comporte un biais de sélection par l'étude des cellules survivantes à la procédure d'isolement, non représentatives de l'ensemble des cardiomyocytes du ventricule complet si les cellules les plus atteintes par la pathologie sont mortes. La sélection des cellules analysées a suivi des critères pré-établis pour limiter les biais de sélection : bonne viabilité de la cellule isolée, sarcomères bien déterminés, absence de myoclonies spontanées. Ces phénomènes étaient plus fréquemment observés parmi les cardiomyocytes isolés issus des animaux diabétiques ou sénescents sont plus fragiles que ceux issus des animaux sains et jeunes.

Les effets de la stimulation β -adrénergique *ex vivo* comme *in vitro* ont été évalués dans un milieu à concentration calcique extracellulaire infraclinique de 0,5mM. En effet, la contractilité musculaire est quasi maximale chez le rat à 2,5mM et l'effet inotrope est difficile à mettre en évidence. Cette technique est validée dans de nombreux articles.^{2, 3, 113}

Enfin la composition du milieu d'analyse était constante, indépendamment du modèle étudié. La concentration en glucose était inchangée en particulier dans les groupes diabétiques.

4. Inhibition de MRP4 par MK571

L'inhibition de MRP4 a été réalisée par un agent pharmacologique, le MK571. Cette molécule peut inhiber aussi le récepteur CysLT1 des leucotriènes D4.^{108, 117} Nous avons montré que l'effet du MK571 sur la réponse β -adrénergique dans la cardiopathie sénescence

n'était pas lié à l'inhibition des récepteurs au CysLT1. De même, le MK571 inhibe la Multi-Drug Resistance Protein 1 (MRP1) qui est impliquée dans la biosynthèse des leucotriènes et l'ischémie-reperfusion par l'efflux du glutathion et de ses conjugués.¹¹⁸ Même si MRP4 a été montré comme étant le type de MRP prédominant au niveau de la membrane plasmique des cardiomyocytes,²¹ un effet de l'inhibition de MRP1 ne peut être exclu de l'interprétation de nos résultats.

5. Analyses d'expression génomique et protéique

Les analyses d'expression génomique par puce Illumina et d'expression protéique par Western Blot ont été réalisées à partir d'échantillons de ventricules gauches. D'autres types cellulaires tels que des fibroblastes ou des cellules endothéliales sont présents dans les échantillons, en faible quantité par rapport aux cardiomyocytes dans les cœurs sains. Une plus forte proportion de ces autres types cellulaires dans les cœurs sénescents ou diabétiques pourrait fausser les résultats d'expression protéique. Toutefois, l'importance des variations d'expression protéique observée dans nos études est trop importante pour être liée à ce phénomène. L'étude de l'expression protéique sur cardiomyocytes isolés pourrait éliminer ce doute mais elle est difficile à cause de la dégradation protéique lors de la procédure d'extraction sur des cellules fragilisées par l'isolement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans ce travail nous ont permis d'avancer dans la compréhension de la réponse β -adrénergique et de ses dysfonctions dans plusieurs contextes pathologiques. Nous avons confirmé à l'échelle du cardiomyocyte la dysfonction β -adrénergique dans la cardiopathie sénescence et diabétique. Nous avons pu mettre en évidence une diminution de la réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques chez l'obèse diabétique de type 2 mais qui reste modérée par rapport à celle observée lors du diabète de type 1. Ces résultats fonctionnels sont expliqués par la diminution d'expression des récepteurs β 1- et β 2-adrénergiques en l'absence de surexpression du récepteur β 3-adrénergique comme observée dans le diabète de type 1. Le poids relatif de la signalisation des récepteurs β 1- et β 3-adrénergiques pourrait être mis en évidence par l'étude de la phosphorylation de VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotéine).⁴²

Pour approfondir les mécanismes et les implications cliniques de la dysfonction β -adrénergique chez les diabétiques, nous avons étudié l'effet d'un traitement par atorvastatine. Les statines ont montré des propriétés bien supérieures à la simple du cholestérol appelées effets « pléiotropes » et sont largement prescrites aux patients diabétiques. Nous avons pu montrer que l'atorvastatine restaurait l'effet inotrope positif en corrigeant l'expression du récepteur β 1-adrénergique, corrigeant partiellement le ratio récepteur β 1/ β 3-adrénergique. Nous avons pu montrer qu'une partie de l'effet bénéfique de l'atorvastatine passe par la voie de la nitrite oxyde synthase. De façon intéressante, le traitement par atorvastatine a corrigé la surexpression de MRP4 observée chez les diabétiques. Cela nous a ouvert une nouvelle voie vers l'étude de cette protéine.

L'hypothèse de l'implication de MRP4 dans la dysfonction β -adrénergique a été confirmée au cours de la sénescence et au cours du diabète de type 1. Nous avons pu mettre

en évidence une nette surexpression de ce canal effluent de l'AMPc et montré que son inhibition restaurait *in vivo* comme *in vitro* la réponse inotrope positive à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques. Toutefois, son expression était normale dans l'obésité associée ou non au diabète ce qui suggère un rôle minime de MRP4 dans ce contexte pathologique. La dysfonction β -adrénergique modérée qui existe dans le syndrome métabolique semble plus liée à la modification de la balance entre l'expression et l'activité des β_1/β_3 -adrénergiques. Ces résultats suggèrent que MRP4 entrerait en jeu seulement lors des altérations profondes de la signalisation β -adrénergique comme dans la sénescence ou le diabète induit par la streptozotocine.

Aucune donnée n'est pour l'instant disponible sur la régulation de l'expression de MRP4 dans le cœur. Dans le foie, AhR (aryl hydrocarbon receptor) et Nrf2 (ou NFE2L2, nuclear factor E2-related factor 2) sont deux facteurs de transcription augmentant l'expression de MPR4 en réponse à un stress oxydant. (Xu 2010 Am J GI Liv Physiol) Un niveau de stress oxydant plus important dans les cardiomyocytes lors de la sénescence ou du diabète induit par la streptozotocine pourrait expliquer une partie des différences d'expression de MPR4 constatés.

Nos résultats reposent sur une inhibition pharmacologique de MRP4 et pourraient être confirmés par une inhibition de l'activité de MRP4 par interférence ARN avec un vecteur de type AAV (adéno-associated virus). Nous n'avons pas investigué la place de l'extrusion de l'AMPc par MRP4 par rapport à sa destruction par les phosphodiesterases et l'interaction entre ces voies et cette question mériterait des études complémentaires. Un effet additif de l'inhibition de MRP4 et des phosphodiesterases a en effet été décrit²¹ et pourrait également exister dans les cœurs sénescents ou diabétiques. L'impact de l'inhibition chronique de MRP4 reste également à étudier et en particulier une éventuelle compensation par une augmentation de l'activité des phosphodiesterases.

Le maintien d'un état hémodynamique et d'un débit cardiaque suffisants pour la perfusion tissulaire est l'une des principales préoccupations en réanimation comme en péri-opératoire de chirurgie lourde. En complément du remplissage vasculaire, le recours aux catécholamines est fréquent mais la réponse interindividuelle variable. Peu d'études cliniques ont cherché à faire le lien entre cette variabilité et les caractéristiques des patients. Dans une étude récente, Bauman et al. ont montré l'impact d'une différence ethnique sur la réponse aux vasopresseurs dans le choc septique mais sans prendre en compte la nette différence de proportion de sujets diabétiques entre les deux groupes (68% dans le groupe « afro-américain » versus 32% dans le groupe « blanc »).¹¹⁹ Les travaux expérimentaux ont souligné le rôle de l'âge, du diabète ou de l'obésité sur la réponse à la stimulation β -adrénergique.^{2, 3, 8, 120} Des études cliniques spécifiques de ces sujets âgés, diabétiques ou obèses qui sont de plus en plus nombreux en réanimation ou au bloc opératoire sont souhaitables. Même si cela reste à confirmer chez l'humain, nos résultats suggèrent que l'inhibition de MRP4 pourrait devenir une thérapeutique adjuvante dans l'insuffisance cardiaque aiguë avec faible réponse aux catécholamines avant de recourir à l'assistance circulatoire mécanique.

REFERENCES

1. Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*. 2003;107:490-7.
2. Amour J, Loyer X, Le Guen M, Mabrouk N, David JS, Camors E, Carusio N, Vivien B, Andriantsitohaina R, Heymes C and Riou B. Altered contractile response due to increased beta3-adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: the role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology*. 2007;107:452-60.
3. Amour J, Loyer X, Michelet P, Birenbaum A, Riou B and Heymes C. Preservation of the positive lusitropic effect of beta-adrenoceptors stimulation in diabetic cardiomyopathy. *Anesth Analg*. 2008;107:1130-8.
4. Amour J and Kersten JR. Diabetic cardiomyopathy and anesthesia: bench to bedside. *Anesthesiology*. 2008;108:524-30.
5. Lymperopoulos A. Physiology and pharmacology of the cardiovascular adrenergic system. *Front Physiol*. 2013;4:240.
6. Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ res*. 2009;105:784-92.
7. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG and Cheng H. Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:358-65.
8. Birenbaum A, Tesse A, Loyer X, Michelet P, Andriantsitohaina R, Heymes C, Riou B and Amour J. Involvement of beta 3-adrenoceptor in altered beta-adrenergic response in senescent heart: role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology*. 2008;109:1045-53.
9. Brodde OE, Bruck H and Leineweber K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci*. 2006;100:323-37.
10. Rozec B and Gauthier C. beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther*. 2006;111:652-73.
11. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S and et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*. 1986;59:297-309.
12. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C and Balligand JL. Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*. 2001;103:1649-55.
13. Zaugg M and Schaub MC. Beta3-adrenergic receptor subtype signaling in senescent heart: nitric oxide intoxication or "endogenous" beta blockade for protection? *Anesthesiology*. 2008;109:956-9.
14. Strosberg AD. Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1997;37:421-50.
15. Davis HM and Johnson JA. Heart failure pharmacogenetics: past, present, and future. *Curr Cardiol Rep*. 2011;13:175-84.
16. McLean RC, Baird SW, Becker LC, Townsend SN, Gerstenblith G, Kass DA, Tomaselli GF and Schulman SP. Response to catecholamine stimulation of polymorphisms of the beta-1 and beta-2 adrenergic receptors. *American J Cardiol*. 2012;110:1001-7.
17. Muthumala A, Drenos F, Elliott PM and Humphries SE. Role of beta adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail*. 2008;10:3-13.
18. Lohse MJ, Engelhardt S and Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*. 2003;93:896-906.

19. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.
20. Tilley DG. G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. *Circ Res*. 2011;109:217-30.
21. Sassi Y, Abi-Gerges A, Fauconnier J, Mougenot N, Reiken S, Haghighi K, Kranias EG, Marks AR, Lacampagne A, Engelhardt S, Hatem SN, Lompre AM and Hulot JS. Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J*. 2012;26:1009-17.
22. Janczewski AM and Lakatta EG. Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) cycling in systolic and diastolic heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev*. 2010;15:431-45.
23. Himeno Y, Sarai N, Matsuoka S and Noma A. Ionic mechanisms underlying the positive chronotropy induced by beta1-adrenergic stimulation in guinea pig sinoatrial node cells: a simulation study. *J Physiol Sci*. 2008;58:53-65.
24. Yang JH and Saucerman JJ. Computational models reduce complexity and accelerate insight into cardiac signaling networks. *Circ Res*. 2011;108:85-97.
25. Ho D, Yan L, Iwatsubo K, Vatner DE and Vatner SF. Modulation of beta-adrenergic receptor signaling in heart failure and longevity: targeting adenylyl cyclase type 5. *Heart Fail Rev*. 2010;15:495-512.
26. Wachter SB and Gilbert EM. Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology*. 2012;122:104-12.
27. Yang J, Liu Y, Fan X, Li Z and Cheng Y. A pathway and network review on beta-adrenoceptor signaling and beta blockers in cardiac remodeling. *Heart Fail Rev*. 2014;19:799-814.
28. Woo AY and Xiao RP. beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33:335-41.
29. Perez-Schindler J, Philp A, Baar K and Hernandez-Cascales J. Regulation of contractility and metabolic signaling by the beta2-adrenergic receptor in rat ventricular muscle. *Life Sci*. 2011;88:892-7.
30. Zhang W, Yano N, Deng M, Mao Q, Shaw SK and Tseng YT. beta-Adrenergic receptor-PI3K signaling crosstalk in mouse heart: elucidation of immediate downstream signaling cascades. *PLoS one*. 2011;6:e26581.
31. Dorn GW 2nd and Brown JH. Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation. *Trends Cardiovasc Med*. 1999;9:26-34.
32. Lee DI and Kass DA. Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. *Physiology (Bethesda)*. 2012;27:248-58.
33. Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H and Chen SR. Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochemical J*. 2006;396:7-16.
34. Zaccolo M and Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*. 2002;295:1711-5.
35. Iancu RV, Ramamurthy G, Warriar S, Nikolaev VO, Lohse MJ, Jones SW and Harvey RD. Cytoplasmic cAMP concentrations in intact cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295:C414-22.
36. Heijman J, Volders PG, Westra RL and Rudy Y. Local control of beta-adrenergic stimulation: Effects on ventricular myocyte electrophysiology and Ca(2+)-transient. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:863-71.
37. Macdougall DA, Agarwal SR, Stopford EA, Chu H, Collins JA, Longster AL, Colyer J, Harvey RD and Calaghan S. Caveolae compartmentalise beta2-adrenoceptor signals by curtailing cAMP production and maintaining phosphatase activity in the sarcoplasmic reticulum of the adult ventricular myocyte. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:388-400.
38. Harvey RD and Calaghan SC. Caveolae create local signalling domains through their distinct protein content, lipid profile and morphology. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:366-75.

39. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J and Vandecasteele G. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circul Res*. 2006;99:816-28.
40. Sellers ZM, Naren AP, Xiang Y and Best PM. MRP4 and CFTR in the regulation of cAMP and beta-adrenergic contraction in cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol*. 2012;681:80-7.
41. Sassi Y, Lipskaia L, Vandecasteele G, Nikolaev VO, Hatem SN, Cohen Aubart F, Russel FG, Mougenot N, Vrignaud C, Lechat P, Lompre AM and Hulot JS. Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest*. 2008;118:2747-57.
42. Hara Y, Sassi Y, Guibert C, Gambaryan N, Dorfmüller P, Eddahibi S, Lompre AM, Humbert M and Hulot JS. Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2888-97.
43. Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH and Schuetz JD. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci*. 2002;4:E14.
44. Leggas M, Adachi M, Scheffer GL, Sun D, Wielinga P, Du G, Mercer KE, Zhuang Y, Panetta JC, Johnston B, Scheper RJ, Stewart CF and Schuetz JD. Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol*. 2004;24:7612-21.
45. Xie M, Rich TC, Scheitrum C, Conti M and Richter W. Inactivation of multidrug resistance proteins disrupts both cellular extrusion and intracellular degradation of cAMP. *Mol Pharmacol*. 2011;80:281-93.
46. Abula N, Chinn LW, Nakamura T, Liu L, Huang CC, Johns SJ, Kawamoto M, Stryke D, Taylor TR, Ferrin TE, Giacomini KM and Kroetz DL. The human multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4): functional analysis of a highly polymorphic gene. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;325:859-68.
47. Deeley RG, Westlake C and Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev*. 2006;86:849-99.
48. Li C, Krishnamurthy PC, Penmatsa H, Marrs KL, Wang XQ, Zaccolo M, Jalink K, Li M, Nelson DJ, Schuetz JD and Naren AP. Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell*. 2007;131:940-51.
49. Borst P, de Wolf C and van de Wetering K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch*. 2007;453:661-73.
50. Xu S, Weerachayaphorn J, Cai SY, Soroka CJ and Boyer JL. Aryl hydrocarbon receptor and NF-E2-related factor 2 are key regulators of human MRP4 expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G126-35.
51. Hayashi H, Naoi S, Nakagawa T, Nishikawa T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Kondo A, Kubo K, Yabuki T, Hattori A, Hirouchi M and Sugiyama Y. Sorting nexin 27 interacts with multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) and mediates internalization of MRP4. *J Biol Chem*. 2012;287:15054-65.
52. Jedlitschky G, Cattaneo M, Lubenow LE, Roskopf D, Lecchi A, Artoni A, Motta G, Niessen J, Kroemer HK and Greinacher A. Role of MRP4 (ABCC4) in platelet adenine nucleotide-storage: evidence from patients with delta-storage pool deficiencies. *Am J Pathol*. 2010;176:1097-103.
53. Copsel S, Garcia C, Diez F, Vermeulen M, Baldi A, Bianciotti LG, Russel FG, Shayo C and Davio C. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*. 2011;286:6979-88.
54. Wielinga PR, van der Heijden I, Reid G, Beijnen JH, Wijnholds J and Borst P. Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J Biol Chem*. 2003;278:17664-71.
55. Mutsaers HA, van den Heuvel LP, Ringens LH, Dankers AC, Russel FG, Wetzels JF, Hoenderop JG and Masereeuw R. Uremic toxins inhibit transport by breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 4 at clinically relevant concentrations. *PLoS one*. 2011;6:e18438.
56. Sassi Y, El Haou S, Fauconnier J, Mougenot N, Fromes Y, Lacampagne A, Marks AR, Borst P, Hatem S, Lompre A-M and J-S. H. MRP4 Acts in Balance With Phosphodiesterases to Regulate cAMP-dependent Signalling Pathway in Cardiac Myocytes. *Circulation*. 2009;120:S758 (abstract).

57. Cheng Q, Aleksunes LM, Manautou JE, Cherrington NJ, Scheffer GL, Yamasaki H and Slitt AL. Drug-metabolizing enzyme and transporter expression in a mouse model of diabetes and obesity. *Mol Pharm.* 2008;5:77-91.
58. Yacovino LL and Aleksunes LM. Renal efflux transporter expression in pregnant mice with Type I diabetes. *Toxicol Lett.* 2012;211:304-11.
59. Dimmeler S and Nicotera P. MicroRNAs in age-related diseases. *EMBO Mol Med.* 2013;5:180-90.
60. Cowling RT. The aging heart, endothelin-1 and the senescent cardiac fibroblast. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;81:12-4.
61. Jugdutt BI. Prevention of heart failure in the elderly: when, where and how to begin? *Heart Fail Rev.* 2012;17:531-44.
62. Karavidas A, Lazaros G, Tsiachris D and Pyrgakis V. Aging and the cardiovascular system. *Hellenic J Cardiol.* 2010;51:421-7.
63. Fyhrquist F, Saijonmaa O and Strandberg T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2013;10:274-83.
64. Jugdutt BI. The continuing saga of aging and heart failure. *Heart Fail Rev.* 2012;17:529-30.
65. Brunet A and Berger SL. Epigenetics of aging and aging-related disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014;69 Suppl 1:S17-20.
66. Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, Treguer K, Carmona G, Bonauer A, Horrevoets AJ, Didier N, Girmatsion Z, Biliczki P, Ehrlich JR, Katus HA, Muller OJ, Potente M, Zeiher AM, Hermeking H and Dimmeler S. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature.* 2013;495:107-10.
67. Dorn GW, 2nd. miR-34a and the cardiomyopathy of senescence: SALT PNUTS, SALT PNUTS! *Cell Metab.* 2013;17:629-30.
68. Muslin AJ. New insights into cardiac aging. *Circulation.* 2009;120:1654-6.
69. Hua Y, Zhang Y, Ceylan-Isik AF, Wold LE, Nunn JM and Ren J. Chronic Akt activation accentuates aging-induced cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. *Basic Res Cardiol.* 2011;106:1173-91.
70. Mitov MI, Holbrook AM and Campbell KS. Myocardial short-range force responses increase with age in F344 rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:39-46.
71. Inuzuka Y, Okuda J, Kawashima T, Kato T, Niizuma S, Tamaki Y, Iwanaga Y, Yoshida Y, Kosugi R, Watanabe-Maeda K, Machida Y, Tsuji S, Aburatani H, Izumi T, Kita T and Shioi T. Suppression of phosphoinositide 3-kinase prevents cardiac aging in mice. *Circulation.* 2009;120:1695-703.
72. Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A and Hajjar RJ. Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Circulation.* 2000;101:790-6.
73. Guo KK and Ren J. Cardiac overexpression of alcohol dehydrogenase (ADH) alleviates aging-associated cardiomyocyte contractile dysfunction: role of intracellular Ca²⁺ cycling proteins. *Aging cell.* 2006;5:259-65.
74. Huq F, Lebeche D, Iyer V, Liao R and Hajjar RJ. Gene transfer of parvalbumin improves diastolic dysfunction in senescent myocytes. *Circulation.* 2004;109:2780-5.
75. Jahangir A, Sagar S and Terzic A. Aging and cardioprotection. *J Applied Physiol.* 2007;103:2120-8.
76. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Jr., Mahoney DW, Bailey KR and Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA.* 2003;289:194-202.
77. Xiao RP, Spurgeon HA, O'Connor F and Lakatta EG. Age-associated changes in beta-adrenergic modulation on rat cardiac excitation-contraction coupling. *J Clin Invest.* 1994;94:2051-9.
78. Boluyt MO, Converso K, Hwang HS, Mikkor A and Russell MW. Echocardiographic assessment of age-associated changes in systolic and diastolic function of the female F344 rat heart. *J Applied Physiol.* 2004;96:822-8.

