

Université de Montréal

Études des fonctions  $\beta$ -adrénergiques dans les cardiomyocytes  
isolés de coeur de chien en insuffisance cardiaque

par

Charles-Edouard Laurent

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophia Doctorat (Ph.D)  
en pharmacologie

©Charles-Edouard Laurent, Février 2001



W

4

U58

2001

v. 082



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Études des fonctions  $\beta$ -adrénergiques dans les cardiomyocytes  
isolés de coeur de chien en insuffisance cardiaque

présentée par :

Charles-Edouard Laurent

au jury composé des personnes suivantes

Dr Sylvain Meloche, président

Dr Angelino Calderone, membre

Dr Gaétan Guillemette, membre externe

Dr René Cardinal, directeur

Dr Michel Bouvier, codirecteur

## SOMMAIRE

Dans le but de corroborer les modifications fonctionnelles en réponse à la stimulation des  $\beta$ ARs avec les changements observés dans le signal de transduction  $\beta$ -adrénergique, nous avons mesuré les variables reliées à la contraction et au signal  $\beta$ -adrénergique sur des cardiomyocytes isolés de coeur de chien en insuffisance cardiaque. La pathologie cardiaque, qui est observée dans ce modèle de coeur de chien en insuffisance cardiaque induite par entraînement rapide des ventricules, est semblable à celle observée chez l'homme. Nous avons donc mesuré sur ces cardiomyocytes les paramètres de contractions, le courant calcique du type-L ( $I_{Ca-L}$ ) ainsi que la génération d'AMP cyclique (AMPC) en réponse à l'isoprotérénol (ISO). Pour ce faire, les cardiomyocytes ont été obtenus par perfusion d'une branche de la coronaire gauche descendante avec des enzymes de digestion. L'amplitude de contraction et de relaxation (sous un champ électrique réglé à 0.5Hz) à l'état basal ou en réponse à l'ISO (0.1nM à 10nM) a été mesurée à l'aide d'un détecteur de mouvement pouvant repérer les bordures des extrémités longitudinales de la cellule. Dans les deux cas la réponse fut significativement réduite de  $22\pm 4.4\%$  et de  $45\pm 18\%$  respectivement. Des résultats semblables ont été obtenus lorsque nous avons mesuré les vitesses de contraction et de relaxation.  $I_{Ca-L}$  a été déterminé en fournissant une impulsion dépolarisante croissante de 10mV à chaque 10s à partir d'un potentiel imposé de 50 mV à l'aide d'un



appareillage de "patch clamp" en configuration cellule entière. Même si les conditions basales sont demeurées inchangées, l'amplitude du  $I_{Ca-L}$  en réponse à l'ISO fut significativement réduite dans les cardiomyocytes insuffisants. La génération d'AMPc induite en réponse à l'ISO, mesurée selon la technique de Salomon, est demeurée équivalente dans les membranes de sarcolemmes émanant de l'homogénat de cardiomyocytes de coeurs insuffisants ( $45 \pm 6.8$ ) ou sains ( $52 \pm 8.5$  pmol d'AMPc/mg de prot./min.). Par ailleurs, cette mesure s'est avérée significativement réduite dans les membranes de tissus (insuffisant:  $67 \pm 8.1$  vs sains:  $140 \pm 27.8$  pmol d'AMPc/mg de prot./min.). Nous n'avons observé aucune réduction de la densité des  $\beta$ ARs mesurée avec le [ $^{125}$ ]iodocyanopindol, soit dans les préparations membranaires des tissus ou de cardiomyocytes de coeurs insuffisants. Cependant, le ratio  $\beta_1/\beta_2$  était significativement réduit dans le tissu insuffisant ( $45/55$  vs  $72/28$ ) alors que dans les cardiomyocytes il est demeuré inchangé ( $72/28$  vs  $77/23$ ). Nous avons également observé qu'il n'y avait pas de désensibilisation du système de transduction  $\beta$ -adrénergique dans les cardiomyocytes de chiens traités soit pendant 60 min avec l'ISO ( $1 \mu M$ ) ou pendant 15 min avec le dibutyryl cyclic AMP (DBT cAMP) ( $1 mM$ ) un activateur des PKA. Malgré l'induction de l'activité GRK dans les cardiomyocytes traités avec l'ISO ( $1 \mu M$ ), la présence des GRK2 et 5 n'a pu être détectée par western blot dans la préparation membranaire de cardiomyocytes. Par ailleurs, nous avons mesuré une désensibilisation

rapide (15min) de 20% avec le phorbol ester (PMA;10 $\mu$ M) et avec l'interleukine-6 (IL-6; 20 U/mL).

Nous concluons que dans l'insuffisance cardiaque induite par entraînement rapide des ventricules, la diminution de la réponse fonctionnelle des cardiomyocytes, traités avec l'ISO, peut être attribuée aux changements se produisant dans la machinerie du couplage excitation-contraction, plutôt qu'à une génération limitée d'AMPc. De plus, la désensibilisation rapide des  $\beta$ ARs observée lorsque les cardiomyocytes sont traités avec l'IL-6 ou PMA, suggère que des mécanismes de régulation, autres qu'avec PKA et GRK, peuvent être responsables de la réduction de la réponse  $\beta$ -adrénergique dans le tissu cardiaque.

**MOTS CLÉS:** Récepteur  $\beta$ -adrénergique  
Insuffisance cardiaque  
Cardiomyocytes  
Adénylyl cyclase  
Désensibilisation  
Contraction  
GRK2/GRK5  
PKC  
IL-6

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	i
MOTS CLÉS .....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	x
LISTE DES FIGURES .....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xiii
REMERCIEMENTS .....	xiv
INTRODUCTION .....	1
<b>CHAPITRE 1: Signalisation des <math>\beta</math>ARs dans l'insuffisance cardiaque</b>	
.....	4
1.1 introduction .....	5
1.2 Expressions et fonctions des $\beta$ ARs .....	5
1.2.1 Structure et localisation .....	5
1.2.2 Expression des $\beta_1$ ARs dans l'insuffisance cardiaque	
.....	10
1.2.3 Interprétation de la densité des $\beta$ ARs cardiaques .	11
1.2.4 Densité des $\beta$ ARs et réponse contractile .....	14
1.3 Expressions et fonctions des protéines-G .....	16

1.4 Expression et fonctions de l'adénylyl cyclase . . . . .	17
1.5 Expression et fonctions des GRKs . . . . .	21
1.5.1 Les GRKs dans l'insuffisance cardiaque . . . . .	25
<b>CHAPITRE 2: Remodelage Cardiaque . . . . .</b>	<b>29</b>
2.1 Introduction . . . . .	30
2.2 Matrice extracellulaire . . . . .	31
2.3 Altérations des structures cellulaires . . . . .	32
2.4 Activation de la voie des MAP kinases par la stimulation $\beta$ - adrénergique . . . . .	33
<b>CHAPITRE 3: Couplage Excitation-Contraction . . . . .</b>	<b>44</b>
3.1 Introduction . . . . .	45
3.2 Courant calcique voltage dépendant . . . . .	47
3.3 Régulation du calcium par le réticulum sacoplasmique . . . . .	50
3.4 L'échangeur de sodium / calcium . . . . .	51
<b>CHAPITRE 4: Mécanisme de régulation des <math>\beta</math>ARs cardiaques . . . . .</b>	<b>53</b>
4.1 Introduction . . . . .	54
4.2 Le dogme de la régulation des $\beta$ ARs . . . . .	54
4.3 Mécanisme de régulation distinct entre $\beta_1$ et $\beta_2$ AR . . . . .	55
4.3.1 Aspect intrinsèque des $\beta_1$ ARs . . . . .	57
4.3.2 Expression des $\beta_1$ ARs et Structure des cardiomyocytes . . . . .	58
4.4 Régulation des $\beta$ ARs par la PKC . . . . .	60
4.5 Régulation des $\beta$ ARs par les cytokines . . . . .	64
<b>HYPOTHÈSE ET BUT DU PROJET DE RECHERCHE . . . . .</b>	<b>66</b>

<b>CHAPITRE 5: <math>\beta</math>-adrenergic responses in failing cardiomyocytes</b>	<b>73</b>
5.1. ABSTRACT	75
5.2. INTRODUCTION	76
5.3. METHODS	78
<i>Canine preparations of tachycardia-induced heart failure</i>	
.....	78
<i>Plasma catecholamine</i>	78
<i>Terminal study (failing hearts and healthy controls)</i>	79
<i>Preparation of isolated cardiomyocytes</i>	79
<i>Contractile responses</i>	81
<i>L-type <math>Ca^{2+}</math> currents</i>	81
<i>Crude membrane preparations</i>	82
<i>Adenylyl cyclase</i>	83
<i><math>\beta</math>-adrenergic receptor binding studies in tissue and cell</i>	
<i>membrane preparations</i>	83
<i><math>\beta</math>-adrenergic receptor binding studies in tissue slices</i>	84
5.4. RESULTS	85
<i>Cardiomyocyte contraction and relaxation</i>	85
<i>Effect of isoproterenol on cardiomyocyte contraction</i>	85
<i>Effects of isoproterenol on the rates of contraction and</i>	
<i>relaxation</i>	86
<i>Effects of isoproterenol on L-type <math>Ca^{2+}</math> currents</i>	86
<i>Adenylyl cyclase and <math>\beta</math>-adrenergic receptor density</i>	87
<i>Adenylyl cyclase and <math>\beta</math>-adrenergic receptor density</i>	88
<i><math>\beta</math>-adrenergic receptor density</i>	88
5.5. DISCUSSION	90
<i>Perspectives</i>	94
5.6. ACKNOWLEDGMENTS	95
5.7. REFERENCES	96

## CHAPITRE 6: Absence of $\beta$ AR desensitization in isolated cardiomyocyte

.....	115
6.1. Abstract .....	117
6.2. Introduction .....	118
6.3. Materials and methods .....	119
<i>Animals</i> .....	119
<i>Preparation of isolated cardiomyocytes</i> .....	120
<i>Isoproterenol pretreatment protocol</i> .....	121
<i>Crude membrane preparations</i> .....	121
<i>Adenylyl cyclase assays</i> .....	122
<i>Adenylyl cyclase stimulation protocol.</i> .....	122
<i><math>\beta</math>-adrenergic receptor binding studies</i> .....	122
<i>Measurement of <math>I_{Ca-L}</math></i> .....	123
<i>Assessment of GRK2 and GRK 5 content by immunoblotting</i> .....	124
<i>GRK activity assays</i> .....	125
6.4. Results .....	126
<i>Adenylyl cyclase stimulation</i> .....	126
<i>GRK level and activity in cardiomyocytes</i> .....	127
<i><math>I_{Ca-L}</math> current</i> .....	127
<i>Pretreatment</i> .....	128
<i>Pretreatment with phorbol ester</i> .....	128
6.5. Discussion .....	129
<i>Preserved <math>\beta</math>AR desensitisation under sustained stimulation</i> .....	129
<i>Preserved functional <math>\beta</math>-adrenergic transduction system</i> .....	131
6.6. Acknowledgements .....	133

6.7. References .....	134
<b>CHAPITRE 7: Interleukin 6-induced <math>\beta</math>AR desensitization .....</b>	<b>149</b>
7.1. Abstract .....	150
7.2. Introduction .....	152
7.3. Methods .....	153
<i>Animals</i> .....	153
<i>Preparation of isolated cardiomyocytes</i> .....	153
<i>Crude membrane preparations</i> .....	154
<i>Adenylyl cyclase assay</i> .....	155
<i><math>\beta</math>-adrenergic receptor binding studies</i> .....	155
7.4. Results .....	155
7.5. Discussion .....	157
7.6. Acknowledgments .....	159
7.7. References .....	160
DISCUSSION .....	165
CONCLUSION .....	174
RÉFÉRENCES .....	176



**LISTE DES TABLEAUX**

Table 5.1: Resting and shortening characteristics of myocytes isolated from healthy and failing hearts. ....	112
Table 5.2: Stimulated adenylyl cyclase activity in membranes from whole tissue or isolated myocytes. ....	113
Table 5.3: $\beta_1/\beta_2$ adrenergic receptor ratio measured in membranes from healthy or failing hearts. ....	114
Table 6.1: $\beta$ AR density and adenylyl cyclase activity: effects of NaF and forskolin on treated cardiomyocytes isolated from canine heart. ....	142

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Structure schématique du récepteur $\beta$ adrénergique . . . . .	7
Figure 1.2: Structure schématique de l'adénylyl cylase purifiée . . . . .	18
Figure 1.3: Mécanisme d'action suggéré pour la phosphorylation des $\beta_2$ AR par les GRK (A) and par la PKA (B) . . . . .	22
Figure 2.1: Voie d'activation des MAP kinase via l'activation des récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ adrénergiques. . . . .	36
Figure 2.2: Graphique représentatif (3 expériences indépendantes) de l'activation des MAPkinase via la stimulation des $\beta_1$ et $\beta_2$ AR . . .	42
Figure 3.1: Schéma hypotétique du mécanisme de couplage excitation- contraction cardiaque . . . . .	46
Figure 3.2: Représentation schématique des organelles cellulaires impliquées dans le couplage d'excitation-contraction cardiaque . . . . .	52
Figure 5.1: Representative phase-contrast micrographs of cardiomyocytes isolated from a healthy (A) and a failing (B) heart. . . . .	106
Figure 5.2: Depression of the isoproterenol-induced increments ( $\Delta_{iso}$ ) in the magnitude of contraction ( $dL/L_{max}$ , normalized with respect to maximum cell length) in failing cardiomyocytes compared to healthy ones. . . . .	107
Figure 5.3: Depression of the isoproterenol-induced increments ( $\Delta_{iso}$ ) in the rate of shortening (A) and relaxation (B) in failing <i>versus</i> healthy cardiomyocytes. . . . .	108
Figure 5.4: Isoproterenol-induced stimulation of the L-type inward calcium current ( $I_{Ca,L}$ ) in failing <i>versus</i> healthy hearts . . . . .	109
Figure 5.5: Preserved isoproterenol-stimulated adénylyl cyclase activity (A) and $\beta_1/\beta_2$ adrenergic receptor ratio (B) in membranes derived	

from homogenates of cardiomyocytes isolated from failing hearts. .....	110
Figure 5.6: Depression of isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity (A) and modification of the $\beta_1/\beta_2$ adrenergic receptor ratio (B) in membranes derived from failing ventricular tissue homogenates. ....	111
Figure 6.1: Preserved isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity after short-term stimulation with isoproterenol. ....	143
Figure 6.2: Preserved isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity after prolonged stimulation. ....	144
Figure 6.3: Detection of GRK2 (A) and GRK 5 (B). ....	145
Figure 6.4: Induction of GRK activity by exposure to isoproterenol. . .	146
Figure 6.5: Similar magnitude of isoproterenol-induced stimulation of $I_{Ca,L}$ in cardiomyocytes. ....	147
Figure 6.6: Heterologous desensitization of $\beta$ AR with PMA. ....	148
Figure 7.1: Inhibition by IL-6 of isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity in isolated cardiomyocytes. ....	164

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AMPC	:Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	:Acide ribo-nucléique messenger
ATP	:Adénosine triphosphate
$\beta$ AR	:Récepteur $\beta$ -adrénergique
fmole / mg	:Femtomole par milligramme
g	:Force de gravitation
GRK	:”G-protein recepteur kinase”
$I_{Ca-L}$	:Courant calcique (canaux de type-L)
[ <sup>125</sup> I]CYP	: [ <sup>125</sup> I]Cyanopindolol
IL-6	:Interleukine-6
NO	:Nitrique Oxyde
PKA	:Protéine kinase A
PKC	:Protéine kinase C

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au docteur René Cardinal, qui a toujours veillé à ce que je puisse réaliser ce projet, pour sa confiance et sa patience. Également, au docteur Michel Bouvier pour sa précieuse collaboration, sa bienveillance et ses encouragements.

Je désire remercier spécialement Michel Vermeulen et le docteur Guy Rousseau pour leur présence, leurs judicieux conseils et leurs amitiés. Ma reconnaissance va aussi à Caroline Bouchard, Pierre Fortier, Denis Guérette, Chantal De Montigny, Suzan Sénéchal et Diane Abastado pour leurs précieuses suggestions et leur soutien technique dévoué.

Je profite de cette occasion pour souligner le support de mes collègues de longue date Elise Jalile, François Hélie, François Lemarbre et Katayoun Deraknchan.

Je désire porter une attention particulière à mon épouse Maria Domenica qui ma fortement encouragée à poursuivre mes études, à Étienne et mes parents pour leur support.

Ce projet a été soutenu financièrement par le Conseil de Recherche Médical du Canada (CRM) et la fondations canadienne et québécoise des maladies du coeur.

à mon épouse

*Maria Domenica*

"I was taught that the way of progress  
is neither swift nor easy."

*Marie Curie*

## INTRODUCTION

Depuis les deux dernières décennies, une avalanche d'informations s'est accumulée sur l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques cardiaques, tant à l'état physiologique qu'à l'état pathologique. Le mécanisme du signal de transduction  $\beta$ -adrénergique qui répond aux stimuli du système nerveux sympathique, implique une liaison des catécholamines circulantes avec les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ AR) exprimés à la surface de la cellule, afin d'entamer une cascade d'événements intracellulaires. Cette réponse biochimique et moléculaire permet d'engendrer au niveau cardiaque un certain nombre d'activités cellulaires qui se traduiront par une augmentation de la force de contraction (inotropie) et de la vitesse de relaxation (lusitropie). L'insuffisance cardiaque, soit expérimentale ou clinique, peut être définie comme étant une perte de la capacité du muscle cardiaque à pomper le sang afin de perfuser adéquatement les tissus. Elle est le résultat d'une multitude de modifications qui affectent chacune des composantes, en partant du stimulus jusqu'à la réponse contractile. Parmi ces modifications, l'augmentation de l'activité sympathique apparaît en premier lieu comme un mécanisme compensatoire afin de maintenir une pression sanguine nécessaire à l'alimentation des organes en oxygène et en nutriments, mais qui pourrait participer à la progression de la pathologie. En effet, cette augmentation de l'activité sympathique a souvent été proposée comme étant responsable de la



diminution considérable de la réponse  $\beta$ -adrénergique observée chez les sujets en insuffisance cardiaque. Cette notion est basée sur la simple hypothèse que la libération de catécholamines produit une stimulation soutenue des récepteurs adrénérgiques engendrant leur désensibilisation (*i.e.*: découplage et diminution du nombre).

Dans la plupart des publications traitant de l'insuffisance cardiaque, qu'elle soit clinique ou expérimentale, la mesure de la densité des  $\beta$ ARs cardiaques est effectuée dans une préparation hétérogène de sarcolemme obtenue à partir d'un morceau de tissu prélevé sur l'organe. Cette approche conventionnelle ne tient cependant pas compte de l'hétérogénéité des cellules qui composent le tissu cardiaque. En effet, Canale et al. (1986) ont estimé que même si les cardiomyocytes constituent 70% de la masse cardiaque, ils ne représentent que 30% du nombre total des cellules cardiaques. Ainsi, cette préparation membranaire origine de différents types cellulaires, tels que les cellules musculaires lisses constituant les vaisseaux sanguins, les fibroblastes et les terminaisons nerveuses dont leur surface membranaire possède également une densité substantielle de  $\beta$ ARs.

Ce présent travail vise donc à étudier les modifications du système de transduction  $\beta$ -adrénergique en relation avec la réponse fonctionnelle dans les cardiomyocytes fraîchement isolés à partir d'un modèle d'insuffisance

cardiaque induite par entraînement rapide des ventricules chez le chien. Une telle approche nous permet d'éliminer le maximum de contaminations engendrées par la présence des autres types cellulaires. Dans un deuxième temps, basé sur l'hypothèse qu'une stimulation soutenue des  $\beta$ ARs produit une désensibilisation rapide dans les lignées cellulaires, nous étudierons les voies de signalisation du  $\beta$ AR ainsi que les mécanismes qui les régularisent dans les cardiomyocytes isolés.

## **CHAPITRE 1: Signalisation des $\beta$ ARs dans l'insuffisance cardiaque**

## **1.1 introduction**

C'est depuis 1982 que nous avons connaissance de la régulation négative des  $\beta$ ARs ainsi que de la diminution de leur capacité d'activer l'adénylyl cyclase dans l'insuffisance cardiaque (Bristow et al., 1982). Par la suite, d'importantes études ont été réalisées afin de définir les mécanismes pouvant expliquer les changements observés. Les altérations ont été décrites autant chez des sujets humains que dans les modèles d'insuffisance induite chez des animaux. Ces changements impliquent l'augmentation des catécholamines plasmatiques, l'augmentation des modifications dans l'expression et les fonctions des  $\beta$ ARs, des protéines-G et de l'adénylyl cyclase. Néanmoins, la séquence des événements moléculaires, leurs causes et effets ainsi que leur origine cellulaire demeurent peu définis.

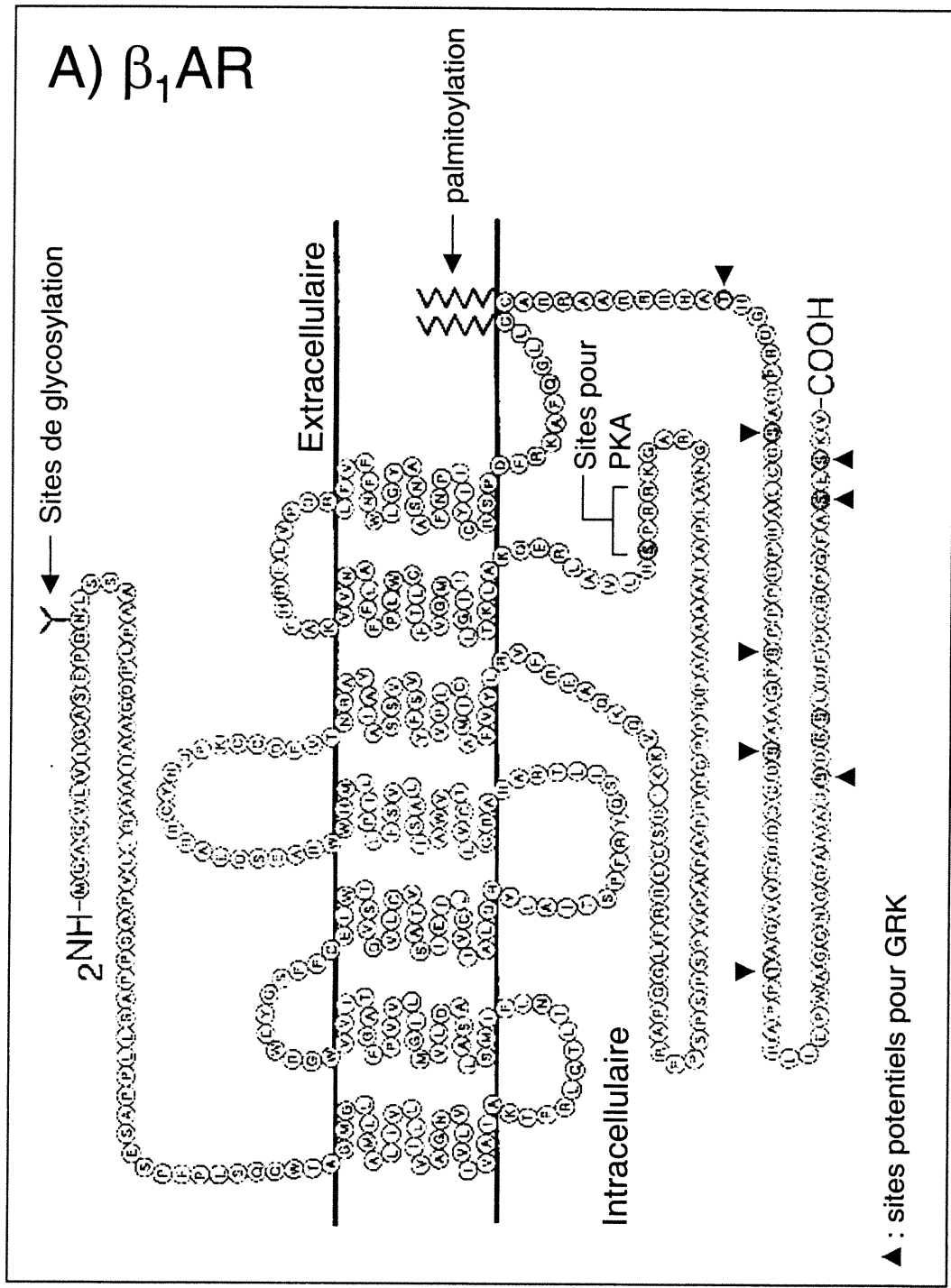
## **1.2 Expressions et fonctions des $\beta$ ARs**

### **1.2.1 Structure et localisation**

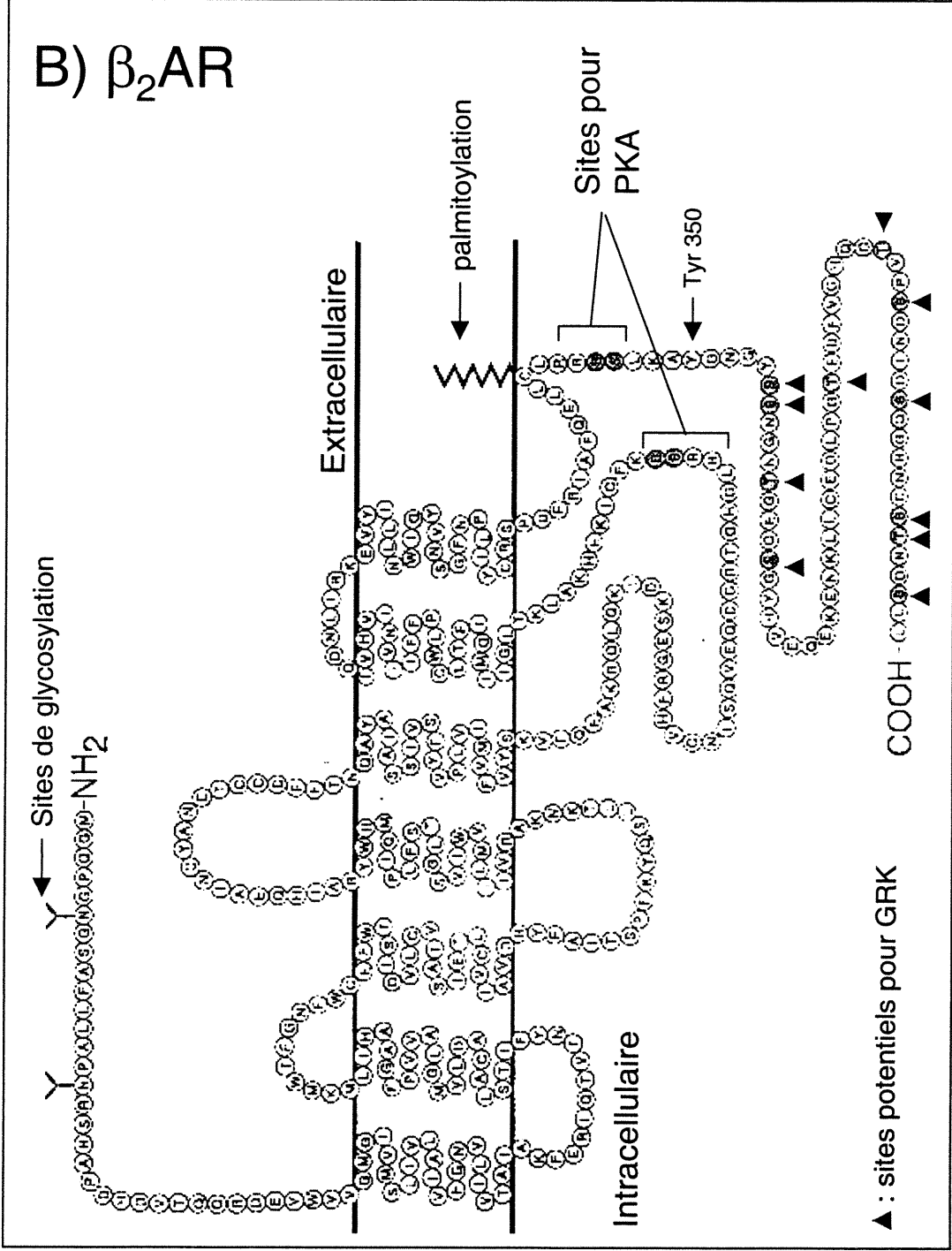
Il existe au moins trois gènes humains, déjà clonés, pouvant exprimer une forme respective de  $\beta$ ARs; soit le  $\beta_1$ -, le  $\beta_2$ - et le  $\beta_3$ -AR. De plus, il semble qu'une quatrième forme ( $\beta_4$ -AR) soit en voie d'être clonée et sa séquence déterminée. Les quatre sous types de récepteurs font partie intégrale des protéines membranaires constituant le coeur humain (Bylund et al., 1998). Le  $\beta_1$ AR (figure 1.1A), qui est une protéine de 477 acides aminés (Frielle et al., 1987) représentant la forme principale des  $\beta$ ARs

cardiaques, est distribué dans toutes les régions du coeur (Brodde 1991). Le  $\beta_2$ AR (figure 1.1B) possède 413 acides aminés (Kobilka et al., 1987) et se retrouve principalement dans les ventricules et les oreillettes (Bristow et al., 1986), mais une proportion importante serait aussi localisée dans les cellules du noeud sinusal et du réseau de conduction, pouvant jouer un rôle dans la vitesse et le rythme cardiaque. Le  $\beta_3$ AR, constitué de 402 acides aminés (Emorine et al., 1989) serait localisé, de façon substantielle, dans le lit vasculaire des coronaires (Strosberg, 1995). Malgré sa capacité de produire un effet inotrope dans les oreillettes isolées (Emorine et al., 1989), il reste à déterminer sa contribution aux fonctions de contraction cardiaque. Finalement, le  $\beta_4$ AR semble être en mesure de produire également un effet inotrope et chronotrope positif au niveau cardiaque (Kaumann et Molenaar 1997; Molenaar et al., 1997). Le récepteur serait exprimé dans plusieurs régions cardiaques telles que le noeud sinusal, les oreillettes et les ventricules. Les quatre sous-types sont couplés à une protéine effectrice par une protéine G (Bylund et al., 1998). Par contre, seul le  $\beta_3$ AR est couplé avec une protéine-G inhibitrice ( $G_i$ ) (Kaumann et Molenaar, 1997) alors que les trois autres sont couplés avec une protéine-G stimulatrice ( $G_s$ ).

**Figure 1.1:** Structure schématique de la séquence d'acides aminés représentant les sites de phosphorylation pour la PKA et la GRK sur A) le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique et B) le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique.