79. Wang ZV and Hill JA. Diabetic cardiomyopathy: catabolism driving metabolism. *Circulation*. 2015;131:771-3.
80. Brodde OE and Leineweber K. Autonomic receptor systems in the failing and aging human heart: similarities and differences. *Eur J Pharmacol*. 2004;500:167-76.
81. Lieber SC, Qiu H, Chen L, Shen YT, Hong C, Hunter WC, Aubry N, Vatner SF and Vatner DE. Cardiac dysfunction in aging conscious rats: altered cardiac cytoskeletal proteins as a potential mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H860-6.
82. Stratton JR, Cerqueira MD, Schwartz RS, Levy WC, Veith RC, Kahn SE and Abrass IB. Differences in cardiovascular responses to isoproterenol in relation to age and exercise training in healthy men. *Circulation*. 1992;86:504-12.
83. Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Ji X, Boluyt MO, Cheng H, Lakatta EG and Koch WJ. Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest*. 1998;101:1273-82.
84. Fu ZD, Csanaky IL and Klaassen CD. Effects of aging on mRNA profiles for drug-metabolizing enzymes and transporters in livers of male and female mice. *Drug Metab Dispos*. 2012;40:1216-25.
85. Stolen TO, Hoydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, Larsen T, Rolim N, Condorelli G, Smith GL and Wisloff U. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2009;105:527-36.
86. Miki T, Yuda S, Kouzu H and Miura T. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev*. 2013;18:149-66.
87. Ernande L, Bergerot C, Rietzschel ER, De Buyzere ML, Thibault H, Pignonblanc PG, Croisille P, Ovize M, Groisne L, Moulin P, Gillebert TC and Derumeaux G. Diastolic dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: is it really the first marker of diabetic cardiomyopathy? *J Am Soc Echocardiogr*. 2011;24:1268-1275 e1.
88. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW and Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol*. 1972;30:595-602.
89. Sharma V and McNeill JH. Parallel effects of beta-adrenoceptor blockade on cardiac function and fatty acid oxidation in the diabetic heart: Confronting the maze. *World J Cardiol*. 2011;3:281-302.
90. Boudina S and Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 2007;115:3213-23.
91. Bugger H and Abel ED. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mec*. 2009;2:454-66.
92. Liu Q, Wang S and Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. *J Diabetes Investig*. 2014;5:623-34.
93. Ernande L, Rietzschel ER, Bergerot C, De Buyzere ML, Schnell F, Groisne L, Ovize M, Croisille P, Moulin P, Gillebert TC and Derumeaux G. Impaired myocardial radial function in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus: a speckle-tracking imaging study. *J Am Soc Echocardiogr*. 2010;23:1266-72.
94. Ward ML and Crossman DJ. Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy. *World J Cardiol*. 2014;6:577-84.
95. Amour J, Brzezinska AK, Jager Z, Sullivan C, Weihrauch D, Du J, Vladic N, Shi Y, Warltier DC, Pratt PF, Jr. and Kersten JR. Hyperglycemia adversely modulates endothelial nitric oxide synthase during anesthetic preconditioning through tetrahydrobiopterin- and heat shock protein 90-mediated mechanisms. *Anesthesiology*. 2010;112:576-85.
96. Ceylan-Isik AF, LaCour KH and Ren J. Gender disparity of streptozotocin-induced intrinsic contractile dysfunction in murine ventricular myocytes: role of chronic activation of Akt. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33:102-8.
97. Suarez J, Scott B and Dillmann WH. Conditional increase in SERCA2a protein is able to reverse contractile dysfunction and abnormal calcium flux in established diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1439-45.

98. Wold LE, Dutta K, Mason MM, Ren J, Cala SE, Schwanke ML and Davidoff AJ. Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:297-307.
99. Radovits T, Korkmaz S, Loganathan S, Barnucz E, Bomicke T, Arif R, Karck M and Szabo G. Comparative investigation of the left ventricular pressure-volume relationship in rat models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H125-33.
100. Tamada A, Hattori Y, Houzen H, Yamada Y, Sakuma I, Kitabatake A and Kanno M. Effects of beta-adrenoceptor stimulation on contractility, $[Ca^{2+}]_i$, and Ca^{2+} current in diabetic rat cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 1998;274:H1849-57.
101. Dincer UD. Cardiac beta-adrenoceptor expression is markedly depressed in Ossabaw swine model of cardiometabolic risk. *International journal of general medicine.* 2011;4:493-9.
102. Carroll JF, Kyser CK and Martin MM. beta-Adrenoceptor density and adenylyl cyclase activity in obese rabbit hearts. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26:627-32.
103. Carroll JF, Jones AE, Hester RL, Reinhart GA, Cockrell K and Mizelle HL. Reduced cardiac contractile responsiveness to isoproterenol in obese rabbits. *Hypertension.* 1997;30:1376-81.
104. Gallagher EJ, LeRoith D and Karnieli E. The metabolic syndrome—from insulin resistance to obesity and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37:559-79, vii.
105. Van den Bergh A, Vanderper A, Vangheluwe P, Desjardins F, Nevelsteen I, Verreth W, Wuytack F, Holvoet P, Flameng W, Balligand JL and Herijgers P. Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. *Cardiovasc Res.* 2008;77:371-9.
106. Relling DP, Esberg LB, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, Lukaski HC, Saari JT and Ren J. Dietary interaction of high fat and marginal copper deficiency on cardiac contractile function. *Obesity.* 2007;15:1242-57.
107. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, Bruno A, Nascimento AF, Luvizotto RA, Oliveira Junior SA, Jr., Castardeli E, Padovani CR and Cicogna AC. Myocardial dysfunction and abnormalities in intracellular calcium handling in obese rats. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97:232-40.
108. Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Epstein CJ, Laroux S and Granger DN. Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. *Am J Physiol.* 1997;273:G1326-32.
109. Biais M, Jouffroy R, Carillion A, Feldman S, Jobart-Malfait A, Riou B and Amour J. Interaction of metabolic and respiratory acidosis with alpha and beta-adrenoceptor stimulation in rat myocardium. *Anesthesiology.* 2012;117:1212-22.
110. Ren J, Porter JE, Wold LE, Aberle NS, Muralikrishnan D and Haselton JR. Depressed contractile function and adrenergic responsiveness of cardiac myocytes in an experimental model of Parkinson disease, the MPTP-treated mouse. *Neurobiol Aging.* 2004;25:131-8.
111. Ren J. Attenuated cardiac contractile responsiveness to insulin-like growth factor I in ventricular myocytes from biobreeding spontaneous diabetic rats. *Cardiovasc Res.* 2000;46:162-71.
112. Le Manach Y, Coriat P, Collard CD and Riedel B. Statin therapy within the perioperative period. *Anesthesiology.* 2008;108:1141-6.
113. Amour J, David JS, Vivien B, Coriat P and Riou B. Interaction of halogenated anesthetics with alpha- and beta-adrenoceptor stimulations in diabetic rat myocardium. *Anesthesiology.* 2004;101:1145-52.
114. Radovits T, Bomicke T, Kokeny G, Arif R, Loganathan S, Kecsan K, Korkmaz S, Barnucz E, Sandner P, Karck M and Szabo G. The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil improves cardiovascular dysfunction in experimental diabetes mellitus. *Br J Pharmacol.* 2009;156:909-19.
115. Bolzan AD and Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res.* 2002;512:121-34.
116. Wold LE and Ren J. Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Biochem Biophys Res Com.* 2004;318:1066-71.
117. Wong WS, Zhu H and Liao W. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist MK-571 alters bronchoalveolar lavage fluid proteome in a mouse asthma model. *Eur J Pharmacol.* 2007;575:134-41.

118. Mueller CF, Wassmann K, Widder JD, Wassmann S, Chen CH, Keuler B, Kudin A, Kunz WS and Nickenig G. Multidrug resistance protein-1 affects oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherogenesis via leukotriene C4 export. *Circulation*. 2008;117:2912-8.
119. Bauman ZM, Killu KF, Rech MA, Bernabei-Combs JL, Gassner MY, Coba VE, Tovbin A, Kunkel PL and Mlynarek ME. Racial differences in vasopressor requirements for septic shock. *Shock*. 2014;41:188-92.
120. Carillion A, Feldman S, Jiang C, Atassi F, Na N, Mougenot N, Besse S, Hulot JS, Riou B and Amour J. Overexpression of cyclic adenosine monophosphate effluent protein MRP4 induces an altered response to beta-adrenergic stimulation in the senescent rat heart. *Anesthesiology*. 2015;122:334-42.

Annexe 2

Interaction of Metabolic and Respiratory Acidosis with α and β -adrenoceptor Stimulation in Rat Myocardium

Matthieu Biais, M.D.,* Romain Jouffroy, M.D.,† Aude Carillion, M.D.,‡ Sarah Feldman,§ Aude Jobart-Malfait, B.S.,** Bruno Riou, M.D., Ph.D.,|| Julien Amour, M.D., Ph.D.#

ABSTRACT

Background: The effects of acute respiratory *versus* metabolic acidosis on the myocardium and their consequences on adrenoceptor stimulation remain poorly described. We compared the effects of metabolic and respiratory acidosis on inotropy and lusitropy in rat myocardium and their effects on the responses to α - and β -adrenoceptor stimulations.

Methods: The effects of acute respiratory and metabolic acidosis (pH 7.10) and their interactions with α and β -adrenoceptor stimulations were studied in isolated rat left ventricular papillary muscle (n = 8 per group). Intracellular pH was measured using confocal microscopy and a pH-sensitive fluorophore in isolated rat cardiomyocytes. Data are mean percentages of baseline $\pm$ SD.

* Associate Professor, Université Victor Segalen, Emergency Department, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France. † Staff Anesthesiologist, Department of Anesthesiology and Critical Care, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France. ‡ Assistant Professor, Université de Reims, Department of Anesthesiology and Critical Care, Robert Debré Hospital, Reims, France. § Research Fellow, UMRS INSERM 956, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. ** Research Technologist, Plateforme ImagoSeine, Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot Paris 7 - CNRS, Paris, France. †† Professor of Anesthesiology and Critical Care, Chairman, UMRS INSERM 956, Université Pierre et Marie Curie, Department of Emergency Medicine and Surgery, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France. # Professor of Anesthesiology and Critical Care, UMRS INSERM 956, Université Pierre et Marie Curie, Department of Anesthesiology and Critical Care, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France.

Received from UMRS INSERM 956, Department of Anesthesiology and Critical Care, Department of Emergency Medicine and Surgery, Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France; Department of Anesthesiology and Critical Care, Université de Reims, Hôpital Robert Debré, Reims, France; and Emergency Department, Hôpital Pellegrin, Université Segalen, Bordeaux, France. Submitted for publication June 22, 2012. Accepted for publication September 6, 2012. Dr. Carillion was the recipient of a research grant from Fondation pour la Recherche Médicale (Paris, France) and Dr. Feldman was the recipient of a research grant from Association pour la Recherche en Anesthésie-Réanimation (Paris, France). Other support was provided solely from institutional and/or departmental sources.

Address correspondence to Dr. Amour: Université Pierre et Marie Curie, Centre Hospitalo-Universitaire Pitié-Salpêtrière, Département d'Anesthésie-Réanimation, Institut de Cardiologie-Chirurgie Cardiaque, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. julien.amour@psl.aphp.fr. Information on purchasing reprints may be found at www.anesthesiology.org or on the masthead page at the beginning of this issue. ANESTHESIOLOGY's articles are made freely accessible to all readers, for personal use only, 6 months from the cover date of the issue.

Copyright © 2012, the American Society of Anesthesiologists, Inc. Lippincott Williams & Wilkins. Anesthesiology 2012; 117:1212-22

What We Already Know about This Topic

- Adrenergic agents are commonly administered to improve cardiac function in settings of respiratory or metabolic acidosis, yet whether these conditions alter therapeutic efficacy is not well described

What This Article Tells Us That Is New

- Using isolated rat left ventricular papillary muscle, acute respiratory and metabolic acidosis did not alter the response to α -adrenoceptor agonists
- Acute metabolic, but not respiratory acidosis, reduced the inotropic response to β -adrenoceptor agonists

Results: Respiratory acidosis induced more pronounced negative inotropic effects than metabolic acidosis did both in isotonic (45 ± 3 *versus* $63 \pm 6\%$, $P < 0.001$) and isometric (44 ± 5 *versus* $64 \pm 3\%$, $P < 0.001$) conditions concomitant with a greater decrease in intracellular pH (6.85 ± 0.07 *versus* 7.12 ± 0.07 , $P < 0.001$). The response to α -adrenergic stimulation was not modified by respiratory or metabolic acidosis. The inotropic response to β -adrenergic stimulation was impaired only in metabolic acidosis (137 ± 12 *versus* $200 \pm 33\%$, $P < 0.001$), but this effect was not observed with administration of forskolin or dibutyl-cyclic adenosine monophosphate. This effect might be explained by a change in transmembrane pH gradient only observed with metabolic acidosis. The lusitropic response to β -adrenergic stimulation was not modified by respiratory or metabolic acidosis.

Conclusion: Acute metabolic and respiratory acidosis induce different myocardial effects related to different decreases in intracellular pH. Only metabolic acidosis impairs the positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation.