# B) $\beta_2$ AR





### **1.2.2 Expression des $\beta_1$ ARs dans l'insuffisance cardiaque**

Lorsque mesurée dans le ventricule gauche du coeur insuffisant, provenant soit de sujets humains ou de modèles animaux, l'expression des  $\beta_1$ ARs est constamment diminuée alors que celle des  $\beta_2$ ARs reste inchangée (Bristow et al. 1986; Kiuchi et al. 1993). Malgré l'absence de régulation négative des  $\beta_2$ ARs, il n'en demeure pas moins que le récepteur semble être découplé de l'adénylyl cyclase (Bristow et al. 1986; Brodde 1991). Les mécanismes exacts de ce découplage, au niveau cardiaque, ne sont pas encore connus mais tout porte à croire qu'ils peuvent être liés aux changements dans l'interaction du récepteur avec la protéine-G. Pour ce qui concerne les  $\beta_1$ ARs, la diminution sélective de l'ARN messager codant pour le  $\beta_1$ AR en parallèle avec les résultats sur les études de liaison du récepteur dans l'insuffisance cardiaque (Ihl-Vahl et al. 1996), semble correspondre avec la sévérité de l'insuffisance cardiaque (Engelhardt et al. 1996). La cause de cette régulation négative spécifique aux  $\beta_1$ ARs n'est pas comprise mais pourrait être liée à la fois au fait que la noradrénaline a une plus grande affinité pour le  $\beta_1$ AR que pour le  $\beta_2$ AR (Hawthorn et al., 1982; Murphree et al., 1989), et qu'il existe une distribution différente des sous-types de récepteurs au niveau cardiaque.

Cette régulation négative des  $\beta$ ARs présente plusieurs analogies avec la notion schématique de la désensibilisation des  $\beta$ ARs, établie par des

observations sur le  $\beta_2$ AR exprimé dans des lignés cellulaires (Nantel et Bouvier 1993). Brièvement, ceci implique une phosphorylation du récepteur (lié à un agoniste) par une kinase des récepteurs couplés aux protéines-G (GRK) et d'une liaison avec la  $\beta$ -arrestine, un découplage du récepteur avec la protéine-G, suivi d'une internalisation du récepteur et possiblement d'une dégradation. Malgré une grande analogie entre les fonctions des  $\beta_1$ ARs et des  $\beta_2$ ARs, les résultats de plusieurs études nous mènent à croire que les  $\beta_1$ ARs pourraient avoir des mécanismes de régulation qui les distinguent du  $\beta_2$ AR. Ces mécanismes feront l'objet d'un prochain chapitre.

### ***1.2.3 Interprétation de la densité des $\beta$ ARs cardiaques***

Cette régulation négative constamment rapportée dans l'insuffisance cardiaque a toujours été mesurée dans le tissu entier, sans réelle considération de leur hétérogénéité cellulaire. Il a déjà été mentionné que les cardiomyocytes ne représentaient que 30% du nombre total des cellules cardiaques (Canale et al. 1986). On retrouve donc plusieurs types de cellules telles que: des cellules musculaires lisses formant les micro-vaisseaux sanguins (dont le ratio est proportionnel aux myofibrilles (Rakusan et al. 1992)), des cellules du tissu conjonctif, des fibroblastes et des terminaisons nerveuses, qui expriment une densité substantielle de  $\beta$ ARs. Contrairement aux cardiomyocytes, les cellules non-cardiomyocytaires expriment essentiellement à leur surface les  $\beta_2$ ARs (Lau et al. 1980). Dans

l'insuffisance cardiaque, le ratio des cellules non-cardiomyocytaires est variable selon le degré et l'origine de la pathologie. Par exemple, la proportion des cellules interstitielles *versus* cardiomyocytes est augmentée dans le modèle d'insuffisance cardiaque induite par entraînement rapide des ventricules chez le chien (Weber et al., 1990). Des régions nécrotiques peuvent également apparaître, dû à l'augmentation des catécholamines (Downing et Lee 1983), et être incluses (à l'insu de l'investigateur) dans le tissu homogénéisé. L'infusion de noradrénaline chez le rat produit des régions nécrotiques dans lesquelles la réduction de la densité des  $\beta_1$ ARs est plus importante que dans les cellules avoisinantes, alors que la densité des  $\beta_2$ ARs n'est pas changée (Muntz et al. 1994). Ainsi, l'interprétation des résultats obtenus à partir d'une préparation homogène de sarcolemmes, en rapport avec l'origine cellulaire, peut devenir une tâche ardue.

Par ailleurs, une augmentation des  $\beta$ ARs a fréquemment été observée dans les modèles d'ischémie (Mukherjee et al. 1982; Buja et al. 1985; Strasser et al. 1988), et ce, malgré une augmentation des catécholamines. De façon inconsistante avec l'augmentation des  $\beta$ ARs, Ungerer et al. (1996) ont observé dans un modèle de rat ischémique, une augmentation des GRK2 sans changement de la  $\beta$ -arrestine. Des résultats similaires, concernant la GRK2, ont été présentés avec le modèle de coeur de lapin ischémique (Maurice et al. 1999). Malgré l'augmentation apparente des GRK2, certains

auteurs ont rapporté que dans ce modèle d'ischémie, la capacité des  $\beta$ ARs d'induire l'activité de l'adénylyl cyclase était préservée (Wolff et al. 1994). L'augmentation des  $\beta$ ARs, dans les modèles d'ischémie, a été antérieurement reliée à une diminution d'ATP disponible dans le milieu intracellulaire et à une modification dans le processus d'internalisation du récepteur, qui serait ATP-dépendant (Buja et al. 1985; Strasser et al. 1988). Dans les modèles d'insuffisance cardiaque induite chez les animaux, tel que par l'entraînement ventriculaire rapide chez le chien, on observe aussi une relation étroite entre la déficience en ATP et le développement de la pathologie (Coleman et al. 1971; O'Brien et al. 1990). Ainsi, deux modèles pathologiques d'insuffisance cardiaque (ischémie et entraînement ventriculaire rapide) caractérisés par une augmentation des catécholamines, des GRKs et une déficience énergétique, produisent dans un cas une diminution des  $\beta$ ARs cardiaques alors que dans l'autre cas il y a une augmentation de ces récepteurs. Contrairement au modèle d'insuffisance cardiaque induite sur une période de 4 à 8 semaines, l'ischémie aiguë n'est pas caractérisée par un remodelage tissulaire comparable à celui observé dans le modèle d'entraînement rapide des ventricules (i.e. redistribution des sarcomères en série et élongation des cardiomyocytes). Il n'est donc pas invraisemblable de penser que la régulation négative des  $\beta_1$ ARs, observée dans le tissu cardiaque insuffisant mais pas dans les modèles d'ischémie, pourrait être également le reflet d'un remodelage tissulaire.

#### **1.2.4 Densité des $\beta$ ARs et réponse contractile**

Assurément, la régulation négative des  $\beta$ ARs offre une explication logique à la réduction de la production d'AMP cyclique ainsi qu'à la diminution de l'effet inotrope positif en réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique (Brodde 1996). Cependant, quelques contradictions ont été observées en relation avec cette notion de désensibilisation du signal de transduction  $\beta$ -adrénergique dans l'insuffisance cardiaque. Dans le modèle d'insuffisance cardiaque induite chez le chien Juneau et al. (1991) ont remarqué que même si l'activité contractile basale était déprimée, la stimulation  $\beta$ -adrénergique pouvait induire une génération de tension (contraction isométrique) équivalente et une contraction supérieure (contraction isotonique) aux préparations contrôles, ceci malgré une diminution de la densité des  $\beta$ ARs mesurée dans le tissu ventriculaire. Vatner et al. (1994) ont également démontré qu'il pouvait y avoir une certaine dissociation entre la réponse obtenue par la stimulation des  $\beta$ ARs et la mesure des altérations du signal de transduction  $\beta$ -adrénergique. En effet, ils ont rapporté qu'après une journée d'entraînement rapide des ventricules, une diminution de 50% du  $+dP/dt$  en réponse à l'isoprotérénol est observée, une réduction qu'ils prétendent être hors de proportion avec la modeste altération dans le mécanisme de transduction  $\beta$ -adrénergique. Ces résultats suggèrent que les modifications au niveau du mécanisme d'excitation-contraction puissent précéder tout changement au niveau des récepteurs et

contribuer de façon significative à la réduction de la réponse inotrope positive des  $\beta$ ARs. Il est également envisageable, que certaines substances autacoïdes puissent être impliquées dans cette baisse de la réponse contractile. Par exemple, il est possible que la réduction de l'effet inotrope positif des catécholamines soit causée, en partie, par l'augmentation d'oxyde nitrique (NO) dans l'insuffisance cardiaque. Les résultats intéressants rapportés par Keaney et al. (1991) ont démontré que l'infusion d'un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase, tel que le N-nitro-L-arginine méthyle ester, pouvait augmenter la réponse contractile en réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique. L'effet rapide de la production de NO sur la réponse contractile et sur la régulation des  $\beta$ ARs est une voie intéressante qui sera élaborée dans un chapitre ultérieur. Ces observations suggèrent donc, que malgré la régulation négative des  $\beta$ ARs, la réduction de leur effet inotrope positif observée dans l'insuffisance cardiaque pourrait dépendre de d'autres facteurs.

De même, l'effet lusitropique engendré par la stimulation  $\beta$ -adrénergique pourrait être préservé dans l'insuffisance cardiaque (Moe et al. 1994; Parker *et al.* 1991). Plus récemment, Tanigawa et al. (2000) ont remarqué, dans le modèle de chien en insuffisance cardiaque, que l'effet lusitropique positif de la milrinone ainsi que celui de la dobutamine, en

association avec l'intensification de la réactivité de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA2) à l'AMP cyclique, seraient épargnés.

### **1.3 Expressions et fonctions des protéines-G**

Plusieurs composantes du signal de transduction peuvent être impliquées dans la diminution de la réponse  $\beta$ -adrénergique observée dans l'insuffisance cardiaque. Ainsi, il a été démontré que l'activation soutenue des  $\beta$ ARs pouvait influencer l'expression, non seulement des récepteurs, mais aussi de la protéine-G dans le coeur (Mende et al. 1992). Ces protéines G sont des protéines hétérotrimériques localisées à la surface interne de la membrane cytosolique. Parmi les trois sous-unités ( $\alpha\beta\gamma$ ) qui forment les protéines-G, le complexe  $\beta\gamma$  lui sert notamment d'ancrage à la membrane, alors que la transmission du signal adrénergique ce fait principalement via la sous-unité  $\alpha$  stimulatrice ( $\alpha_s$ ). Chez les sujets humains en insuffisance cardiaque, alors que la  $G_{\alpha_s}$  et son ARN messager ne sont pas influencés (Feldman et al. 1988; Eschenhagen et al. 1992), on note une augmentation de la protéine- $G_{\alpha_i}$  inhibitrice ( $G_{\alpha_i}$ ) dans le ventricule gauche associé à une élévation du niveau d'ARN messager codant pour la  $G_{\alpha_i2}$  (Bohm et al., 1994; Eschenhagen et al., 1992). Cependant, lorsque le contenu en  $G_{\alpha_i}$  est mesuré dans les modèles expérimentaux dont l'insuffisance cardiaque est induite par entraînement rapide des ventricules, on note que les résultats ne sont pas uniformes. Effectivement, contrairement aux tissus humains, Roth

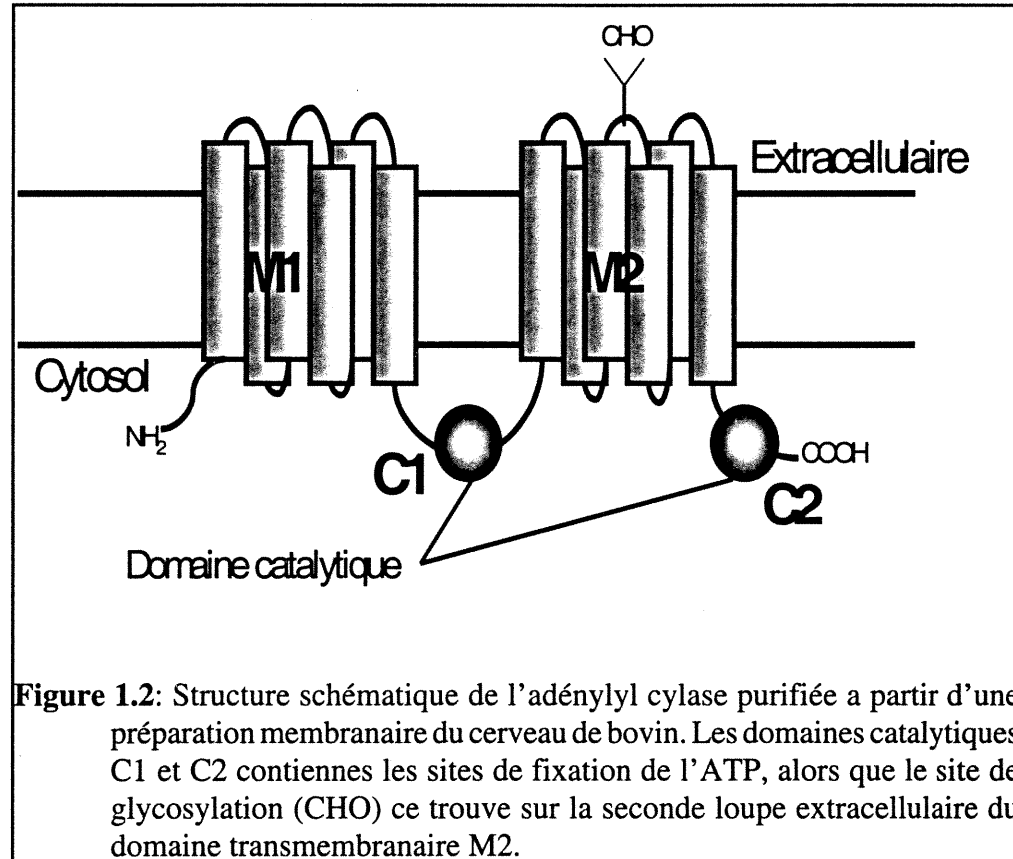
et al. (1993) ont observé, dans le modèle porcin, une réduction du niveau de  $G\alpha_i$ . En association avec cette réduction de la  $G\alpha_i$ , une diminution du taux d'ARN messager codant pour la  $G\alpha_i2$  a été mesurée dans ce même modèle (Ping et Hammond, 1994). Dans le modèle d'insuffisance cardiaque induite chez le chien, Calderone et al. (1991) ont également observé une diminution des  $G\alpha_i$ , alors que Marzo et al. (1991) ont observé une augmentation de la  $G\alpha_i$  dans le même modèle. Donc, les changements de la protéine- $G\alpha_i$  observés dans ces modèles expérimentaux ne sont pas constants et peuvent être le reflet d'une variation de plusieurs facteurs, tels que l'endroit où le stimulateur cardiaque est installé, l'espèce étudiée et la façon dont les protéines sont préparées. Selon les mécanismes de régulation établis, une augmentation de la  $G\alpha_i$  expliquerait en partie la réduction de l'effet inotrope positif des  $\beta$ ARs cardiaques.

#### ***1.4 Expression et fonctions de l'adénylyl cyclase***

La découverte de l'AMP cyclique dans le foie en 1956, par Sutherland, fut un point tournant qui a permis d'établir le paradigme de la signalisation hormonale par la production de seconds messagers. La synthèse d'AMP cyclique à partir de l'ATP est donc possible grâce à l'activation d'une enzyme catalytique nommée adénylyl cyclase. Il existe jusqu'à présent neuf isoformes d'adénylyl cyclase clonées chez les



mammifères. Elles partagent tout une structure primaire constituée de deux régions trans-membranaires,  $M_1$  et  $M_2$ , reliées à deux régions cytoplasmiques,  $C_1$  et  $C_2$  (figure 1.2) (Krupinski et al., 1989). Les régions M sont constituées chacune de six passages trans-membranaires possédant peu d'homologie, alors que les larges domaines cytoplasmiques ( $C_1$  et  $C_2$ ) présentent des séquences d'acides aminés qui démontrent une forte homologie entre elles. Ces deux domaines  $C_1$  et  $C_2$  sont à l'origine de l'activité catalytique de l'enzyme. Parmi les neuf isoformes d'adénylyl cyclase exprimées chez les mammifères, les types V et VI sont les plus apparentés.



**Figure 1.2:** Structure schématique de l'adénylyl cyclase purifiée à partir d'une préparation membranaire du cerveau de bovin. Les domaines catalytiques C1 et C2 contiennent les sites de fixation de l'ATP, alors que le site de glycosylation (CHO) se trouve sur la seconde boucle extracellulaire du domaine transmembranaire M2.

Elles représentent également les formes les plus exprimées au niveau cardiaque. L'expression de l'adénylyl cyclase dans le cœur insuffisant a été beaucoup moins étudiée que celles des autres molécules du complexe de transduction adrénérgique. Ceci s'explique par le fait que la protéine est moins exprimée et devient alors plus difficile à isoler. Par contre, considérant sa faible quantité, il est possible que l'adénylyl cyclase soit un facteur limitant dans la transduction du signal adrénérgique (Post et al., 1995; Gao et al., 1998). Ainsi, une réduction dans l'expression de l'adénylyl cyclase peut être un aspect important dans la pathogénèse de l'insuffisance cardiaque. Une approche fréquemment utilisée afin d'examiner la fonction de l'adénylyl cyclase dans le tissu est l'ajout du diterpène forskoline dans la préparation membranaire. De cette façon, l'activité de l'adénylyl cyclase induite par la forskoline, s'est avérée diminuée dans l'insuffisance cardiaque, suggérant une diminution de l'expression ou de la fonction de l'adénylyl cyclase. La quantification directe de cette protéine est plus laborieuse à cause de la multitude d'isoformes présentes en petite quantité.

La présence de ces deux isoformes (V et VI) au niveau cardiaque détermine donc, de façon significative, les propriétés et l'efficacité du signal engendré par la stimulation des  $\beta$ ARs. Ainsi, l'incapacité de générer un niveau suffisant d'AMP cyclique intracellulaire pourrait être un aspect important dans les maladies cardiaques et en particulier dans l'insuffisance

cardiaque (Feldman et al., 1987). Dans un modèle d'insuffisance cardiaque sévère, induite par stimulation rapide des ventricules chez le chien, une diminution de l'ARN messager codant pour les types V et VI a déjà été observée (Ishikawa et al., 1994). Une étude similaire chez le porc a démontré une diminution plus spécifique du type VI (Ping et al., 1997). Cette régulation spécifique est intrigante puisque le type VI est plus abondamment exprimé dans le coeur néonatal (Tobise et al., 1994; Espinase et al., 1995) alors que le type V prédominerait dans le coeur adulte. En effet, le type VI est très abondant dans le coeur du fœtus diminuant avec le développement jusqu'à un niveau inférieur à l'âge adulte. Le cheminement inverse se produit pour le type V. Malgré tout, l'analyse de l'ARN messager codant pour ces deux isoformes démontre qu'elles sont présentes en quantité supérieure aux autres types à tous les stades du développement. La contribution de ces deux isoformes à la production d'AMP cyclique au niveau cardiaque n'est pas encore déterminée, ainsi, l'implication de la réduction de l'un ou l'autre de ces isoformes demeure nébuleuse.

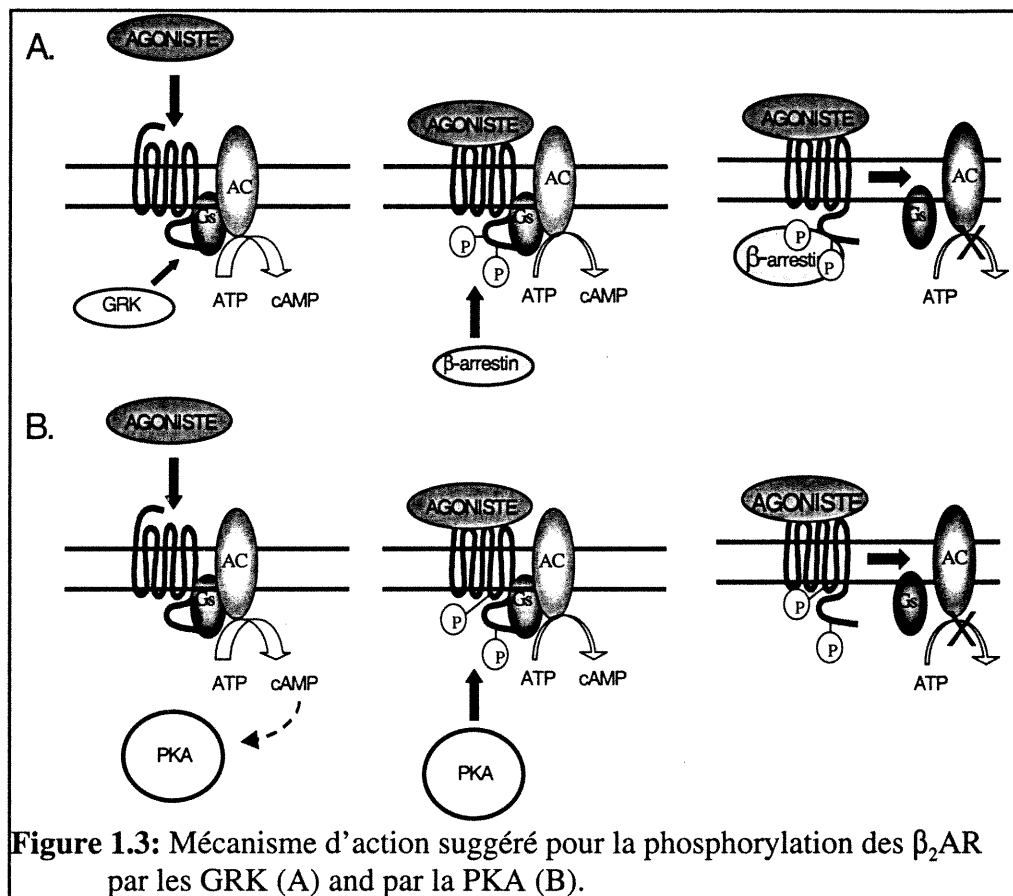
Par contre, d'après le taux d'ARN messager qui s'est avéré diminué seulement dans les cas d'insuffisance cardiaque sévère, il est possible que la diminution de l'adénylyl cyclase soit le résultat, plutôt que la cause de la progression de la pathologie. Toutefois, une réponse définitive ne pourra

être présentée avant que l'on ait la possibilité de mesurer non seulement l'ARN messenger, mais aussi la densité de cette protéine.

### ***1.5 Expression et fonctions des GRKs***

Selon le schéma établi pour la régulation (désensibilisation) des  $\beta$ ARs (figure 1.3), la mesure de l'expression et des fonctions des kinases couplées aux protéines-G (GRK) ainsi que des  $\beta$ -arrestines (1 et 2) est un aspect important pour la compréhension de la diminution des  $\beta_1$ ARs (résumé complet Nantel 1993; Mayor et al. 1998). Au niveau cardiaque on croit que les  $\beta$ ARs seraient principalement phosphorylés par les GRK2 et les GRK5.

Ces deux kinases se distinguent dans leur façon de se lier à la membrane plasmique des cellules. En effet, pour que la GRK2 soit capable de phosphoryler son substrat, elle doit être associée à la membrane plasmique. Les GRK2, ont initialement été identifiées comme étant des protéines solubles pouvant être transférées à la membrane lors de la stimulation des récepteurs couplés aux protéines-G (GPCR). Par contre, des GRK2 associées à la membrane plasmique et à la membrane microsomiale ont également été observées (Daaka et al., 1998; Garcia Higuera et al., 1994; Murga et al., 1997). Toutefois, en ce qui concerne les GRK2 solubles, la



translocation à la membrane est facilitée à la fois 1) par l'interaction de la kinase avec la sous-unité  $\beta\gamma$  des protéines G, disponible lors de l'activation des GPCR et 2) par la conformation même du récepteur lié à son agoniste (Lhose et al., 1996; Premont et al., 1995). De plus, le rôle de la sous-unité  $\beta\gamma$  des protéines-G ne serait pas limité seulement à aider l'interaction des GRK2 avec la membrane plasmique, mais aussi à augmenter de façon synergique la phosphorylation sélective du récepteur déjà lié à son agoniste (De Burman et al., 1996). Cependant, l'activation des GRK2 ne serait complète qu'en présence d'un phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) (De Burman et al., 1996). En effet, grâce à la présence d'un domaine d'homologie Pleckstrin (PH) dans leur séquence d'acides aminés, les GRK2 peuvent interagir avec les PIP2 (Kameyama et al. 1993; Koch et al. 1993).

Les résultats de Chuang et al. (1995) ont permis de démontrer que l'activation des GRK2 pouvait être également augmentée par la phosphorylation des PKC et donc accentuer son action sur la désensibilisation des GPCRs. Les travaux récents de Cong et al. (2001) ont démontré que la PKA pouvait également phosphoryler les GRK2 au niveau du résidu sérine 685. La phosphorylation des GRK2 par la PKA n'affecterait pas l'activité des GRK2 comme tel mais augmenterait plutôt sa capacité de se lier avec la sous-unité  $\beta\gamma$  qui devrait augmenter l'association de la kinase avec le récepteur lié à son agoniste. Une autre étude récente (Fan et al.

2001) a démontré que Src, lié aux  $\beta_2$ AR, pourrait induire une phosphorylation des GRK2. Une fois phosphorylée, la GRK2 activée entraînerait une phosphorylation subséquente du récepteur et enclencherait la cascade d'événements conduisant à l'internalisation du récepteur. Cette internalisation est également associée à l'activation de la cascade des MAP-ERK1/2 (qui sera élaborée ultérieurement dans cet ouvrage) qui formerait une boucle de régulation négative sur la GRK2 afin de la désactiver. En effet, la phosphorylation des GRK2 par ERK 1/2 sur la sérine 670 entraîne une inhibition presque complète (Pitcher et al. 1999).

Contrairement aux GRK2, les GRK5 sont associées à la membrane de façon permanente, et ce, indépendamment de l'interaction des récepteurs avec leur agoniste. Ainsi, la GRK5 ne nécessite pas de translocation à la membrane pour être activée. Cependant elle est régulée par plusieurs ligands lipidiques. Les GRK5 posséderaient 2 sites de liaison lipidiques, le premier dans la partie C-terminale et l'autre dans la partie N-terminale. L'occupation de la partie C-terminale stimulerait l'autophosphorylation des GRK5 qui une fois activées pourraient phosphoryler le récepteur occupé par un agoniste (Kanapuli et al. 1994). Alors que les GRK2 sont activées par la PKC, les GRK5 sont inhibées par la PKC (Pronin et al. 1997). Les 2 sites de phosphorylation pour les PKC sont situés au niveau des 26 derniers acides aminés, près des sites utilisés pour l'autophosphorylation des GRK5. La

calmoduline aurait également la capacité d'inhiber les GRK5 ainsi que la GRK2. Cependant, elle démontre une plus grande affinité pour la GRK5 (IC<sub>50</sub> ~50nM) comparativement à la GRK2 (IC<sub>50</sub> ~ 2  $\mu$ M). Les sites de liaison pour la calmoduline sont situés dans la région N-terminale de l'enzyme près des sites de liaisons des PIP<sub>2</sub> (Pronin et al. 1997). Cette observation pourrait expliquer la réduction de la liaison des GRK5 avec les vésicules lipidiques lorsque étudiée en présence de calmoduline (Pronin et al. 1997).

### ***1.5.1 Les GRKs dans l'insuffisance cardiaque***

Les données sur l'expression des GRKs dans l'insuffisance cardiaque sont relativement récentes et semblent corroborer l'hypothèse des mécanismes de désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines-G. Effectivement, une légère augmentation de l'ARN messenger codant pour les GRK5, et une augmentation plus marquée pour les GRK2 ont été observées ainsi qu'une activité des kinases plus importante dans l'insuffisance cardiaque humaine (Ungerer et al. 1994; Mayor et al., 1998).

Contrairement aux GRK2 et 5, les niveaux d'ARN messenger codant pour la  $\beta$ -arrestine-1 et la  $\beta$ -arrestine-2 semblent être inchangés dans le développement de l'insuffisance cardiaque. L'arrestine, qui a d'abord été identifiée dans la rétine (Benovic et al. 1987) et par la suite dans d'autres



tissus (Lohse et al 1990), agirait comme cofacteur au GRK pour compléter le découplage du récepteur avec sa protéine-Gs. Les travaux de Lohse et al. (1990) ont permis d'identifier une "arrestine-like" protéine ( $\beta$ -arrestine) dans le tissu cardiaque. La  $\beta$ -arrestine-1 et la  $\beta$ -arrestine-2 interagissent avec le récepteur à la suite de sa phosphorylation par les GRK1, GRK2 et GRK5 afin d'optimiser la désensibilisation des  $\beta$ ARs. Il apparaît également, que parmi les récepteurs couplés aux protéines-G, les  $\beta$ ARs possèdent la meilleure interaction avec les  $\beta$ -arrestines (Attramadal et al., 1992; Freedman et al., 1995). L'expression des  $\beta$ -arrestines au niveau cardiaque est de 20 fois supérieure à celle des GRK2 (Ungerer et al., 1994). On suggère donc, que la GRK2 soit vraisemblablement la composante limitant dans la désensibilisation des  $\beta$ ARs.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les données sur cette notion sont relativement récentes, il reste donc à définir l'implication des GRKs et de leurs sous-types dans la progression de l'insuffisance cardiaque. Les résultats obtenus à l'aide de modèles animaux divergent de ceux mesurés dans le tissu humain. En effet, une étude utilisant le modèle d'insuffisance cardiaque, par entraînement rapide des ventricules chez le porc, a démontré qu'il y avait une augmentation du niveau de protéines correspondant à la GRK5 dans ce modèle d'insuffisance cardiaque, alors que la GRK2 est demeurée inchangée (Ping et al., 1997). Étonnamment, ils ont

observé dans cette étude, une augmentation des protéines kinases et de leur activité, à un stade de l'insuffisance où aucun changement dans le complexe de transduction  $\beta$ -adrénergique n'avait été observé. Ceci est incompatible avec l'hypothèse de désensibilisation rapide des  $\beta$ ARs à laquelle tout le monde semble se rallier. Cette observation souligne donc l'importance des résultats présentés par Zhou et al. (1991). Les résultats de Zhou et al. (1991), qui ne démontraient aucun effet des GRKs sur la capacité des  $\beta_1$ ARs à stimuler l'activité de l'adénylyl cyclase, ont été vivement contestés par Freedman et al. (1995).

Malgré les observations convaincantes sur l'augmentation des GRK dans l'insuffisance cardiaque, le lien entre cette élévation et la réduction des  $\beta$ ARs cardiaques doit être établi expérimentalement et de préférence au niveau des cardiomyocytes isolés. Des expériences récentes, dirigées en ce sens (Iaccarino et al., 1999), ont démontré qu'une perfusion d'isoprotérénol à l'aide d'une mini-pompe chez la souris produisait une hypertrophie cardiaque accompagnée d'une augmentation de l'expression des GRK2 et d'une désensibilisation des  $\beta$ ARs cardiaques. Dans cette étude, une hypertrophie cardiaque a également été produite avec la perfusion de phényléphrine. Cependant, aucune augmentation de l'expression des GRK2, ni de la régulation négative des  $\beta$ ARs n'a été observée, suggérant que l'activation de la GRK2 soit reliée à la stimulation  $\beta$ -adrénergique dans le

tissu cardiaque de souris. Au niveau des cardiomyocytes, une augmentation de l'activité GRK a été observée dans un modèle de coeur de lapin ischémique associé à une élévation des catécholamines (Maurice et al., 1999). Par contre, ils n'ont pas fait la démonstration spécifique de l'expression des GRK2 et 5 dans ces cardiomyocytes isolés. Néanmoins, la démonstration de la présence des GRK et de leur action sur les  $\beta_1$ ARs spontanément exprimés à la surface de cardiomyocytes adultes isolés du coeur sain ou en insuffisance cardiaque n'a pas encore été établie.