ACUTE acidosis (or acidemia) may result from an excess of hydrogen ions, usually related to inappropriate delivery of oxygen to tissues and shock (metabolic acidosis), or to an excess in carbon dioxide (respiratory acidosis), related to a limitation of alveolar ventilation. Respiratory acidosis can be a consequence of ventilatory distress or a therapeutic objective when permissive hypercapnia is performed in the critically ill patient under mechanical ventilation.^{1,2} Both metabolic and respiratory acidosis have been reported to decrease myocardial function,³⁻⁵ although the magnitude of their respective myocardial effects remains poorly described.

Since 1880, acidosis has been known to induce a negative inotropic effect in the heart⁶ through alteration of electrical activity, pumps and channels that regulate intracellular calcium and other ion homeostasis, and modifications of myofibrillar calcium sensitivity.^{3,4,7–11} However, most studies of the effects of acidosis in the heart actually studied myocardial ischemia in which a marked decrease in adenosine 5'-triphosphate is the main event precluding any accurate analysis of the direct effect of acidosis.¹² Moreover, there are some controversies concerning intracellular pH changes induced by extracellular metabolic acidosis.^{9–11} In the context of acidosis, the sympathetic system is an important adaptive mechanism for maintaining cardiac output. The inotropic response to β -adrenergic stimulation is decreased in acute metabolic acidosis¹³ but has not been previously studied in respiratory acidosis. Although myocardial relaxation is an important and active process that may interfere with contraction, the lusitropic consequences of acidosis remains unknown. The consequences of acidosis on α -adrenergic stimulation also remain unknown.

Therefore, the aim of this study was to compare the direct effects of acute metabolic and respiratory acidosis on inotropy and lusitropy in rat myocardium and their effects on the responses to α - and β -adrenoceptor stimulation. We used isolated left ventricular papillary muscle to assess the inotropic and lusitropic effects and isolated cardiomyocytes to measure intracellular pH.

Materials and Methods

All animals were cared for according to the *Guiding Principles in the Care and Use of Animals* and under the supervision of authorized researchers in an authorized laboratory (agreement number B 75-13-08) in accordance with the regulations of the official edict of the French Ministry of Agriculture. Food and water were given *ad libitum*. Ten-week-old male Wistar rats (Iffa Credo, St Germain sur l'Arbresle, France) were divided into a control group (pH = 7.40), a respiratory acidosis group, and a metabolic acidosis group (both pH 7.10).

Isolated Left Ventricle Papillary Muscle

Shortly after the induction of general anesthesia with pentobarbital, the heart was removed *in bloc*, dissected, and weighed. The left ventricular papillary muscles were carefully excised and suspended vertically in a Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 1.1 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 2.5 mM CaCl_2 , 4.5 mM glucose) maintained at 29°C with a thermostatic water circulator and bubbled with 95% oxygen and 5% carbon dioxide as previously described.¹⁴ The papillary muscles were stimulated at 12 Hz for a 60-min stabilization period at the initial muscle length (L_{max}) at the apex of length-active isometric tension curve. The electromagnetic lever system has been described previously.¹⁴ All analyses were made from digital records of force and length obtained with a computer. Conventional mechanical variables at L_{max} were calculated from three twitches. The first twitch was isotonic

and was loaded with the preload corresponding to L_{max} . The second twitch was abruptly clamped to zero load just after the electrical stimulus with a critical damping. The third twitch was fully isometric at L_{max} . We determined the maximum unloaded shortening velocity (V_{max}) using the zero-load technique, and determined maximum shortening (Vc) and lengthening (Vr) velocities and time to peak shortening of the twitch with preload only. In addition, the maximum isometric active force normalized for cross-sectional area (AF), the peaks of the positive ($+dF/dt$) and the negative ($-dF/dt$) force derivatives at L_{max} normalized for cross-sectional area, and the time to peak force from the isometric twitch were recorded. Because changes in the contraction phase induce coordinated changes in the relaxation phase, indexes of contraction-relaxation coupling have been developed to study lusitropy.¹⁵ The R1 coefficient ($R1 = V_{\text{max}} \text{Vc} / \text{Vr}$) studies the coupling between contraction and relaxation under low load and thus lusitropy, in a manner that is independent of inotropic changes. R1 tests sarcoplasmic reticulum (SR) calcium uptake function.¹⁵ The R2 coefficient ($+dF/dt^{-1} / -dF/dt^{-1}$) studies the coupling between contraction and relaxation under high load and thus lusitropy, in a manner that is less dependent on inotropic changes.¹⁴ The cross-sectional area was calculated from the length and weight of papillary muscle, assuming a density of 1.

The effects of metabolic and respiratory acidosis were compared with those of a control group maintained at a pH of 7.40. We studied the effects of acidosis at two calcium concentrations, 0.5 and 2.5 mM. Moreover, we also studied the effects of respiratory and metabolic acidosis on the AF-calcium relationship by varying the extracellular concentration from 2.5 mM to 0.125 mM in separate papillary muscle groups. Last, in two separate groups of muscles ($n = 5$), we studied the kinetics of recovery from exposure to metabolic or respiratory acidosis (pH 7.10 during 30 min), over a 30-min period after return to control conditions (pH 7.40) at an extracellular concentration of 2.5 mM.

Acute Respiratory versus Metabolic Acidosis

In the acidosis group, we studied a pH of 7.10 because previous studies showed that myocardial consequences occurred below a pH of 7.20 and because this value seemed clinically relevant. A separate 200-ml jacketed reservoir with the same Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution was prepared. In the respiratory acidosis group, the bathing solution was bubbled with two gases (95% oxygen–5% carbon dioxide and 50% oxygen–50% carbon dioxide). The proportions of these two gases were adjusted until a stable pH of 7.10 was obtained, the solution being maintained at 29°C. In the metabolic acidosis group, we added hydrochloric acid while using a continuous infusion to obtain a pH of 7.10. Final concentrations of sodium and calcium were adjusted. Electrolyte concentrations were measured with standard electrodes (Ektachem 500, Johnson & Johnson, Les Ulis, France). Oxygen and carbon dioxide tensions and pH were

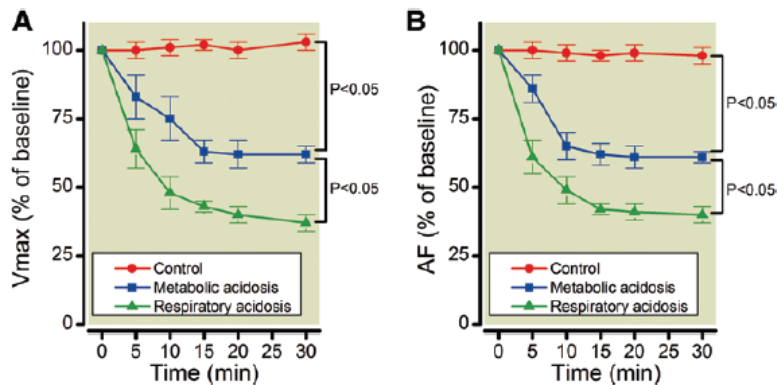


Fig. 1. Comparison of the time course of the inotropic effects of metabolic acidosis (pH = 7.10, n = 8) and respiratory acidosis (pH = 7.10, n = 8) compared with a control group (pH = 7.40, n = 8) in isotonic (A) and isometric (B) conditions at a calcium concentration of 2.5 mM. Data are mean percent of baseline $\pm$ SD. $V_{\max}$ = maximum unloaded shortening velocity; AF = isometric active force for cross-sectional area.

measured with standard electrodes (IL-BG3, Instrumentation Laboratory, Saint Mandé, France). Perfusion of the new solution (metabolic or respiratory acidosis) was started quickly and the effects were recorded after a 15-min stabilization period. The optimal time for equilibration of the effects of acidosis was determined by analysis of time-curves responses. A preliminary study showed that a 20-min equilibration period achieved a plateau both in respiratory and metabolic acidosis conditions (fig. 1). pH was continuously monitored (Eutech Instruments, Nijkerk, The Netherlands).

α and β -adrenoceptor Stimulations

To assess the inotropic response to α and β -adrenoceptor stimulations, the extracellular calcium concentration was decreased from 2.5 to 0.5 mM, as previously described.¹⁵ It has been established that the contractility is nearly maximum at a calcium concentration of 2.5 mM in the rat myocardium, precluding a reliable assessment of positive inotropic agents.

α -adrenoceptor stimulation was induced with increasing concentrations of phenylephrine (10^{-8} – 10^{-4} M), in the presence of propranolol (10^{-6} M).¹⁵ The effect of phenylephrine was expressed by the percentage of baseline value of the maximal effect of phenylephrine on AF and $V_{\max}$ ($\text{Eff}_{\max}$) and the concentration of phenylephrine producing 50% of the maximal effect (C_{50}).¹⁵

β -adrenoceptor stimulation was induced with increasing concentrations of isoproterenol (10^{-8} – 10^{-4} M), a nonselective β -adrenoceptor agonist, in the presence of phentolamine (10^{-6} M).¹⁵ The effect of isoproterenol was expressed by the percentage of baseline value of the maximal effect of isoproterenol on AF and $V_{\max}$ ($\text{Eff}_{\max}$) and the concentration of isoproterenol producing 50% of the maximal effect (C_{50}).¹⁵

We also studied the effects of stimulation of adenylate cyclase using forskoline (5×10^{-5} M), which directly activates adenylate cyclase, and the direct effect of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) using dibutyryl-cAMP (5×10^{-5} M), a fat-soluble and diffusible analog of cyclic

adenosine monophosphate resistant to hydrolysis in the intracellular involvement, as previously described.¹⁶ Last, to study the recovery of the inotropic response to β -adrenergic stimulation, we exposed a separate group of muscles to metabolic acidosis (pH = 7.10 during 30 min) and then again to control conditions (pH = 7.40). All drugs were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (l'Isle d'Abeau-Chesnes, France) and added volumes never exceeded 2% of the total.