## CHAPITRE 2: Remodelage Cardiaque

## **2.1 Introduction**

Le remodelage pathologique du tissu cardiaque a déjà été mentionné dans cet ouvrage comme étant un aspect important de l'insuffisance cardiaque. Il pourrait se définir par une restructuration des différents types cellulaires à la suite d'une surcharge hémodynamique produisant la plupart du temps une augmentation de la masse cardiaque (hypertrophie) et une modification de la forme des ventricules. Toutefois, les caractéristiques phénotypiques du remodelage cardiaque dépendent beaucoup de la nature du stimulus. En situation de surcharge systolique (i.e. sténose aortique), l'augmentation de la pression sur les parois induit une augmentation des sarcomères en parallèle élargissant ainsi les cardiomyocytes (Gerdes et Capasso 1995). Cette forme d'hypertrophie cardiaque est désignée comme étant concentrique. Par contre, si le stimulus hémodynamique ressemble à une surcharge diastolique (i.e. régurgitation de la valve mitrale), on notera une hypertrophie longitudinale représentée par une augmentation des sarcomères en série, ainsi qu'un allongement des cardiomyocytes. Cette élongation des cardiomyocytes serait également associée à un glissement entre les fibres musculaires. Le rationnel physiologique de cette élongation des fibres musculaires serait d'augmenter le volume ventriculaire diminuant ainsi la pression sur les parois (Hopie 1998). Dans une telle situation, on parlera alors d'hypertrophie excentrique. En clinique, il est fréquent que l'hypertrophie cardiaque observée chez les patients soit le résultat d'une

augmentation simultanée de la pression systolique et diastolique. Ainsi, on observera au niveau des cellules cardiaques de ces patients une augmentation du nombre de sarcomères en série et en parallèle (Hopie 1998).

## ***2.2 Matrice extracellulaire***

Le remodelage cardiaque affecte non seulement les cardiomyocytes, mais aussi la matrice extracellulaire incluant le collagène, les protéoglycans et les glycoprotéines (i.e. fibronectines). Plusieurs facteurs hormonaux présents et/ou libérés pendant le développement de l'insuffisance cardiaque peuvent influencer le remodelage cardiaque. Par exemple, les résultats de Communal et al (1998), effectués sur des myocytes de rats, ont démontré que l'augmentation de la noradrénaline, via son action sur les  $\beta$ ARs, peut induire l'apoptose cellulaire. Par contre, lorsque étudiée sur des fibroblastes, la stimulation  $\beta$ -adrénergique induit une prolifération cellulaire (Calderone et al., 1998). La réorganisation tissulaire se traduit donc par une diminution des fibres musculaires et une augmentation de la fibrose ou encore de micro-nécrose. En concordance, on décèle un plus grand nombre de cellules cardiaques apoptotiques dans le modèle de chiens en insuffisance cardiaque induite par entraînement rapide des ventricules (Liu et al., 95). Ainsi, l'apoptose pourrait jouer un rôle important dans la proportion des cardiomyocytes versus cellules interstitielles dans l'insuffisance cardiaque

avancée. De plus, la formation de fibrose interstitielle, se développant à la suite de la destruction cellulaire, produit des modifications aux niveaux des propriétés mécaniques du myocarde (i.e. diminution de la vitesse de relaxation) et de la distribution des nutriments aux cardiomyocytes. Un tel remodelage cardiaque pourrait également induire des modifications au niveau des protéines de structure, compromettre l'intégrité du squelette extracellulaire et mener à une dilatation ventriculaire.

### ***2.3 Altérations des structures cellulaires***

Dans le modèle d'insuffisance cardiaque induite par entraînement rapide des ventricules, on observe une dilatation des ventricules, sans augmentation apparente de la masse cardiaque. Cette dilatation des ventricules coïncide avec l'allongement des cardiomyocytes et l'augmentation du nombre de sarcomères en série. Ainsi, ce modèle d'insuffisance cardiaque produit un remodelage plutôt du type excentrique. La restructuration des sarcomères en série se fait au détriment des sarcomères en parallèles, puisque l'on observe dans ce modèle une diminution du contenu en myofibrilles par unité de surface de la cellule (Spinale et al., 1992). De plus, les observations rapportées par Spinale et al. (1992) démontrent une perte de l'organisation architecturale du cytosol à l'intérieure des cardiomyocytes. Cette réorganisation est reflétée par une distribution anormale des mitochondries, un réarrangement anormal des myofilaments

et un gonflement des tubules transverses. Ces modifications observées à la fois dans les constituants de l'appareil contractile et dans la structure même des cardiomyocytes doivent donc être prises en considération pour expliquer la réduction de la réponse fonctionnelle du myocarde.

#### ***2.4 Activation de la voie des MAP kinases par la stimulation $\beta$ -adrénergique***

La réorganisation des structures internes des cardiomyocytes et le remodelage en général sont le résultat, en partie, d'une augmentation de la synthèse protéique et de l'assemblage des sarcomères. Ces changements sont commandés par l'expression de certains proto-oncogènes tels que *c-fos* et *c-jun*. Plusieurs facteurs hormonaux comme l'angiotensine II, l'endothéline, la noradrénaline et les hormones de croissance peuvent être responsables de la réactivation de ces proto-oncogènes. Certaines études effectuées chez l'humain ont démontré que l'utilisation de  $\beta$ -bloqueurs pouvait renverser le remodelage cardiaque (Lowe et al., 96; Hall et al., 95). Ceci suggère donc une contribution importante de la stimulation  $\beta$ -adrénergique dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Toutefois, la régulation de ces mécanismes d'hypertrophie par la stimulation  $\beta$ -adrénergique n'est pas encore bien définie. Par contre, il y a des évidences permettant de croire que les  $\beta$ AR ont la capacité d'induire la production d'ANF (un stimulant de la synthèse protéique dans les cardiomyocytes) par un mécanisme dépendant

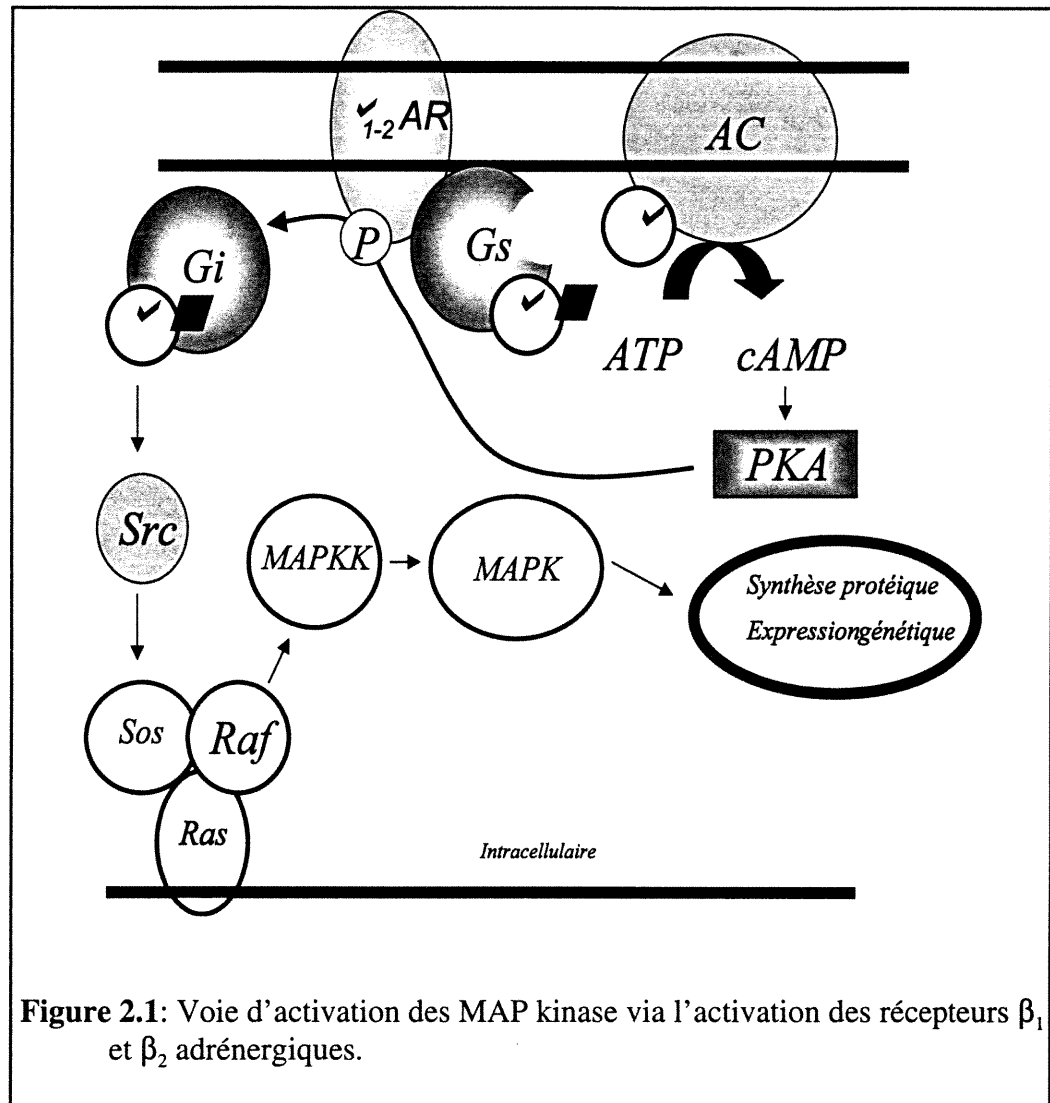


des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Sadoshima et al 1998). Des kinases dépendantes du calcium ainsi que des phosphatases ont été impliquées dans des mécanismes conduisant à l'activation de la transcription et de la réponse hypertrophique des cardiomyocytes (Ramirez et al. 1997; Molkenin et al. 1998). Ainsi, leurs actions individuelles ou combinées pourraient être un lien entre une mauvaise gestion du calcium intracellulaire et l'hypertrophie cellulaire observée dans les cardiomyocytes.

Un autre mécanisme susceptible d'activer l'expression des proto-oncogènes pourrait être une interaction entre la voie des  $\beta$ ARs et la voie des MAP ("Mitogen-activated protein") kinases (Bogoyevitch et al. 1996). En effet, des études récentes effectuées sur des cellules de rats nouveau-nés, ont permis de démontrer que la stimulation  $\beta$ -adrénergique cardiaque pouvait induire l'activation des MAP kinases (Yamazaki 97). Même si l'activation des MAP kinase (entre autres ERKs) est impliquée dans la survie des cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Glennon et al. 1996; Shen et al. 1997), leur importance dans les cardiomyocytes adultes est encore incertaine puisqu'une étude a démontré que la noradrénaline stimule l'apoptose via les  $\beta_1$ ARs (Communal et al. 1998).

La voie d'activation des MAP kinases par les récepteurs couplés aux protéines-G tels que : les récepteurs de l'angiotensine II et de l'endothéline

I, était connue depuis un certain temps. Ces récepteurs utilisent leur capacité de se coupler avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  des protéines  $G_i$ ,  $G_q$  ou  $G_{12}$ . Ces protéines G seraient capables de faire les interactions directe et indirecte avec des petites protéines G de faible poids moléculaire nommées GTPases. Ces GTPases, dont Ras et Rho sont d'un intérêt particulier, induisent l'activation des MAP kinases. Ce sont toutefois les travaux de Daaka et al. (1997) qui ont permis de proposer une nouvelle voie de signalisation pour les  $\beta$ ARs. En effet, une fois phosphorylé par la PKA dans sa troisième boucle intracellulaire, le  $\beta$ AR pourrait se coupler avec une  $G_i$  et permettre l'interaction des sous-unités  $\beta\gamma$  avec Src/Ras et activer la voie des MAP kinases (figure 2.1) (Daaka 97; Zou 99). Luttrell et al. (1999) ont aussi démontré que l'activation des ERKs par le  $\beta_2$ AR était dépendante non seulement de la désensibilisation du récepteur par PKA mais aussi de son internalisation. Les mécanismes impliqués dans l'internalisation du récepteur nécessite la phosphorylation du récepteur dans sa portion C-terminale par une GRK2. Une fois le récepteur phosphorylé, l'affinité de la  $\beta$ -arrestine pour le récepteur est augmentée et la liaison entre les deux permet le recrutement de Src kinase à la membrane plasmique. Une interaction subséquente du



**Figure 2.1:** Voie d'activation des MAP kinase via l'activation des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adrénergiques.

complexe récepteur- $\beta$ -arrestine-Src avec la clathrine permettrait l'internalisation du récepteur et une meilleure activation des ERKs par le  $\beta_2AR$ .

Dernièrement, Fan et al. (2001) ont proposé un mécanisme suggérant que l'association de Src avec le  $\beta_2AR$  soit un phénomène qui précéderait la

désensibilisation du récepteur. En effet, dans sa queue C-terminale le  $\beta_2$ AR posséderait un domaine SH2 encadré de tyrosines (Tyr-350 et Tyr-354). Lorsque le récepteur est en présence d'un agoniste, le récepteur serait phosphorylé en sa position Tyr-350 (par une tyrosine kinase possiblement). La Tyr-350 deviendrait alors un domaine SH2 fonctionnel capable de recruter une Src kinase et de phosphoryler les GRKs qui en retour vont phosphoryler le récepteur sur les résidus sérine et thréonine permettant l'interaction avec la  $\beta$ -arrestine et éventuellement l'internalisation des  $\beta$ ARs et l'activation des ERKs.

Ces mécanismes proposés pour l'activation des ERKs par les  $\beta$ ARs ont tous été effectués à l'aide du  $\beta_2$ AR surexprimé dans des lignées cellulaires. Au niveau cardiaque c'est le  $\beta_1$ AR qui prédomine et des différences importantes dans la régulation de ces deux sous type de récepteurs ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ AR) ont déjà été rapportées. Un grand défi est à prévoir afin de déterminer ces mécanismes dans un milieu plus physiologique tel que les cardiomyocytes adultes isolés.

Plus récemment, Communal et al. (2000) ont démontré, en utilisant des cardiomyocytes de rats adultes, que la stimulation des  $\beta$ ARs pouvait activer les 3 membres de la famille des MAP kinases, c-jun N-terminal kinases (JNKs), p38 MAP kinases et les "extracellularly responsive kinases"

(ERK1/2). Ces trois cascades de protéines kinases ont fait l'objet d'études impliquées dans l'hypertrophie cardiaque (Yano et al. 1998; Zechner et al. 1997; Bueno et al. 2000). Le rôle des JNK activées par la stimulation des  $\alpha$ ARs semble avoir un effet certain dans l'hypertrophie cardiaque des rats nouveau-nés (Ramirez et al. 1997; Calderone et al. 2000). Toutefois, leur activation par les  $\beta$ ARs dans les cardiomyocytes adultes (Communal et al. 2000) n'est pas encore prouvée.

Le rôle des ERK1/2 dans l'hypertrophie cardiaque fait cependant l'objet d'un débat scientifique. Par exemple, les travaux de Glennon et al. (1996) ont démontré que l'hypertrophie des cardiomyocytes de rats induite par la stimulation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques avec la phényléphrine devait nécessairement passer par la voie des ERKs. Les travaux de Clerk et al. (1998) ont également rapporté que l'activation des ERKs était requise afin d'induire une réorganisation des sarcomères par des agonistes hypertrophiques. Des travaux plus récents (Bueno et al. 2000) ont réaffirmer l'importance de l'activation des ERK1/2 dans l'hypertrophie cardiaque caractérisée par une augmentation de la dimension cellulaire et par la réorganisation des sarcomères dans les cellules de rats nouveau-nés infectées avec l'adénovirus exprimant la forme active de MEK1 (MEK1 étant une étape avant ERK1/2 dans la cascade des kinases).

Toutefois, d'autres investigateurs ont mis en doute la contribution de l'activation de ERK1/2 en réponse à plusieurs agonistes dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque (Thoburn et al. 1994; Choukroun et al. 1998). Contrairement aux travaux de Bueno et al. (2000) qui démontraient une augmentation de l'incorporation de leucine H<sup>3</sup> dans les cellules exprimant la forme active de MEK1, ceux de Calderone et al. (2000), effectués également sur des cellules de rats nouveau-nés, démontrent que l'activation des ERK1/2 par la stimulation des récepteurs adrénergiques et ceux de l'endothéline (ET-1) n'augmentait pas l'incorporation de leucine H<sup>3</sup> dans les cardiomyocytes. L'incorporation de leucine H<sup>3</sup> dans ces études est un indice de la synthèse protéique et donc d'hypertrophie.

Néanmoins, alors que plusieurs investigateurs ont démontré une activation des MAP kinases à la suite d'une stimulation adrénergique dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés ou de souris transgéniques, Communal et al (2000) ont démontré qu'elles peuvent être activées dans les cardiomyocytes isolés de rats adultes. Comme nous l'avons déjà stipulé, la réponse finale de l'activation d'une des cascades des kinases pourrait différer entre les cardiomyocytes provenant d'un animal nouveau-né et ceux provenant d'un animal adulte. Il est donc trop tôt pour dire si la controverse sur l'implication de l'activation des ERKs dans l'hypertrophie des

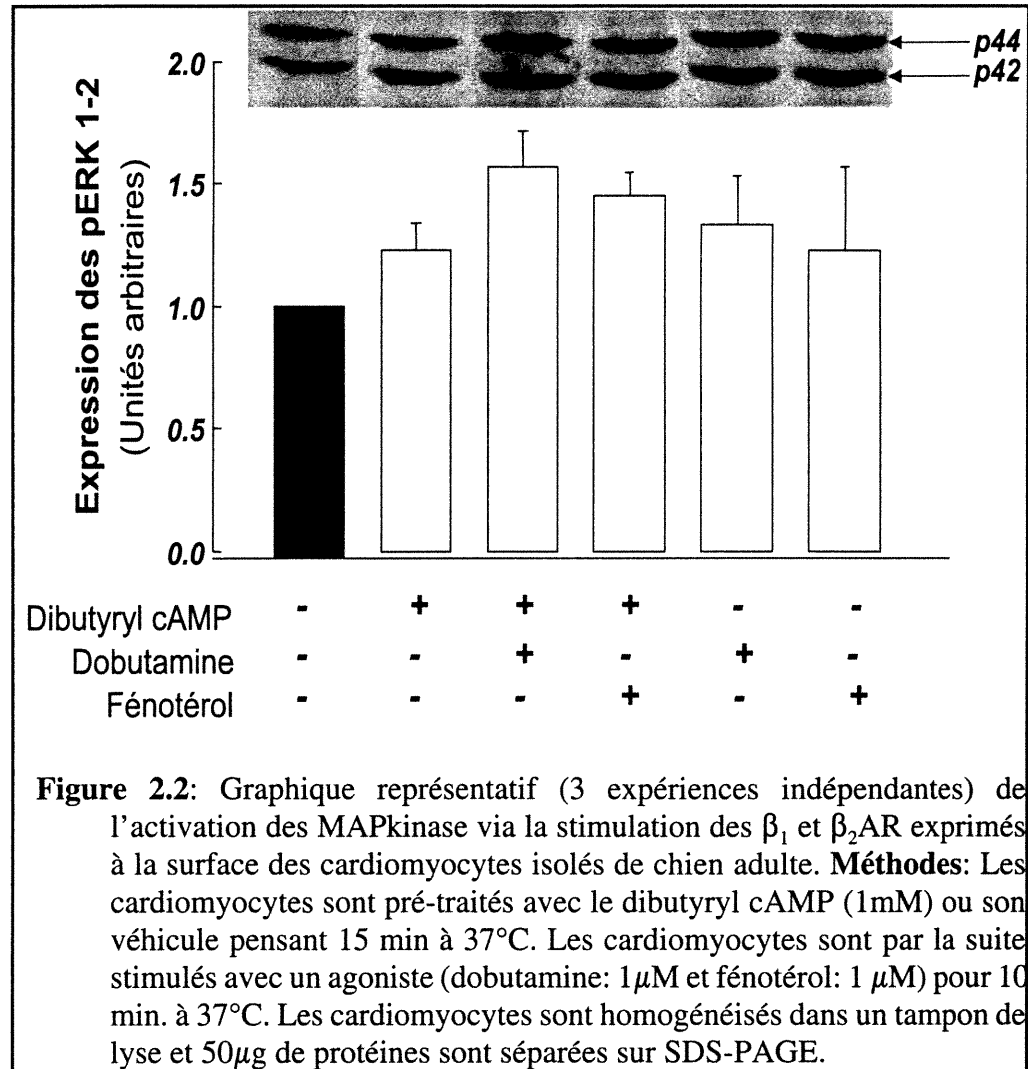
cardiomyocytes de rats nouveau-nés persiste dans les cardiomyocytes adultes.

La figure 2.2 présente donc des résultats préliminaires qui démontrent que les MAP kinases, plus précisément ERK1/2 peuvent aussi être activées dans les cardiomyocytes de chien adulte par une stimulation des  $\beta$ ARs. À savoir si l'activation des MAPK-ERK1/2 par la stimulation  $\beta$ -adrénergique induit une régulation de l'hypertrophie cellulaire (ex; réorganisation des sarcomères ou incorporation de leucine  $H^3$ ) nécessite évidemment une étude beaucoup plus approfondie. Ainsi, l'activation de ERK1/2 par la stimulation  $\beta$ -adrénergique observée dans les cardiomyocytes de chien adulte, fournit un indice sur la capacité potentielle des  $\beta$ ARs cardiaques d'induire une hypertrophie associée à l'insuffisance cardiaque. Ainsi le modèle d'isolation de cardiomyocytes de chien (sains ou en insuffisance cardiaque induite par entraînement rapide des ventricules) pourrait être utilisé afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'hypertrophie.

De plus, puisque les deux sous types de récepteurs sont exprimés à la surface des cardiomyocytes, on peut se poser les questions suivantes ; premièrement est-ce que les  $\beta_1$  et les  $\beta_2$ ARs contribuent de façon

équivalente à cette activation de la voie des MAP kinases, et deuxièmement, utilisent-ils la même voie de signalisation ? Jusqu'à présent, il n'y a pas de réponse claire à ces questions. De plus, il existe une certaine controverse concernant le couplage des  $\beta_1$ ARs avec les protéines Gi. En effet, les travaux de Xiao et al. (1999) suggèrent que les  $\beta_1$ ARs cardiaques n'aient pas la capacité de se coupler avec les protéines Gi. Au contraire, les résultats présentés par Communal et al. (2000) démontrent que l'activation des MAP kinases par la stimulation des  $\beta$ ARs cardiaques serait dépendante de la protéine Gi. Le résultat de la figure 2.2 est un indice de la capacité des deux sous types de récepteurs d'induire l'activation des MAP kinases dans les cardiomyocytes de chiens. La nature exacte des mécanismes impliqués n'est pas encore bien définie, cependant, la notion du récepteur phosphorylé par PKA qui permet d'induire l'activation des MAP kinases est envisageable (voir la figure 2.1).





Les raisons exactes qui expliquent la réactivation de ces proto-oncogènes ne sont pas encore bien comprises. Certains pensent que le retour du coeur vers une forme plus primitive, ayant un phénotype comparable à celui observé dans le coeur foetal, offrirait l'avantage de

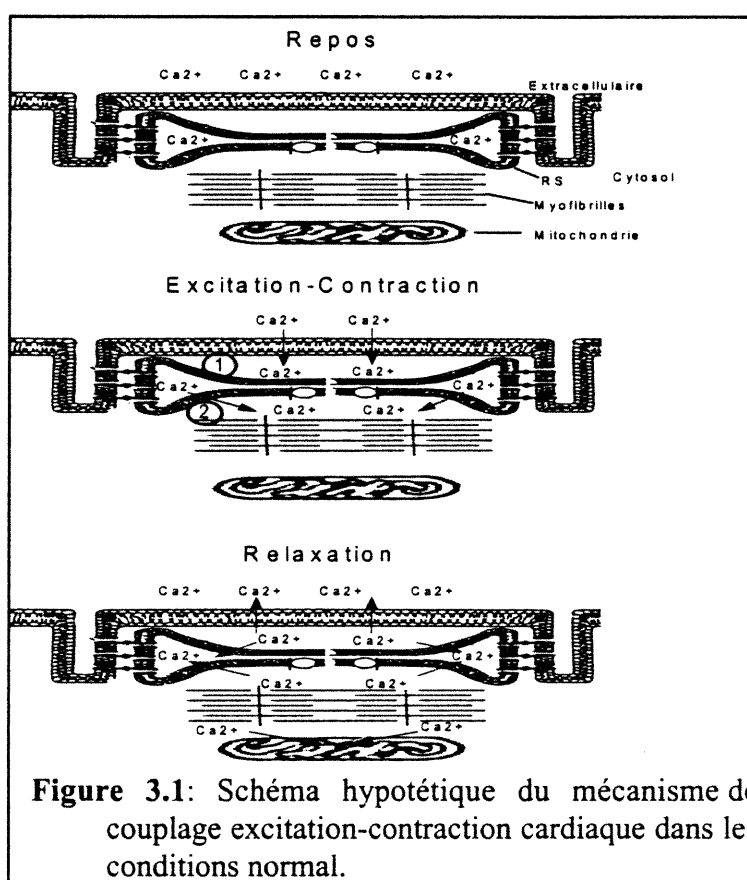
réduire la consommation d'énergie dans le coeur insuffisant. Ainsi, dans le coeur en insuffisance cardiaque, comme dans le coeur foetal, le myocarde serait plus enclin à dépendre de la glycolyse comme source énergétique, ce qui l'affaiblirait (Kagaya et al. 1990). Également, le coeur en insuffisance cardiaque dépendrait davantage du calcium extracellulaire, ce qui ralentirait les mécanismes d'excitation-contraction et de relaxation qui demandent beaucoup d'énergie (Katz 1999).

### **CHAPITRE 3: Couplage Excitation-Contraction**

### **3.1 Introduction**

Le processus d'excitation-contraction qui active la contraction des cardiomyocytes ventriculaires est initié par l'arrivée de l'impulsion cardiaque venant du noeud sinusal. Le potentiel d'action ainsi généré permet d'augmenter l'ouverture des canaux calciques voltage dépendant situés à la surface des cardiomyocytes. C'est en effet une série de mouvements des ions calciums à l'intérieur de la cellule qui déclenche la contraction. La contraction se produit lorsque les protéines de contraction sensibles aux mouvement de calcium s'activent et transforment l'énergie chimique fournie par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique. La relaxation des fibres musculaires, qui détermine la fin de la contraction, est dépendante de la vitesse de retrait de ces ions calciums du cytosol. Le calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique est en majeure partie responsable de cette vague calcique intracellulaire. Par contre, les ions calciums extracellulaires entrant par les canaux calciques de surface sont, quoique minimes, déterminants pour induire une libération massive de calcium par le réticulum sarcoplasmique. Ce mécanisme est connu sous l'appellation de "calcium induced calcium release". Grâce aux propriétés d'emmagasinage des ions calcium par le réticulum sarcoplasmique, la cellule peut maintenir un gradient de calcium avec le milieu extracellulaire qui se situe dans l'ordre du 1 pour 10 000. La concentration intracellulaire de calcium se situe dans les environs de 100nM pendant les périodes de diastole alors qu'elle peut

monter jusqu'à  $10 \mu\text{M}$  lors de la systole. À la fin d'une contraction, la cellule retourne à l'état de repos grâce à des mécanismes de relaxation qui sont régulés par le ré-emmagasinage des ions calcium dans le réticulum sarcoplasmique (figure 3.1).



### ***3.2 Courant calcique voltage dépendant***

Dans l'insuffisance cardiaque induite par l'entraînement rapide des ventricules, des modifications se produisent à presque tous les niveaux du processus d'excitation-contraction. En effet, certains ont observé, grâce à des mesures effectuées par voltage imposé (patch-clamp) en configuration "cellules entières", une diminution du courant calcique basal entrant par les canaux calciques voltage dépendant (Mukherjee et al. 1998). Une diminution de ce flux de calcium contribue, en partie, à la réduction des capacités contractiles de la cellule. Les canaux calciques du sarcolemme sont représentés majoritairement par les canaux du type "L" ou "long lasting". Ces canaux sont aussi appelés récepteur à la dihydropyridine, une substance avec laquelle ils ont une forte affinité. D'autres types de canaux calciques ont également été évoqués, soient les canaux de type T, N, P, Q et R, (Tsien et Tsien, 1990). Cependant, seuls les canaux de type T et L sont pertinents au système cardio-vasculaire. L'apport de l'effet des canaux de type T dans les ventricules est encore en ce jour controversé. Cependant, on leur attribue un rôle certain dans les oreillettes et le tissu vasculaire lisse.

Dans l'insuffisance cardiaque induite par entraînement ventriculaire rapide chez le chien, nous avons observé une réduction du courant calcique, normalisé en fonction de la capacité membranaire (pF), en réponse à l'isoproterenol (figure 5.4B). Ce résultat a également été observé par un

autre groupe travaillant sur ce même modèle (Kääb et al. 96). La diminution du courant calcique exprimé en pA/pF peut être la conséquence d'une baisse de la capacité des  $\beta$ ARs cardiaques d'induire l'ouverture des canaux calciques et/ou d'une diminution de la densité des canaux calciques exprimés à la surface des cardiomyocytes (Murkerjee et al. 1998). Toutefois, nous avons également noté que même si le courant normalisé est diminué en réponse à l'isoprotérénol, la quantité d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans ces cellules est comparable à celle entrant dans les cellules témoins. Cette dernière observation suggère que la diminution de la densité des canaux calciques observée par Murkerjee et al. (1998) pourrait être le résultat d'une augmentation de la surface membranaire sans changement du nombre total de canaux. Dans une telle situation, l'ouverture des canaux calciques engendrée par la stimulation  $\beta$ -adrénergique pourrait être préservée. En alternative, des résultats intéressants, rapportés par Schröder *et al.* (1998), ont démontré que les mesures de disponibilités et de probabilités d'ouverture des canaux calciques unitaires des cardiomyocytes dérivés de coeurs humains en insuffisance cardiaque seraient augmentées. Cette augmentation serait en fait reliée à un ralentissement des mécanismes de déphosphorylation des canaux. Ainsi, dans une cellule hypertrophiée possédant un plus grand volume, la diminution du nombre de canaux de type-L ayant cependant une plus grande disponibilité d'ouverture, pourrait expliquer qu'il y ait autant d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  entrant, mais que la concentration

apparaisse inférieure lorsque les cellules sont normalisées par unité de surface.

La normalisation des courants calciques soulève une question intéressante, à savoir si le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant est distribué uniformément dans la cellule ou localisé dans des compartiments bien définis? L'hypothèse de Popescu et al. (1974) suggérant que les mécanismes du couplage excitation-contraction des muscles lisses soient compartimentés dans les caveolae, est en pleine renaissance. En effet, des résultats rapportés suggèrent que les caveolae des cardiomyocytes soient des sites d'entrée et d'emmagasinage pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, les  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, les récepteurs  $\text{IP}_3$  et la calmoduline, des molécules importantes à la régulation du calcium intracellulaire ainsi que les  $\beta$ ARs, les protéines Gs et l'adénylyl cyclase, pourraient se retrouver dans ces micro-domaines riches en caveolines (Okamoto et al. 1998, Anderson 1998; Laflamme et al. 1999; Schwencke et al. 1999). Dans un tel cas, même si la concentration (nombre d'ions par unité de surface) de calcium entrant dans une cellule hypertrophiée est diminuée en réponse à l'isoprotérénol (figure 5.4B), le nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  disponible pour le réticulum sarcoplasmique pourrait être le même (figure 5.4A). Ainsi, la réduction des propriétés contractiles observée, pourrait également s'expliquer par un problème de gestion de ce



$\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire devenant alors toxique, plutôt qu'une baisse de la réponse  $\beta$ -adrénergique.