Myocardial Cell Isolation Procedure

Ventricular cardiomyocytes were isolated from rat hearts using enzymatic digestion by collagenase A (Roche Diagnostics, Meylan, France) on a Langendorf apparatus, as previously described.¹⁷ After anesthesia was induced by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium, the heart was quickly dissected and connected to the Langendorf apparatus by aortic cannulation. A retrograde perfusion was applied with a calcium-free buffer HEPES solution (117 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 4.4 mM NaHCO_3 , 1.7 mM MgCl_2 , 11.7 mM glucose, 10 mM creatine, 21 mM HEPES and 20 mM taurine, all from Sigma-Aldrich) bubbled with oxygen at 37°C and pH 7.40.¹⁸ The same buffer with collagenase A (1.2–1.4 mg/ml), 100 μM EGTA and 240 μM CaCl_2 (both from Sigma-Aldrich) was perfused for 60–80 min. After enzymatic digestion the heart was removed and the ventricles were suspended in the calcium-free buffer. A light mechanical dissection completed the enzymatic digestion and the cell suspension was filtered at 300 μm . Extracellular calcium was progressively added to the HEPES solution to reach 0.5 mM, cells were fixed on laminin-coated strips, and incubated overnight in the same buffer with penicillin 50 UI/ml and streptomycin 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Measurement of Intracellular pH

Fixed cells were exposed to a pH-sensitive fluorophore carboxy-seminaphthorhodafluor-1 acetoxymethyl ester at a

final concentration of 10 μM for 10 min. The seminaphthorhodafluor-1 acetoxymethyl estersolution was flushed away and normal superfusion was performed (control *vs.* hypercapnic acidosis *vs.* metabolic acidosis) using a solution containing: 135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 5 mM glucose and maintained at 29°C with a thermostatic water circulator. The solutions were continuously bubbled with oxygen. The pH was adjusted to 7.40 with NaOH in the control group. In the hypercapnic acidosis group, carbon dioxide was infused to obtain a pH of 7.10. In the metabolic acidosis group, NaOH was added to obtain a pH of 7.10. Intracellular seminaphthorhodafluor-1 acetoxymethyl ester was excited by an Argon laser at 514 nm and fluorescence was imaged confocally at 580 and 640 nm using a Leica $\times 40$, 1.25 numerical aperture, oil immersion, plano-apochromatic objective lens, as previously described.³ Seminaphthorhodafluor-1 acetoxymethyl ester calibration was performed by abolishing all transsarcolemmal pH gradients using the H^+/K^+ antiporter nigericin, as previously described.¹⁹ In brief, the calibration solutions covered a pH range of 6.50–9.50 (6.50; 7.50; 8.50; and 9.50). Cells were exposed to a calibration solution containing 135 mM KCl, 15 mM NaCl, 1 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM MgSO_4 , 1 mM EGTA, 10 mM HEPES (for pH = 7.5 and 8.5), 10 mM CAPSO (3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid) (for pH = 9.5) or 10 mM PIPES (for pH = 6.5) and 20 μM nigericin for approximately 5 min. pH calibration data were averaged for 50 cells from three animals. The emission ratio of 590/640 nm obtained in control, metabolic acidosis, and respiratory acidosis cells, was converted to a pH value using the following equation:

$$\text{pH} = \text{pK}_a - \log \left(\frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \right) - \log F_{640\text{max/min}}$$

where R is the fluorescence emission ratio 590 nm/640 nm; $R_{\max}$ is the emission ratio at low pH (6.5); $R_{\min}$ is the emission ratio at high pH (9.5); $\log F_{640\text{max/min}}$ is the ratio of fluorescence measured at 640 nm for high pH to that for low pH.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD. Comparison of two means was performed using the Student *t* test, and comparison of several means was performed using repeated measure two way ANOVA and the and Newman–Keuls test. Concentration response curves were determined by fitting the data to the Hill sigmoid pharmacological model according to the following equation: $\text{Eff}_o = \text{Eff}_{\max} / (1 + (C_{50}/C)^n)$ in which Eff_o is the observed effect, $\text{Eff}_{\max}$ the maximum effect, C_{50} the concentration that results in 50% of $\text{Eff}_{\max}$, C the studied concentration, and n the Hill coefficient.¹⁵ Iterative nonlinear regression curve fitting was used to obtain the best fit (Matlab 1.2c software; The MathWorks, South Natick, MA). One-way ANOVA and Newman–Keuls test were used to compare $\text{Eff}_{\max}$ and C_{50} between groups. All *P* values were two-tailed and a *P* value of less than 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using NCSS 2007 software (Statistical Solutions Ltd., Cork, Ireland).

Table 1. Comparison of Gases and Electrolytes in the Krebs-Henseleit Solution in the Three Experimental Groups

	Control (n = 8)	Metabolic Acidosis (n = 8)	Hypercapnic Acidosis (n = 8)
pH	7.41 $\pm$ 0.03	7.10 $\pm$ 0.01*	7.10 $\pm$ 0.02*
PCO_2 , mmHg	36 $\pm$ 3	34 $\pm$ 1	71 $\pm$ 3*†
PO_2 , mmHg	647 $\pm$ 33	645 $\pm$ 40	629 $\pm$ 24
Bicarbonates, mM	22.7 $\pm$ 0.3	11.2 $\pm$ 0.2*	22.0 $\pm$ 0.2†
Sodium, mM	144 $\pm$ 1	144 $\pm$ 1	144 $\pm$ 1
Potassium, mM	5.6 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 0.1*†
Calcium, mM	2.44 $\pm$ 0.02	2.39 $\pm$ 0.03*	2.42 $\pm$ 0.01†
Chloride, mM	121 $\pm$ 1	124 $\pm$ 1*	123 $\pm$ 1*†

Values are mean $\pm$ SD.

**P* < 0.05 vs. control group. †*P* < 0.05 vs. metabolic acidosis.

PO_2 = partial pressure of oxygen; PCO_2 = partial pressure of carbon dioxide.

Results

We studied 115 rats. There was no significant difference among groups for weight (330 $\pm$ 25 g), heart weight (85 $\pm$ 8 mg), or ratio of heart weight to body weight (0.3 $\pm$ 0.1 mg/g).

Effects of Acute Respiratory and Metabolic Acidosis

A mean pH of 7.10 was obtained in the two acidosis groups, associated with a high value of carbon dioxide in the respiratory acidosis group and a low bicarbonate value in the metabolic acidosis group (table 1).

We studied 111 left ventricular papillary muscles, $L_{\max}$ 4.2 $\pm$ 1.0 mm, cross-sectional area 0.45 $\pm$ 0.14 mm², ratio of resting force to total force 0.17 $\pm$ 0.05. There were no significant differences among groups in baseline values of $V_{\max}$ (4.28 $\pm$ 1.08 $L_{\max}$ /s), AF (93 $\pm$ 20 mN/mm²), R1 (0.70 $\pm$ 0.10), R2 (2.30 $\pm$ 0.80), time to peak shortening (177 $\pm$ 20 ms), and time to peak force (156 $\pm$ 23 ms). Both respiratory and metabolic acidosis induced a negative inotropic effect, as shown by a decrease in $V_{\max}$ and AF (table 2). The negative inotropic effect was significantly more pronounced with respiratory acidosis (fig. 1; table 2). Respiratory acidosis induced a negative lusitropic effect under low load (increase in R1), which was not observed with metabolic acidosis (table 2). Respiratory acidosis also induced a positive lusitropic effect under high load (decrease in R2), which was not observed with metabolic acidosis (table 2).

After exposure to metabolic or respiratory acidosis over a 30-min period (Ca 2.5 mM), a complete recovery was obtained within 5 min (metabolic acidosis n = 5, AF: 103 $\pm$ 6% of baseline); (respiratory acidosis n = 5, AF: 118 $\pm$ 8% of baseline) after return to a pH of 7.40.

The calcium–AF relationship was obtained in isolated papillary muscles as extracellular calcium concentration was modified over the 2.5–0.125 mM range. The curve was significantly shifted to the right and the shift was more pronounced with respiratory than metabolic acidosis (fig. 2).

Table 2. Effects of Respiratory (pH = 7.10) and Metabolic (pH = 7.10) Acidosis, Compared with Control Conditions (pH = 7.40) on Main Mechanical Variables of Isolated Papillary Muscles at Two Different Calcium Concentrations

	Calcium 2.5 mM					
	Control (n = 8)		Metabolic Acidosis (n = 8)		Respiratory Acidosis (n = 8)	
	Baseline	Effect, %	Baseline	Effect, %	Baseline	Effect, %
$V_{\max}$, $L_{\max}/s$	4.57 ± 0.99	95 ± 12	4.79 ± 0.92	73 ± 4*†	4.72 ± 0.89	56 ± 8*†‡
AF, mN/mm ²	93 ± 14	99 ± 2	95 ± 15	76 ± 8*†	94 ± 14	56 ± 8*†‡
R1	0.76 ± 0.08	101 ± 2	0.73 ± 0.14	103 ± 14	0.62 ± 0.13	126 ± 22*†‡
R2	2.51 ± 0.90	96 ± 4	1.76 ± 0.53	115 ± 10*†	1.48 ± 0.45	104 ± 8‡
TPS, ms	185 ± 10	100 ± 2	186 ± 13	97 ± 2*	168 ± 17	99 ± 5
TPF, ms	144 ± 14	100 ± 1	156 ± 27	100 ± 8	139 ± 20	105 ± 8
$V_{\max}$, $L_{\max}/s$	2.17 ± 0.63	101 ± 6	2.62 ± 0.63	63 ± 6*†	2.64 ± 0.77	45 ± 3*†‡
AF, mN/mm ²	53 ± 13	100 ± 4	59 ± 9	64 ± 3*†	56 ± 10	44 ± 5*†‡
R1	0.68 ± 0.09	100 ± 7	0.64 ± 0.09	109 ± 10	0.69 ± 0.09	124 ± 20*†‡
R2	1.45 ± 0.34	98 ± 4	1.42 ± 0.18	95 ± 7	2.13 ± 0.36†‡	83 ± 20*†‡
TPS, ms	189 ± 13	99 ± 2	180 ± 14	97 ± 4	195 ± 14‡	86 ± 4*†‡
TPF, ms	182 ± 13	99 ± 2	161 ± 14†	104 ± 8	180 ± 15‡	98 ± 15

Values are mean percent of baseline ± SD.

* P < 0.05 vs. baseline; † P < 0.05 vs. Control; ‡ P < 0.05 vs. metabolic acidosis.

AF = isometric active force normalized for cross-sectional area; R1 = $\frac{V_{\max}}{V_{\max}} \cdot V_r$; R2 = $(+dF/dt - dF/dt)$; TPF = time to peak force; TPS = time to peak shortening; $V_{\max}$ = maximum unloaded shortening velocity.

Interaction with α -adrenergic Stimulation

Phenylephrine induced a significant positive inotropic effect in isotonic and isometric conditions in the control group. Respiratory and metabolic acidosis did not significantly modify the inotropic response to α -adrenergic stimulation (table 3; fig. 3).

Interaction with β -adrenergic Stimulation

Isoproterenol induced a significant positive inotropic effect in isotonic and isometric conditions in the control group. Metabolic acidosis impaired the inotropic effect of β -adrenergic stimulation both in isotonic and isometric conditions. In contrast, respiratory acidosis did not significantly modify the positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation (table 4; fig. 4).

Isoproterenol induced a significant lusitropic effect in isotonic (R1) and isometric (R2) conditions in the control group. Respiratory and metabolic acidosis did not significantly modify the positive lusitropic effects of β -adrenergic stimulation (table 4).

Because metabolic acidosis impaired the positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation, we performed additional studies to test the direct stimulation of adenylate cyclase using forskolin and the direct effect of cAMP. When forskolin or dibutyryl-cAMP were administered, there were no significant differences between respiratory acidosis and control group in isotonic (data not shown) and isometric conditions (fig. 5).

Last, in a separate group, we verified that, after exposure to metabolic acidosis then again to control conditions (pH = 7.40), a complete recovery of the inotropic response

to β -adrenergic stimulation was observed both in isotonic ($V_{\max}$: 174 ± 33 vs. 182 ± 17%, $P = 0.70$) and isometric conditions (AF: 181 ± 27 vs. 178 ± 4%, $P = 0.63$) as compared with control groups.

Intracellular pH

In the HEPES solution, the extracellular pH obtained was 7.40 ± 0.1 in the control group, 7.10 ± 0.01 in the metabolic acidosis group, and 7.10 ± 0.01 in the respiratory acidosis group. The measurement of intracellular pH in control conditions provided a mean value of 7.22 ± 0.07. Typical images obtained in isolated myocardial cells using confocal microscopy are shown in figure 6. The decrease in intracellular pH was more pronounced with respiratory than with metabolic acidosis (fig. 7A) but the consequences on transmembrane pH gradients were more pronounced in metabolic acidosis (fig. 7B).