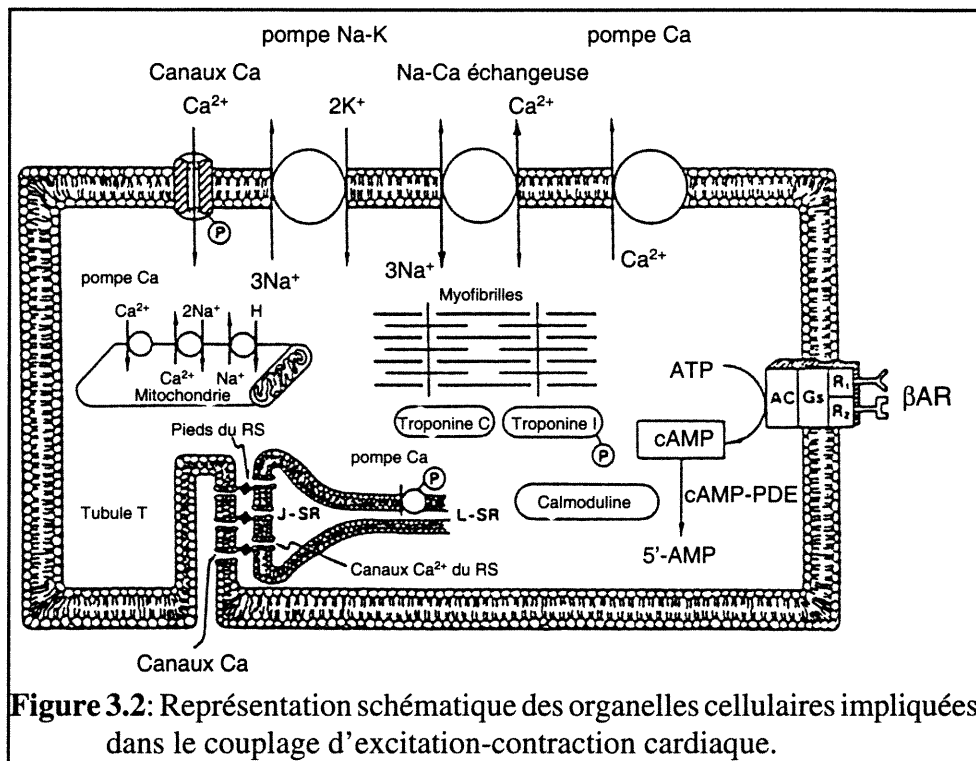
### ***3.3 Régulation du calcium par le réticulum sarcoplasmique***

Lorsque le calcium entre dans la cellule cardiaque, il est pris en charge par le réticulum sarcoplasmique qui, en retour, libère une quantité massive de calcium qui sera utilisée par les protéines contractiles. À la fin de la contraction, le calcium est emmagasiné de nouveau dans le réticulum sarcoplasmique pour les contractions subséquentes. Des études précédentes ont démontré que le modèle d'insuffisance cardiaque induite par entraînement ventriculaire rapide est aussi associée à une réduction du ré-emmagasinage des ions calcium ainsi que de la libération de ces ions par le réticulum sarcoplasmique (O'Brien et al., 91; Cory et al., 93 O'Rourke et al., 99). L'expression de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase du réticulum sarcoplasmique calcium (SERCA2), une protéine responsable de pomper le calcium à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique, serait diminuée dans l'insuffisance cardiaque (O'Rourke et al., 1999). L'activité de cette protéine, mesurée dans le tissu cardiaque insuffisant, est également compromise (O'Brien et al., 1991). Ainsi, la quantité d'ions calcium disponible pour la contraction atteint un équilibre inférieur à la normale qui se traduirait par une baisse de la force de contraction du muscle cardiaque. De plus, certains ont observé une diminution des récepteurs de la ryanodine exprimés à la surface du réticulum

sarcoplasmique (Vatner et al., 94). Le récepteur de la ryanodine est un canal calcique chargé de la libération de la réserve de calcium localisé dans le réticulum sarcoplasmique.

### ***3.4 L'échangeur de sodium / calcium***

L'échangeur sodium / calcium est une autre protéine responsable de l'équilibre du calcium intracellulaire des cellules cardiaques (figure 3.2). Dans ce modèle d'insuffisance cardiaque, l'activité de cette protéine semble être augmentée afin de compenser pour la réduction de l'activité de la pompe SERCA2 et d'éviter que le calcium s'accumule dans le cytosol. Cependant, son action a pour effet d'exclure le calcium vers l'extérieur de la cellule, ce qui réduit la quantité des ions  $Ca^{2+}$  pouvant être emmagasinés dans le réticulum sarcoplasmique (O'Rourke et al., 1999). Ainsi, le réticulum sarcoplasmique posséderait moins de calcium disponible pour les contractions subséquentes.



**Figure 3.2:** Représentation schématique des organelles cellulaires impliquées dans le couplage d'excitation-contraction cardiaque.

## **CHAPITRE 4: Mécanisme de régulation des $\beta$ ARs cardiaques**

#### **4.1 Introduction**

La désensibilisation (perte de réponse) et la régulation négative (diminution du nombre total de récepteurs) des  $\beta$ ARs ont été observées dans plusieurs pathologies cardiaques, incluant certaines formes d'insuffisance cardiaque. Ces deux mécanismes de régulation (désensibilisation et régulation négative) sont, dans l'insuffisance cardiaque, intimement liés à l'augmentation des catécholamines plasmatiques. Cette hypothèse est basée sur le processus bien connu de désensibilisation rapide des  $\beta$ ARs après une stimulation soutenue par un agoniste. Des observations faites dans des lignées cellulaires surexprimant le  $\beta_2$ AR ont permis d'en déduire ce phénomène. Cependant, il y a des raisons de douter que la validité de cette hypothèse puisse être transposée intégralement à la régulation des  $\beta_1$ ARs et en particulier des  $\beta_1$ ARs spontanément exprimés dans les cardiomyocytes.

#### **4.2 Le dogme de la régulation des $\beta$ ARs**

Le processus de désensibilisation et de régulation négative en réponse à une stimulation adrénergique soutenue a déjà été très bien caractérisé (pour un résumé complet Kobilka et al. 1992). Brièvement, cela implique une phosphorylation des  $\beta$ ARs par au moins deux types de protéines kinases, soit la PKA et GRK. La phosphorylation des  $\beta_2$ ARs par PKA est observée lorsque l'agoniste est à basse concentration (figure 1.4B), alors que la phosphorylation par GRK est observée lorsque l'agoniste est à

forte concentration (figure 1.4A). La phosphorylation du récepteur par GRK permet l'interaction du récepteur avec une autre protéine  $\beta$ -arrestine qui complèterait l'inhibition du récepteur. La phosphorylation induit un découplage du complexe  $\beta$ AR / Gs (désensibilisation). Une translocation du récepteur dans un compartiment inaccessible aux ligands hydrophiliques (séquestration) est également observée dans les premières minutes de stimulation du récepteur. Le récepteur séquestré serait par la suite soit déphosphorylé et retourné à la membrane ou encore dégradé (régulation négative). Ce dernier mécanisme est observé plus particulièrement lorsque la stimulation persiste au-delà d'une période de 60 minutes.

#### ***4.3 Mécanisme de régulation distinct entre $\beta_1$ et $\beta_2$ AR***

Contrairement à l'abondance d'information sur la désensibilisation des  $\beta_2$ ARs, il existe relativement peu de documentations sur la régulation des  $\beta_1$ ARs. Cependant, les travaux effectués sur des cellules en culture ou sur du tissu exprimant les deux sous-types de récepteurs, nous suggèrent que les  $\beta_1$ ARs et les  $\beta_2$ ARs pourraient avoir une régulation distincte. Effectivement, contrairement aux études traitant des  $\beta_2$ ARs dont la désensibilisation se produit dans les premières secondes après le début de la stimulation, la désensibilisation des  $\beta_1$ ARs serait un processus beaucoup plus long. Lorsque exprimés dans les neuroblastes, les  $\beta_1$ ARs ne présenteraient aucun signe de désensibilisation avant les 60 premières

minutes de stimulation (Fishman et al. 1991). Dans les cellules gliales  $C_6$ , qui expriment les deux types de récepteur, les agonistes partiels celiprolol et pindolol ont induit une régulation négative des  $\beta_2$ ARs sans affecter la densité des  $\beta_1$ ARs (Neve et al. 1985). L'expression sélective de l'un ou l'autre de ces récepteurs dans les CHW, démontre clairement une régulation plus lente des  $\beta_1$ ARs (Suzuki et al. 1992). L'étude de Valet et al. (1989), effectuée sur des chiens ayant subis une dénervation sinoaortique pendant une période de 6 semaines, démontre qu' *in vivo* la régulation de ces deux sous-types de  $\beta$ ARs est également différente. En effet, dans ce modèle pathologique, les niveaux de noradrénaline et d'adrénaline plasmatique sont simultanément augmentés en association avec une réduction de 78% de la densité des  $\beta_2$ ARs dans les cellules adipeuses alors qu'il n'y avait aucun changement des  $\beta_1$ ARs. De la même façon l'augmentation de la lipolyse induite par la stimulation des  $\beta_2$ ARs était réduite alors que la lipolyse induite par les  $\beta_1$ ARs n'était pas changée. De plus, contrairement au  $\beta_2$ AR, il semble que le  $\beta_1$ AR ne soit pas un bon substrat pour les GRKs (Zhou et al., 91). Cette dernière observation a des conséquences primordiales pour l'étude de l'insuffisance cardiaque. En effet, plusieurs ont déjà rapporté une augmentation de l'expression des GRKs dans cette pathologie et l'ont associée à la régulation négative des  $\beta_1$ ARs. Toutefois, Ping et al. (1994) ont démontré que l'augmentation de l'expression des GRKs devance les modifications du système de transduction  $\beta$ AR dans le modèle de porc en insuffisance

cardiaque induite par entraînement rapide des ventricules. Cette dernière observation est inconsistante avec la régulation rapide proposée pour le  $\beta_2$ AR. Cependant, elle corrobore les résultats rapportés par Zhou et al. (1991).

#### ***4.3.1 Aspect intrinsèque des $\beta_1$ ARs***

Il est important de considérer que ces deux sous types de  $\beta$ ARs sont les produits de deux gènes différents, et que leur homologie n'est que d'environ 54% (Frielle et al. 1987). Une telle différence structurale peut camoufler des déterminants moléculaires responsables de cette régulation propre aux  $\beta_1$ ARs. Les travaux de Rousseau et al. (1996) ont démontré qu'en remplaçant la partie carboxyterminale des  $\beta_1$ ARs avec celle des  $\beta_2$ ARs, la nouvelle chimère  $\beta_1/\beta_2$  avait les mêmes caractéristiques de désensibilisation que le  $\beta_2$ AR natif. De même, la chimère  $\beta_2/\beta_1$  avait les caractéristiques de désensibilisation du  $\beta_1$ AR natif. Il est possible que la différence, dans l'intensité de la désensibilisation, soit due au fait que le  $\beta_1$ AR ne possède qu'un seul site de phosphorylation pour PKA dans sa troisième boucle intracellulaire. Ainsi, le  $\beta_1$ AR serait dépourvu du deuxième site présent dans la partie carboxyterminale du  $\beta_2$ AR. De plus, il est également possible que ce deuxième site de phosphorylation ne soit accessible à la PKA que pendant la liaison du récepteur avec son agoniste. Pour les GRK leurs sites de phosphorylation seraient au niveau des sérines et des



thréonines dans la région distale de la partie carboxyterminale du récepteur (Lhose et al. 1990; Bouvier et al. 1988). Des nombres équivalents de résidus sérines et de thréonines ont été identifiés dans la partie carboxyterminale des  $\beta_1$ ARs (Green et liggett 1994) et des  $\beta_2$ ARs (O'Dowd et al. 1988) humains. Ainsi, la différence entre la désensibilisation spécifique des deux récepteurs peut résider dans la divergence de la séquence primaire des deux récepteurs ou dans la faible affinité des  $\beta$ -arrestine pour les  $\beta_1$ ARs.

#### ***4.3.2 Expression des $\beta_1$ ARs et Structure des cardiomyocytes***

Il est également possible que les  $\beta_1$ ARs spontanément exprimés dans les cardiomyocytes aient une régulation distincte de ceux surexprimés dans les lignées cellulaires. Cette différence, par contre, au lieu d'être inhérente au récepteur, pourrait être reliée à la structure des cardiomyocytes. En effet, les cardiomyocytes sont des cellules très spécialisées pour la contraction et possèdent donc des structures internes complexes telles que les tubules T et l'appareil contractile. De telles structures sont absentes lorsque le  $\beta$ AR est étudié dans les lignés cellulaires. Se basant sur les résultats obtenus concernant la capacité des  $\beta_2$ ARs à produire une contraction et induire un mouvement de calcium intracellulaire, certains ont proposé que les  $\beta_1$ ARs seraient surtout présents près des tubules T. La proximité des  $\beta_1$ ARs avec les tubules T permettrait au récepteur d'avoir cet effet direct sur la contraction cellulaire. Contrairement aux  $\beta_1$ , les  $\beta_2$ ARs seraient moins

centralisés, donc répartis à la surface des cardiomyocytes. Ceci pourrait expliquer certaines observations qui démontrent que les  $\beta_2$ ARs n'accélèrent pas la recapture des ions calcium à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique (Xiao et al. 1993). Le regroupement des  $\beta_1$ ARs près de structures spécifiques pourrait avoir un effet protecteur contre les stimuli externes capables d'augmenter l'AMP cyclique.

De plus, contrairement aux  $\beta_2$ ARs qui peuvent être séquestrés dans des vésicules (ou puits) tapissées de Clathrine "clathrin-coated pits", il est suggéré que les  $\beta_1$ ARs pourraient être séquestrés dans des vésicules nommées "caveolae" dont la membrane interne est recouverte de cavéoline en plus d'être riche en glycosyl-phosphatidylinositol et en cholestérol (Rothberg KG. et al. 1992). Cette structure serait en fait le résultat d'une modification des tubules T qui demeureraient associées à la partie interne de la membrane plasmique sans se détacher contrairement aux "coated pits" associés à l'internalisation des  $\beta_2$ ARs (Anderson et al. 1993; Rothberg et al. 1992). Ces vésicules seraient également un lieu de rencontre pour certaines formes de PKC activées et d'accumulation d'oxyde nitrique (Rybin et al. 1999; Hare et al. 2000). Si tel est le cas, cela pourrait expliquer certains de nos récents résultats présentés dans le chapitre 6.

#### **4.4 Régulation des $\beta$ ARs par la PKC**

En effet, la présence des PKC dans les caveolae pourrait effectivement faciliter leur capacité d'induire une certaine régulation sur les  $\beta$ ARs. Dans les cardiomyocytes, il a été démontré que l'activation de la PKC pouvait avoir un rôle de cardioprotection (Mitchell MB. et al. 1995; Cohen MV. et al. 1996). Il est également démontré que certaines formes de PKC peuvent être activées par le mouvement de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et conduire à certains phénomènes de cardioprotection tel que le pré-conditionnement au  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang et al. 1999). Dans ce même ordre d'idée, des résultats intéressants rapportés par Muth et al. (1999) ont démontré un nouveau mécanisme de régulation des  $\beta$ ARs qui inclurait l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux calciques de type-L et l'activation des PKCs. Une désensibilisation rapide des  $\beta$ ARs cardiaques par l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  et l'activation des PKCs pourrait effectivement offrir un effet cardioprotecteur contre la surcharge calcique.