Discussion

Acute acidosis is frequently encountered in critically ill patients and is the cause of increased morbidity and mortality.^{20–22} Metabolic and respiratory acidosis correspond to different mechanisms potentially leading to different intracellular abnormalities but these two forms of extracellular acidosis impair myocardial function.^{7,21,22} Acidosis induces various and complex effects within the myocardium,²³ including increase in diastolic intracellular calcium concentration⁷ without change in L-type Ca^{2+} current,²⁴ decrease in SR calcium uptake through the

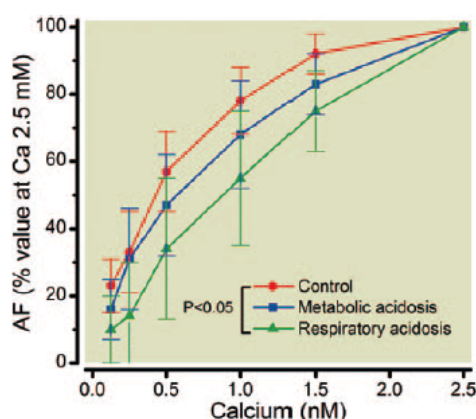


Fig. 2. Comparison of the AF-calcium concentration relationship in control metabolic acidosis (pH = 7.10, n = 8), respiratory acidosis (pH = 7.10, n = 8), and in the control group (pH = 7.40, n = 8). Data are mean $\pm$ SD. Only respiratory acidosis group significantly differs from control group ($P < 0.05$), shifting the relationship to the right. The absolute values of AF at Ca 2.5 mM significantly differed between control (90 ± 15 mN/mm²), metabolic (68 ± 12 mN/mm²), and respiratory acidosis (51 ± 13 mN/mm²). The absolute depression at the Ca concentration of 2.5 mM is shown in figure 1. AF = isometric active force for cross-sectional area.

coupling of SR calcium adenosine 5'-triphosphatase and phospholamban,^{25,26} a decrease in calcium-induced release compensated by an increase in SR calcium content secondary to an increase in cytoplasmic calcium,⁷ and a rise in intracellular sodium caused by both activation of sodium-hydrogen exchange²³ and decrease in sodium-calcium exchange.⁹ Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II during acidosis compensates for the direct inhibitory effect of acidosis on SR calcium uptake.²⁷ The net result is an increase in calcium transient that markedly

Table 3. Comparison of Inotropic Effects of α -Adrenergic Stimulation in Isotonic and Isometric Conditions, in Control Conditions (pH = 7.40) and in Metabolic (pH = 7.10) or Respiratory (pH = 7.10) Acidosis

	Control (n = 8)	Metabolic Acidosis (n = 8)	Respiratory Acidosis (n = 8)
$V_{\max}$			
Baseline,	2.56 $\pm$ 0.47	1.70 $\pm$ 0.62 $\dagger\dagger$	1.16 $\pm$ 0.37 $\dagger\dagger$
$L_{\max}$ /s			
Eff _{max} , %	179 $\pm$ 8*	177 $\pm$ 12*	168 $\pm$ 9*
C_{50} , μ M	2.5 $\pm$ 2.6	4.4 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 4.4
AF			
Baseline,	51 $\pm$ 12	34 $\pm$ 4 $\dagger\dagger$	26 $\pm$ 5 $\dagger\dagger$
mN/mm ²			
Eff _{max} , %	168 $\pm$ 9*	177 $\pm$ 11*	175 $\pm$ 11*
C_{50} , μ M	4.2 $\pm$ 3.4	4.2 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 1.9

Values are mean $\pm$ SD.

* $P < 0.05$ vs. baseline; $\dagger$ $P < 0.05$ vs. control group; $\dagger\dagger$ $P < 0.05$ vs. metabolic acidosis.

AF = isometric active force normalized for cross-sectional area; C_{50} = concentration of phenylephrine that result in 50% of Eff_{max}; Eff_{max} (%) = maximum effect in percentage of baseline value; $L_{\max}$ = initial muscle length; $V_{\max}$ = maximum unloaded shortening velocity.

contrasts with the decrease in twitch contraction, indicating that the decrease in myofilament calcium sensitivity is the primary cause of contractile dysfunction during acidosis.⁷ One of the main effects of acidosis is the decrease in calcium sensitivity of troponin I,^{7,13} a target protein of protein kinase A-dependent phosphorylation during stimulation of the β -adrenergic pathway. Troponin T is only partly responsible for the effect of pH on calcium sensitivity for force development as compared with troponin I,²⁸ and transgenic mice expressing a single histidine modified troponin I are less susceptible to respiratory acidosis with a preserved myocardial contractility.²² Acidosis alters myocardial

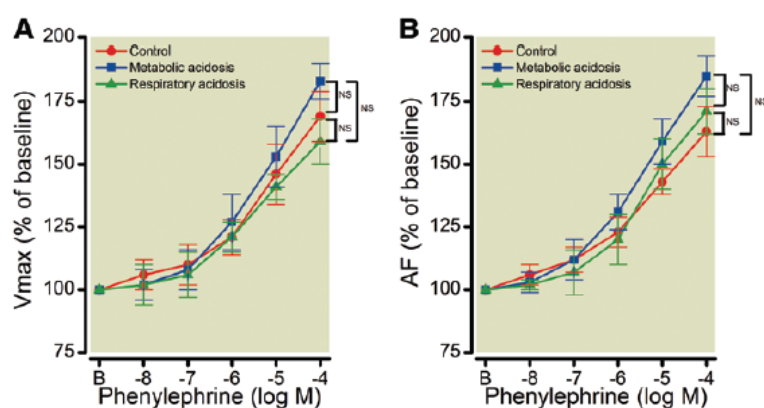


Fig. 3. Comparison of the positive inotropic effects of α -adrenergic stimulation in control conditions (pH = 7.40, n = 8) and in metabolic (pH = 7.10, n = 8) or respiratory acidosis (pH = 7.10, n = 8) in isotonic (A) and isometric (B) conditions. Data are mean $\pm$ SD. AF = isometric active force normalized for cross-sectional area; NS = not significant; $V_{\max}$ = maximum unloaded shortening velocity. P values refer to the between group comparison of the maximum effect (see table 3).

Table 4. Comparison of Inotropic and Lusitropic Effect of β -adrenergic Stimulation in Isotonic and Isometric Conditions in Control Conditions (pH = 7.40) and in Metabolic (pH = 7.10) or Respiratory (pH = 7.10) Acidosis

	Control (n=8)	Metabolic Acidosis (n=8)	Respiratory Acidosis (n=8)
V_{max}			
Baseline, L _{max} /s	2.11 ± 0.32	1.70 ± 0.32†	1.16 ± 0.31†‡
Eff _{max} , %	194 ± 15*	135 ± 15*†	195 ± 16*‡
C ₅₀ , μ M	4.4 ± 0.4	2.7 ± 2.1†	1.9 ± 0.8†
AF			
Baseline, mN/mm ²	54 ± 15	40 ± 6†	24 ± 4†‡
Eff _{max} , %	186 ± 8*	137 ± 12*†	200 ± 33*‡
C ₅₀ , μ M	4.2 ± 0.2	3.8 ± 2.8	3.4 ± 2.3
R1			
Baseline	0.69 ± 0.08	0.69 ± 0.17	0.78 ± 0.18
Eff _{max} , %	64 ± 9*	65 ± 6*	59 ± 7*
C ₅₀ , μ M	2.2 ± 2.0	2.6 ± 3.0	0.3 ± 0.5
R2			
Baseline	1.41 ± 0.39	1.31 ± 0.24	1.76 ± 0.21†‡
Eff _{max} , %	77 ± 8*	78 ± 4*	85 ± 9*
C ₅₀ , μ M	2.8 ± 2.0	1.7 ± 1.2	1.4 ± 2.3

Values are mean ± SD.

* $P < 0.05$ vs. baseline. † $P < 0.05$ vs. control group; ‡ $P < 0.05$ vs. metabolic acidosis.

AF = isometric active force normalized for cross sectional area; C₅₀ = concentration of isoproterenol that result in 50% off Eff_{max}; Eff_{max} (%) = maximum effect in percentage of baseline value; R1 = $\frac{V_{max}}{V_{max} - V_r}$; R2 = $(+dF/dt)^{-1} - (-dF/dt)^{-1}$; V_{max} = maximum unloaded shortening velocity.

contractility less in neonatal than in adult heart,²⁹ and this difference seems to be explained by differences in expression of troponin I isoforms, which exhibit different reaction to

acidosis.³⁰ We observed that respiratory acidosis induced a greater decrease in inotropy (fig. 1), a greater decrease in intracellular pH (fig. 5), and a greater shift to the right of the force-calcium relationship (fig. 2), thus confirming that calcium myofilament sensitivity is probably the main target of the myocardial effects of acidosis.

We are assuming that extracellular hydrogen ion mediates action of metabolic acidosis extracellularly and thus that the change in extracellular bicarbonate concentration (table 1) has no direct effect. We also observed some statistical differences in extracellular potassium, chloride, and calcium concentrations (table 1) but these differences were very small and should be considered as nonphysiologically significant. With regard to calcium, it should be noted that the AF/Ca²⁺ relationship is flat and maximum at these concentrations in the rat myocardium.^{14,15}

We observed that respiratory acidosis induced an increase in R1, suggesting an impairment in SR calcium uptake, and a decrease in R2, suggesting a decrease in myofilament calcium sensitivity. These lusitropic effects were not observed in metabolic acidosis (table 2). These results are consistent with the effects of acidosis on SR calcium uptake in isolated myocytes³¹ and myofilament calcium sensitivity in skinned cardiac trabeculae.⁸ Nevertheless, although our results on R1 are reliable because R1 is not significantly modified by changes in major negative inotropic changes, our results on R2 should be analyzed with caution because R2 is slightly decreased by negative inotropic changes¹⁵ and acidosis induced marked negative inotropic effect. Differences in the lusitropic effects observed in metabolic versus respiratory acidosis are consistent with differences observed in decreasing intracellular pH (fig. 5).

In the clinical context of acidosis, the sympathetic system may represent an important adaptive mechanism for maintaining cardiac output and many critically ill patients with acidosis receive catecholamines that stimulate adrenoceptors.

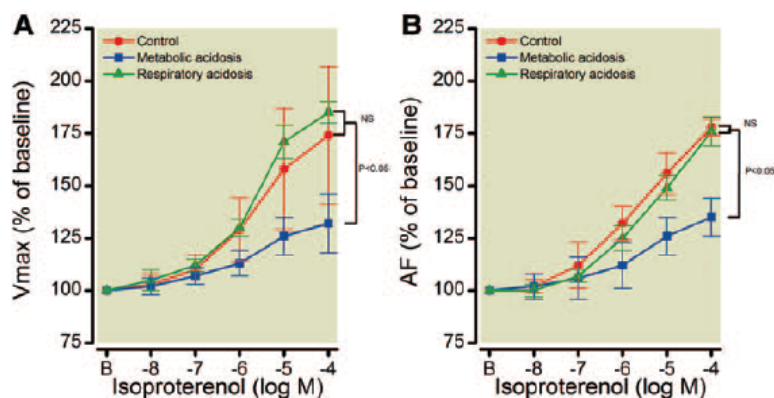


Fig. 4. Comparison of the positive inotropic effects of β -adrenergic stimulation in control conditions (pH = 7.40, n = 8) and in metabolic (pH = 7.10, n = 8) or respiratory acidosis (pH = 7.10, n = 8) in isotonic (A) and isometric (B) conditions. Data are mean percent of baseline ± SD. NS = not significant; V_{max} = maximum unloaded shortening velocity. AF = isometric active force normalized for cross-sectional area; P values refer to the between group comparison of the maximum effect (see table 4).

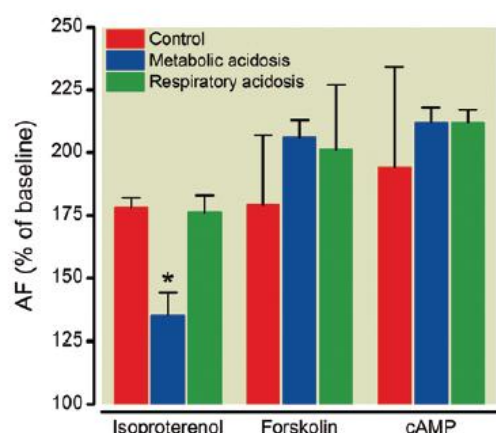


Fig. 5. Comparison of the positive inotropic effects of β -adrenoceptor stimulation with isoproterenol, direct stimulation of adenylate cyclase using forskolin, and administration of dibutyl cAMP in control conditions (pH = 7.40) and in metabolic (pH = 7.10) or respiratory acidosis (pH = 7.10) in isometric conditions. Data are mean percent of baseline $\pm$ SD (n = 8 in each group). AF = isometric active force normalized for cross-sectional area; cAMP = 3'-5' cyclic adenosine monophosphate; NS = not significant. * $P < 0.05$ versus control.

Stimulation of α 1-adrenoceptors activates a protein of the Gq/11 family, which stimulates phospholipase C leading to the formation of inositol triphosphate and diacylglycerol from phosphatidyl inositol 4.5 bisphosphate. Inositol

triphosphate then binds to its receptor in the SR, causing a change in protein conformation and an increase in cytosolic calcium, inducing a positive inotropic effect. In addition, stimulation of the α 1-adrenoceptor increases the calcium sensitivity of troponin C, induces an intracellular alkalinization *via* activation of the Na/H exchanger, and protein phosphorylation of myosin light chain.³² The effect of acidosis on α 1-adrenoceptor stimulation has not been previously studied. We observed that this inotropic effect was not modified by respiratory or metabolic acidosis. Although, the contribution of α -adrenoceptor to inotropy is smaller in humans than in rats, it may participate in the compensation of the negative inotropic effect induced by acidosis. Our study demonstrates that no significant interaction occurs between acidosis and α -adrenoceptor stimulation within the myocardium.

The inotropic response to β -adrenoceptor stimulation is known to be altered in metabolic acidosis in conjunction with an abnormal production of cAMP by adenylate cyclase in isolated tissues,^{13,33} and this has been confirmed in isolated human failing myocardium.³⁴ Our study confirms these results (fig. 4). In contrast, we observed that the pharmacological response to the direct stimulation of adenylate cyclase by forskolin or administration of dibutyl cAMP was not significantly modified by metabolic acidosis (fig. 5), suggesting that the metabolic acidosis-induced dysfunction of the β -adrenergic signaling pathway lies between the membrane receptor and adenylate cyclase. The protonated form of isoproterenol dominates (pKa 8.65) and pH changes may alter its protonation, which may in turn alter binding to the

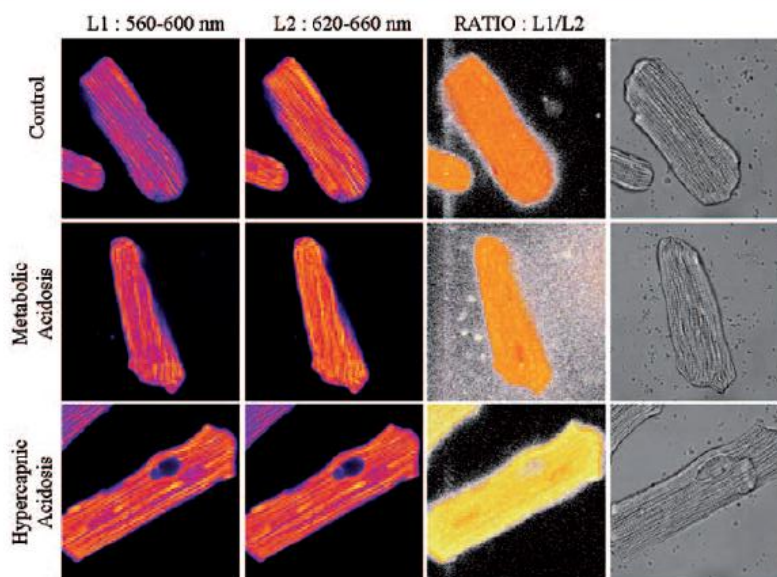


Fig. 6. Typical images obtained using confocal microscopy in isolated rat cardiomyocytes exposed to the pH-sensitive fluorophore carboxy-seminaphthorhodafluor-1 acetoxymethyl ester-1 and an Argon laser at 514 nm in control conditions (pH 7.40) and in metabolic and respiratory acidosis (pH 7.10). The fluorescence was recorded at 580 nm (L1) and 640 nm (L2). The color shift of the emission ratio (ratio: L1/L2) from orange to yellow indicates the magnitude of the decrease in intracellular pH. The left panels show the aspect of myocardial cells without fluorescence.

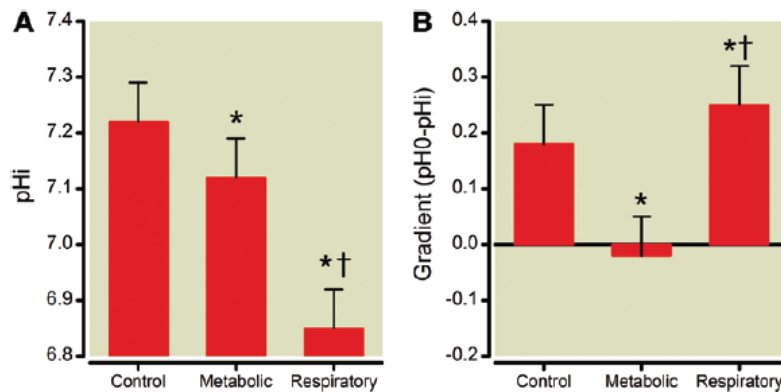


Fig. 7. pH_i (A) and transmembrane pH gradients (B) in isolated rat cardiomyocytes in control conditions (pH 7.40) and in metabolic and respiratory acidosis (pH 7.10). Values are mean ± SD (n = 72 to 124 cells). pH_i = intracellular pH; pH_o = extracellular pH. *P < 0.05 versus control; †P < 0.05 versus metabolic acidosis.

β-adrenoceptors. The difference observed in response with identical change in pH would seem to exclude a major change in ligand protonation, contributing to our observations. Moreover, during acidosis, the number of β-adrenoceptors and their affinity are not significantly modified.³⁵ Only extra-physiological acidosis (pH < 6.00) may result in a decreased expression of membrane protein of β-adrenoceptors.¹³ These results suggest that the metabolic acidosis-induced dysfunction of the β-adrenergic signaling pathway lies between the membrane receptor and G protein and/or coupling between the receptor and G protein. Although metabolic acidosis induced a lesser decrease in intracellular pH than respiratory acidosis did, its effect on transmembrane pH gradient differs markedly: only metabolic acidosis markedly modified this gradient (fig. 5). This difference in transmembrane pH gradient was noted by Steenergen *et al.*³⁶ although this study tested a very low extracellular pH (6.70) and used a method of intracellular pH measurement (dimethyl-2,4-oxizolidine dione distribution method) that is now thought as not reliable. This effect on transmembrane pH gradient is a good candidate for explaining the precise mechanisms involved because our study limits the possible targets to the transmembrane domain of the β-adrenergic signaling pathway. Ghanouni *et al.*³⁷ have suggested that the pH transmembrane gradient may facilitate agonist activation of the β₂-adrenoceptor. Further biochemical studies are needed to exactly determine the mechanism involved. The inotropic response to β-adrenoceptor stimulation was not altered in respiratory acidosis despite important decrease in intracellular pH. This result contrasts with those obtained with other inotropic agents such as levosimendan, which are susceptible to acidosis.³⁸

Although the inotropic response to β-adrenoceptor stimulation was altered in metabolic acidosis, the lusitropic response was preserved under isotonic (R1) and isometric (R2) conditions (table 4). Such discrepancy between inotropic and lusitropic effects of β-adrenoceptor stimulation has been consistently reported in other situations, such as

protamine exposure¹⁶ and diabetes.³⁹ It has been suggested that only a small cAMP production resulting from β-adrenoceptor stimulation is sufficient to induce a normal positive lusitropic effect.⁴⁰ It is known that the concentration of cAMP required to induce a maximal lusitropic effect is smaller than that required to induce a maximal inotropic effect.⁴⁰ These results might be important because lusitropy plays an important role in the maintenance of cardiac output.

The interpretation of our results should take into account some limitations of the experimental model. This study was conducted *in vitro* and the alterations on cardiac function *in vivo* also depend on many other factors (changes in venous return, afterload, autonomic nervous system, and compensatory mechanisms). The model of papillary muscle was studied at 29°C and low-frequency stimulation was necessary to insure stability of the preparation.⁴¹ Rat myocardium differs significantly from human myocardium (heart rate 250–300 beats/min, changes in the force-frequency and action potential, predominant involvement of the SR Ca uptake over the sodium-calcium exchanger and the predominance of iso enzyme V1 myosin). Also, we studied acute acidosis, and our results may not apply to chronic acidosis. We considered the variation of intracellular pH in myocardial cells as a whole whereas it is known that there are noticeable H⁺ gradients within the cell and spatial regulation of intracellular pH.⁴² Moreover, intracellular pH measured in myocardial cells may not duplicate pH changes in papillary muscles. There was a significant difference in baseline R2 between groups (table 2) which could have contributed to the observed results during respiratory acidosis. Last, the effects of acidosis on cardiac contractility are decreased in the neonatal heart,²⁹ and the inotropic response to β-adrenoceptor stimulation is decreased in aging myocardium.⁴³ Thus our results may not apply to both extreme ages.

In conclusion, acute metabolic and respiratory acidosis induces different myocardial effects. The direct negative

inotropic effect is more pronounced with respiratory acidosis and this difference is probably related to a greater decrease in intracellular pH during respiratory acidosis. Last, only metabolic acidosis impaired the positive inotropic effect of β -adrenergic stimulation, whereas no interference occurs with α -adrenergic stimulation.

The authors thank David Baker, M.D., F.R.C.A. (Department of Anesthesiology and Critical Care, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France), for reviewing this article.

References

- Malhotra A: Low-tidal-volume ventilation in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2007; 357:1113–20
- Curley G, Contreras MM, Nichol AD, Higgins BD, Laffey JG: Hypercapnia and acidosis in sepsis: A double-edged sword? *ANESTHESIOLOGY* 2010; 112:462–72
- Orchard CH, Kentish JC: Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol* 1990; 258(6 Pt 1):C967–81
- Crampin EJ, Smith NP: A dynamic model of excitation-contraction coupling during acidosis in cardiac ventricular myocytes. *Biophys J* 2006; 90:3074–90
- Poupa O, Gesser H, Johansen K: Myocardial inotropy of CO₂ in water- and air-breathing vertebrates. *Am J Physiol* 1978; 234:R155–7
- Gaskell WH: On the tonicity of the heart and blood vessels. *J Physiol (Lond)* 1880; 3:48–92.16
- Orchard CH: The role of the sarcoplasmic reticulum in the response of ferret and rat heart muscle to acidosis. *J Physiol (Lond)* 1987; 384:431–49
- Fabiato A, Fabiato F: Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol (Lond)* 1978; 276:233–55
- Philipson KD, Bersohn MM, Nishimoto AY: Effects of pH on Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ Res* 1982; 50:287–93
- Sperelakis N, Lee EC: Characterization of (Na⁺ + K⁺)-ATPase isolated from embryonic chick hearts and cultured chick heart cells. *Biochim Biophys Acta* 1971; 233:562–79
- Orchard CH, Houser SR, Kort AA, Bahinski A, Capogrossi MC, Lakatta EG: Acidosis facilitates spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rat myocardium. *J Gen Physiol* 1987; 90:145–65
- Simonis G, Marquetant R, Röhle J, Strasser RH: The cardiac adrenergic system in ischaemia: Differential role of acidosis and energy depletion. *Cardiovasc Res* 1998; 38:646–54
- Nakanishi T, Okuda H, Kamata K, Seguchi M, Nakazawa M, Takao A: Influence of acidosis on inotropic effect of catecholamines in newborn rabbit hearts. *Am J Physiol* 1987; 253(6 Pt 2):H1441–8
- Riou B, Lecarpentier Y, Viars P: Inotropic effect of ketamine on rat cardiac papillary muscle. *ANESTHESIOLOGY* 1989; 71:116–25
- Hanouz JL, Riou B, Massias L, Lecarpentier Y, Coriat P: Interaction of halothane with α - and β -adrenoceptor stimulations in rat myocardium. *ANESTHESIOLOGY* 1997; 86:147–59
- David JS, Vivien B, Lecarpentier Y, Coriat P, Riou B: Extracellular calcium modulates the effects of protamine on rat myocardium. *Anesth Analg* 2001; 92:817–23
- Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM: Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51:288–98
- Alvarez J, Hamplova J, Hohaas A, Morano I, Haase H, Vassort G: Calcium current in rat cardiomyocytes is modulated by the carboxyl-terminal ahnak domain. *J Biol Chem* 2004; 279:12456–61
- Buckler KJ, Vaughan-Jones RD: Application of a new pH-sensitive fluorophore (carboxy-SNARF-1) for intracellular pH measurement in small, isolated cells. *Pflugers Arch* 1990; 417:234–9
- Blank PS, Silverman HS, Chung OY, Hogue BA, Stern MD, Hansford RG, Lakatta EG, Capogrossi MC: Cytosolic pH measurements in single cardiac myocytes using carboxy-seminaphthorhodafluor-1. *Am J Physiol* 1992; 263(1 Pt 2):H276–84
- Pérez NG, Mattiazzi AR, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE: Myocardial contractility recovery during hypercapnic acidosis: Its dissociation from recovery in pH_i by ryanodine. *Can J Cardiol* 1995; 11:553–60
- Palpant NJ, D'Alecy LG, Metzger JM: Single histidine button in cardiac troponin I sustains heart performance in response to severe hypercapnic respiratory acidosis in vivo. *FASEB J* 2009; 23:1529–40
- Harrison SM, Frampton JE, McCall E, Boyett MR, Orchard CH: Contraction and intracellular Ca²⁺, Na⁺, and H⁺ during acidosis in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1992; 262(2 Pt 1):C348–57
- Komukai K, Brette F, Pascarel C, Orchard CH: Electrophysiological response of rat ventricular myocytes to acidosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H412–22
- Choi HS, Trafford AW, Orchard CH, Eisner DA: The effect of acidosis on systolic Ca²⁺ and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 2000; 529 Pt 3:661–8
- DeSantiago J, Maier LS, Bers DM: Phospholamban is required for CaMKII-dependent recovery of Ca transients and SR Ca reuptake during acidosis in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:67–74
- Komukai K, Pascarel C, Orchard CH: Compensatory role of CaMKII on I_{Ca} and SR function during acidosis in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 2001; 442:353–61
- Ding XL, Akella AB, Gulati J: Contributions of troponin I and troponin C to the acidic pH-induced depression of contractile Ca²⁺ sensitivity in cardiomyocytes. *Biochemistry* 1995; 34:2309–16
- Solaro RJ, Lee JA, Kentish JC, Allen DG: Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ Res* 1988; 63:779–87
- Urbaniene D, Dias FA, Peña JR, Walker LA, Solaro RJ, Wolska BM: Expression of slow skeletal troponin I in adult mouse heart helps to maintain the left ventricular systolic function during respiratory hypercapnia. *Circ Res* 2005; 97:70–7
- Hulme JT, Orchard CH: Effect of acidosis on Ca²⁺ uptake and release by sarcoplasmic reticulum of intact rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1998; 275(3 Pt 2):H977–87
- Endoh M, Hiramoto T, Ishihata A, Takanashi M, Inui J: Myocardial α 1-adrenoceptors mediate positive inotropic effect and changes in phosphatidylinositol metabolism. Species differences in receptor distribution and the intracellular coupling process in mammalian ventricular myocardium. *Circ Res* 1991; 68:1179–90
- Schotola H, Sossalla S, Rajab TK, Toischer K, Quintel M, Bauer M, Schmitto JD: Influence of mild metabolic acidosis on cardiac contractility and isoprenaline response in isolated ovine myocardium. *Artif Organs* 2011; 35:1065–74
- Schotola H, Toischer K, Popov AF, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, Quintel M, Bauer M, Maier LS, Sossalla S: Mild metabolic acidosis impairs the beta-adrenergic response in isolated human failing myocardium. *Crit Care* 2012; 16:R153

35. Nimmo AJ, Than N, Orchard CH, Whitaker EM: The effect of acidosis on beta-adrenergic receptors in ferret cardiac muscle. *Exp Physiol* 1993; 78:95–103
36. Steenbergen C, Deleeuw G, Rich T, Williamson JR: Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circ Res* 1977; 41:849–58
37. Ghanouni P, Schambye H, Seifert R, Lee TW, Rasmussen SG, Gether U, Kobilka BK: The effect of pH on beta(2) adrenoceptor function. Evidence for protonation-dependent activation. *J Biol Chem* 2000; 275:3121–7
38. Takahashi R, Endoh M: Dual regulation of myofilament Ca²⁺ sensitivity by levosimendan in normal and acidotic conditions in aequorin-loaded canine ventricular myocardium. *Br J Pharmacol* 2005; 145:1143–52
39. Amour J, Loyer X, Michelet P, Birenbaum A, Riou B, Heymes C: Preservation of the positive lusitropic effect of beta-adrenoceptors stimulation in diabetic cardiomyopathy. *Anesth Analg* 2008; 107:1130–8
40. Coudray N, Beregi JP, Lecarpentier Y, Chemla D: Effects of isoproterenol on myocardial relaxation rate: Influence of the level of load. *Am J Physiol* 1993; 265(5 Pt 2):H1645–53
41. Paradise NF, Schmitter JL, Surmitis JM: Criteria for adequate oxygenation of isometric kitten papillary muscle. *Am J Physiol* 1981; 241:H348–53
42. Swietach P, Vaughan-Jones RD: Spatial regulation of intracellular pH in the ventricular myocyte. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1047:271–82
43. Birenbaum A, Tesse A, Loyer X, Michelet P, Andriantsitohaina R, Heymes C, Riou B, Amour J: Involvement of β 3-adrenoceptor in altered β -adrenergic response in senescent heart: Role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *ANESTHESIOLOGY* 2008; 109:1045–53

Annexe 2

Abstract présenté à Euroanesthesia 2012, congrès de l'European Society of Anaesthesiology

Title: Comparison of Dobutamine with Isoproterenol in echocardiographic evaluation of cardiac β -adrenergic response in rats

Author(s): Carillion A., Blais M., Riou B., Amour J.

Institute(s): UMRS 956 Pierre and Marie Curie University PARIS 06, INSERM, Paris, France

Text: Background and Goal of Study: Dobutamine and Isoproterenol are two β -adrenoceptor agonists. While Dobutamine is preferentially used in stress echography in clinical practice, Isoproterenol is the β -adrenoceptor agonist the most frequently investigated in experimental studies. Nevertheless, comparison between Dobutamine and Isoproterenol has not been performed in stress echocardiography. In this study, we compared the effects of two classical protocols with Dobutamine or Isoproterenol during stress echocardiography in rats.

Materials and Methods: Male Wistar healthy rats (n=8 in each group) were analyzed by echocardiography (Vivid 7 GE, Aulnay-sous-Bois, France) under general anesthesia with 1%-2% inhaled isoflurane. The cardiac function was recorded in basal contraction and after β -adrenoceptors stimulation by either Dobutamine (4 μ g/kg, intraperitoneally) or Isoproterenol (10 μ g/kg/min, continuous intravenous). Stress measurements were performed when the heart rate was stabilized. Data were analyzed by t-test using NCSS 2007. A $p < 0,05$ was considered as significant. Data are presented as stress measurements as percentage of basal value.

Results and Discussion: With Dobutamine or Isoproterenol, nor the positive inotropic effect measured with Left Ventricle Shortening Fraction (163% $\pm$ 20 vs 162% $\pm$ 16 respectively; NS), neither the lusitropic effect measured with the peak of the early transmitral filling wave E (134% $\pm$ 25 vs 131% $\pm$ 25, respectively; NS) and the velocity of lateral mitral annulus Ea (129% $\pm$ 33 vs 124% $\pm$ 27 respectively; NS) were significantly different. In addition, the positive chronotropic effect was not significantly different when induced by dobutamine or isoproterenol as shown by a similar increase of heart rate (respectively 121% $\pm$ 14 vs 119% $\pm$ 20; NS). Cardiac filling pressures were similar between dobutamine and isoproterenol as shown by the ratio E/Ea (respectively 106% $\pm$ 30 vs 110% $\pm$ 23, NS) and the deceleration time of E wave (99% $\pm$ 27 versus 73% $\pm$ 34 respectively, NS).

Conclusion(s): In vivo, both inotropic and lusitropic effects of Dobutamine and Isoproterenol are similar in healthy rats. This finding should help to analyze and compare results obtained *in vivo* with one or the other of these β -adrenoceptor agonists.

Table des illustrations

Figure 1 : Structure primaire du récepteur β -adrénergique humain	p15
Figure 2 : Représentation schématique des récepteurs et de la signalisation β -adrénergique cardiaques	p18
Figure 3 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction des mouvements calciques et du potentiel d'action dans le cardiomyocyte	p19
Figure 4 : Représentation schématique de la signalisation intracellulaire des récepteurs aux protéines G	p21
Figure 5 : Illustration de l'effet inotrope positif de l'isoprotérénol en échocardiographie en coupe parasternale grand axe	p22
Figure 6 : Représentation schématique de la signalisation des récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques dans les cardiomyocytes	p27
Figure 7 : Représentation schématique de la signalisation intracellulaire issue du récepteur β_3 -adrénergique	p29
Figure 8 : Représentation schématique des microdomaines intracellulaires d'AMPC	p33
Figure 9 : Représentation schématique du canal MRP4	p35
Figure 10 : Représentation schématique du rôle de MRP4 dans la signalisation β -adrénergique	p37
Figure 11 : Critères échocardiographiques de dysfonction diastolique	p45
Figure 12 : Réponse inotrope à la stimulation par isoprotérénol de muscles papillaires de rats sénescents et jeunes adultes	p48
Figure 13 : Images types (panel A) et représentation graphique (panel B) de l'expression du phospholamban total et de SERCA2a	p53
Figure 14 : Exemples d'évaluation de la fonction systolique par strain longitudinal et diastolique par flux transmitral	p56

Figure 15 : Réponse inotrope positive de muscles papillaires de rats sains (panel A) ou diabétiques (panel B) en présence de doses cumulatives croissantes d'isoprotérénol p58

Figure 16 : Réponse inotrope positive de muscles papillaires de rats sains (panel A) ou diabétiques (panel B) en présence de doses cumulatives croissantes d'isoprotérénol p58

Figure 17 : Plateforme d'analyse Ionoptix (A) et exemple de tracés de raccourcissement des sarcomères (B) et de transitoire calcique (C) obtenus simultanément sur des cardiomyocytes isolés p66