Les PKCs sont mieux connues pour leur rôle très important dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire et tissulaire. De plus, elles sont impliquées dans les réactions croisées des différentes voies de signalisation des récepteurs cardiaques. Les PKCs forment une famille d'au moins 12 isoformes codées par neuf gènes (Nishisuka, 1988; Asaoka et al., 1992). Elles sont constituées de 4 sous-unités bien conservées (C1 à

C4) et de 5 régions variables (Nishisuka 1992; Newton 1997). On les subdivise en 3 groupes selon leur structure et le cofacteur impliqué dans leur régulation. Les mieux caractérisées présentement sont les PKC dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  (cPKC) représentées par les isoenzymes  $\alpha$ , les deux variantes  $\beta$  ( $\beta\text{I}$  et  $\beta\text{II}$ ) et finalement la  $\gamma$  isoenzyme. La particularité de ce groupe est la présence de sites putatifs pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans les sous-unités C1 et C2 qui seraient chargées de la régulation de la protéine kinase. De plus, ces sous-unités posséderaient également des sites de liaison pour la phosphatidylsérine (PS) et le diacylglycérol (DG) responsables de l'activation de la kinase. La deuxième classe représentée par les *novel* PKCs (nPKC), est composée des isoenzymes suivants;  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta(\text{L})$ ,  $\theta$ , et  $\mu$ . Structuralement, elles ressemblent à la cPKC, cependant, leur domaine C2 est dépourvu du site de fixation pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Toutefois, le DG et la PS auraient toujours la capacité d'activer cette classe de kinases. La troisième et dernière classe est constituée par des PKCs atypiques (aPKC)  $\pi$ ,  $\tau$ , et  $\zeta$  isoenzymes. Cette classe de PKC ne contient qu'un motif riche en cystéine dans le domaine C1 et est dépourvue des résidus clefs qui maintiennent le domaine C2 replié. Alors que leur activation est toujours régularisée par la PS, elles ne requièrent pas la présence de DG (Nishisuka 1992; Newton 1997).

On sait que normalement la PKC est activée par le DG, résultant d'une hydrolyse de phospholipides par l'action d'une phospholipase C

activée par certains récepteurs. L'activation exercée par le DG sur la PKC peut n'avoir qu'un effet limité dans le temps car le DG perd tout effet dès qu'il est phosphorylé en acide phosphatidique. Or l'action du DG est imitée par des substances toxiques tirées de plantes, les esters de phorbol. L'un d'eux, le phorbol 12-myristate-13 acétate (PMA) est couramment utilisé pour l'étude des PKC. Au contact de la PMA, la kinase C s'active puis vient s'attacher rapidement à la membrane. Ainsi, lors de leur activation, les PKCs subissent une translocation à la membrane qui est transitoire si elle n'est pas stabilisée par un autre mécanisme. En effet, certaines protéines d'ancrage ayant des sites de liaison pour les PKCs ont été identifiées et la mieux caractérisée est celle du récepteur pour les kinases-C activées (RACK) (Mochly-Rosen et al. 1991). Il a été démontré que la liaison des PKCs avec RACK est à son maximum lorsque les PS, DG et les ions  $Ca^{2+}$  sont présents (Mochly-Rosen et al. 1995). D'autres types de liaison ont également été identifiés sur la protéine de liaison périnucléique (PICK1) (Staudinger et al. 1995) et sur la protéine d'ancrage des PKA (AKAP) (Klauck et al. 1996). Il est possible que la phosphatase 2B (calcineurine), qui se lie avec AKAP, soit capable d'inactiver les PKCs (Newton 1996). Il est donc suggéré qu'il existe un mécanisme qui permet l'ancrage avec RACK lors de l'activation des PKCs et un mécanisme de transfert vers un autre site de liaison tel que l'AKAP pour les désactiver.

Au niveau cardiaque on retrouve principalement les cPKC, à l'exception de la  $\gamma$  isoenzyme et de quelques isoformes indépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  tels que  $\delta$  et  $\zeta$  (Mochly-Rosen et al. 1990; Inoguchi et al., 1992). Dans les cardiomyocytes, les PKCs présentent des différences dans leur distribution avant et après leur translocation à la suite d'une activation. En effet, dans des cardiomyocytes de rat non-traités les PKC $\beta$ II seraient associées avec les myofibrilles et re-localisées en périphérie du noyau et de la cellule après traitement avec les esters de phorbol. De façon similaire, les PKC $\alpha$  et les PKC $\zeta$  subissent une translocation du cytosol vers la membrane nucléaire, alors que les PKC $\beta$ I localisées dans le cytosol et autour du noyau sont aperçues dans le noyau après traitement avec PMA (Disatnik et al 1994).

Il a été démontré, qu'une fois activées les PKCs ont la capacité de phosphoryler le  $\beta_2$ AR et d'induire une désensibilisation du récepteur (Bouvier et al. 1987; 1991). Il n'est donc pas impossible que les PKCs puissent avoir un effet semblable sur le  $\beta_1$ AR. D'ailleurs, une étude a démontré que l'augmentation des PKC par l'angiotensine II pouvait réduire la réponse contractile des  $\beta_1$ AR (mais pas celle des  $\beta_2$ AR) dans un modèle de coeur de rat isolé (Schwartz et Naff 1997). Ainsi, il apparaît que les mécanismes de régulation rapide des  $\beta$ ARs cardiaques ne seraient pas seulement associés au schéma représentatif de la régulation observé initialement pour le  $\beta_2$ AR.

De plus, les résultats que nous présentons dans le chapitre 7, se rapportent à l'effet des cytokines sur les  $\beta$ ARs exprimés dans les cardiomyocytes isolés. Ces résultats, sont d'autres exemples de mécanismes de régulation pouvant être reliés à la désensibilisation rapide des  $\beta$ ARs cardiaques.

#### ***4.5 Régulation des $\beta$ ARs par les cytokines***

Depuis quelques années nous savons que les cytokines sont capables d'induire un effet inotrope négatif (Ungureanu-Longrois D. et al. 1995; Finkel 1992). Cet effet semble être relié à la capacité des cytokines d'induire l'activation de l'oxyde nitrique synthase et la production d'oxyde nitrique (NO) (Ing DJ 1999). La formation du complexe hème-NO dans le cytosol augmente l'activité catalytique de la guanylyl cyclase et stimule la production de GMP cyclique ainsi que la protéine kinase dépendante de cGMP (PKG) (Moncada S et al. 1991; Ignarro LJ 1985). Une fois activée, la PKG aurait plusieurs protéines cibles, notamment les canaux calciques de type-L (Whaler 1995) et la sous-unité inhibitrice de la troponine (Pfitzer G 1982). Cette dernière diminuerait la sensibilité des myofilaments aux ions calcium (Vila-Petroff 1999) réduisant ainsi les fonctions contractiles de la cellule.

La régulation des  $\beta$ ARs par les cytokines demeure toutefois peu caractérisée. Les travaux de Chung et al. (1990) ont démontré qu'une stimulation prolongée des cardiomyocytes isolés avec des médiateurs de

cellules immunitaires, pouvait induire une diminution du signal de transduction  $\beta$ -adrénergique. Cette désensibilisation  $\beta$ -adrénergique pourrait également contribuer à l'effet inotrope négatif engendré par les cytokines. Le mécanisme par lequel les cytokines induisent cette désensibilisation semble également être relié à la production de NO dans le cytosol. En effet, les résultats présentés par Balligand et al. (1993) ont démontré, que l'effet des facteurs immunitaires sur les  $\beta$ ARs était relié à une augmentation de la production de NO. Dans cette étude Balligand et al. ont émis l'hypothèse d'une voie d'activation des  $G_i$  ou des  $G_o$  par la NO qui inhiberait l'interaction du récepteur avec la  $G_s$  plutôt qu'une phosphorylation des  $\beta$ ARs par la PKG.

Une voie alternative, serait de considérer un effet direct de NO sur les  $\beta$ ARs cardiaques comme celui observé pour le  $\beta_2$ AR exprimé dans les cellules COS7 (Adam et al 1999). En effet, il a été démontré que l'augmentation de NO dans le cytosol peut briser ou empêcher la formation du lien palmitate du  $\beta_2$ AR avec la membrane cytoplasmique réduisant ainsi l'interaction du récepteur avec la  $G_s$ . Un mécanisme semblable pour le  $\beta_1$ AR exprimé au niveau cardiaque est également concevable puisque celui-ci possède deux liens palmitate avec le cytoplasme (voir figure 1.1).



## HYPOTHÈSE ET BUT DU PROJET DE RECHERCHE

En utilisant le modèle d'insuffisance cardiaque induite par l'entraînement rapide des ventricules chez le chien, nous avons observé antérieurement, une réduction de la capacité des nerfs sympathiques efférents (sous stimulation électrique) à libérer la noradrénaline dans la fente synaptique et à modifier les fonctions cardiaques (Cardinal et al. 1996). De plus, comme plusieurs autres (Himura et al., 1993; Kiuchi et al., 1993; Delehanty et al., 1994) nous avons observé une diminution de la concentration de noradrénaline tissulaire cardiaque dans le groupe de chiens en insuffisance cardiaque. Cette baisse de catécholamines tissulaires a été associée à une réduction importante (50%) des mécanismes de capture et/ou d'emmagasinement de la noradrénaline marquée au tritium [<sup>3</sup>H] (Himura et al., 1993), une réduction que nous avons toutefois estimée à seulement 25% en mesurant les catécholamines endogènes (Cardinal et al., 1996). Nos résultats suggéreraient donc, que dans ce modèle, l'augmentation de noradrénaline au niveau de la circulation sanguine pourrait être indépendante des modifications des facteurs reliés à sa libération et à sa capture dans la jonction neuro-effectrice cardiaque. Ainsi, alors que d'autres (Delehanty et al., 1994) ont calculé une corrélation inverse entre l'augmentation de la [<sup>3</sup>H]-noradrénaline interstitielle et la densité des  $\beta$ ARs tissulaire, il est possible qu'à la suite des 6 semaines (d'entraînement rapide des ventricules), les  $\beta$ ARs situés au niveau des jonctions neuro-effectrices ne soient pas autant

affectés par la concentration de noradrénaline libérée ou présente dans la circulation sanguine. Qui plus est, nos résultats démontrent, que dans ce même modèle, la réponse fonctionnelle est plus importante lorsque l'animal est traité avec un agoniste  $\beta$ -adrénergique que pendant l'induction de la libération des catécholamines par la stimulation électrique des ganglions stellaires. Cette dernière observation laisse présager qu'il pourrait y avoir une certaine préservation de l'intégrité des  $\beta$ ARs dans ce modèle d'insuffisance cardiaque.

Plusieurs auteurs ont déjà rapporté une régulation négative des  $\beta$ ARs ainsi qu'une baisse de leur capacité d'induire la génération d'AMP cyclique dans les préparations membranaires de tissu dérivées de ce modèle d'insuffisance cardiaque (Delehanty et al., 1994; Calderone et al., 1991; Juneau et al., 1992; Marzo et al., 1991). Dans la plupart des cas, ces résultats sont présentés en association avec une augmentation des catécholamines circulantes ou interstitielles. Mis à part la signalisation  $\beta$ -adrénergique, d'autres facteurs sont également impliqués dans le dérangement des fonctions cardiaques de ce modèle, on retrouve entre autres des modifications au niveau des protéines contractiles (Spinale et al., 1992), ainsi que dans le mécanisme du couplage excitation-contraction (Altschuld et al., 1995; O'Rourke et al., 1990; Raven et al., 1996; Vatner et al., 1994).

Nombre d'études ont rapporté des mesures sur la contraction et la signalisation  $\beta$ -adrénergique dans ce modèle (Anzai et al., 1998; Calderone et al., 1991; Juneau et al., 1992; Marzo et al., 1991; Kiuchi et al., 1993; Vatner et al.; 1994). Cependant, certains ont rapporté, que malgré une réduction de la signalisation  $\beta$ -adrénergique mesurée dans le tissu, une génération de tension (contraction isométrique) équivalente et une contraction supérieure (contraction isotonique) comparativement au groupe de chiens témoins pouvaient être atteinte lors d'une stimulation avec l'isoprotérénol dans ce modèle de chiens en insuffisance cardiaque (Juneau et al., 1992). Un autre groupe (Vatner et al. (1994), ont démontré qu'il pouvait y avoir une certaine dissociation entre la réponse fonctionnelle obtenue par la stimulation des  $\beta$ ARs et la mesure des modifications du signal de transduction  $\beta$ -adrénergique. En effet, ils ont rapporté qu'après une journée d'entraînement rapide des ventricules une diminution de 50% du  $+dP/dt$  en réponse à l'isoprotérénol est observée, une réduction qu'ils prétendent être hors de proportion avec la modeste modification dans le mécanisme de transduction  $\beta$ -adrénergique. Marzo et al., (1991), au contraire, ont rapporté qu'*in situ* il y'avait une réduction du  $+dP/dt$  en réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique en plus d'une réduction de la densité des  $\beta$ ARs ainsi que de la génération d'AMP cyclique mesurées dans les préparations membranaires de tissu. Jusqu'à présent, toutes ces études rapportant une réponse à la stimulation des  $\beta$ ARs, ont mesuré la densité des

$\beta$ ARs et la génération d'AMP cyclique induite par la stimulation des  $\beta$ ARs à partir d'une préparation de tissu homogénéisé.

Dans cette première partie de ce travail, nous avons donc voulu approfondir la relation entre la réduction des propriétés contractiles et les modifications dans le mécanisme de transduction  $\beta$ -adrénergique mesurées dans l'insuffisance cardiaque. Pour ce faire, nous avons mesuré, à partir du modèle d'insuffisance cardiaque induite par l'entraînement rapide des ventricules (en comparaison avec des coeurs de chien témoin), la contraction et le courant calcique ( $I_{caL}$ ) en réponse à l'isoprotérénol dans les cardiomyocytes isolés. À partir des préparations de sarcolemmes dérivées de ces mêmes cardiomyocytes, nous avons également mesuré la densité des  $\beta$ ARs ainsi que leur capacité de générer la production d'AMP cyclique. Les résultats démontrent que la dépression des fonctions contractiles peut se produire dans ce modèle d'insuffisance cardiaque malgré l'absence de régulation négative et de réduction de la signalisation  $\beta$ -adrénergique, lorsque mesurées dans les cardiomyocytes isolés.

À la suite de ces observations, nous avons étendu nos recherches sur les mécanismes de régulation des  $\beta$ ARs exprimés à la surface des cardiomyocytes. Basé sur le principe que les mécanismes de régulation des  $\beta$ ARs, exprimés dans les lignés cellulaires, sont caractérisés par une

désensibilisation rapide en présence d'un agoniste, nous avons voulu déterminer les effets d'une telle stimulation sur les cardiomyocytes isolés de coeur de chiens. Il est déjà connu que l'intensité de cette désensibilisation peut varier entre les sous-types de  $\beta$ ARs et selon la ligné cellulaire étudiée (Rousseau et al., 1996). Malgré plusieurs indices suggérant une régulation distincte pour le  $\beta_1$ AR (Valet et al., 1989; Vatner et al., 1989; Zhao et al., 1993; Suzuki et al., 1992; Rousseau et al., 1996), on fait quand même souvent référence aux mécanismes de désensibilisation observés pour le  $\beta_2$ AR (i.e. phosphorylation du récepteur par PKA et GRK/ $\beta$ -arrestine) pour expliquer les mécanismes de régulation des  $\beta$ ARs cardiaques représentés majoritairement par le  $\beta_1$ AR. En dépit de l'importance des  $\beta_1$ ARs dans la fonction cardiaque, leur régulation demeure peu définie contrairement aux  $\beta_2$ ARs. La deuxième partie de cet ouvrage, tente justement de mieux comprendre cette régulation en utilisant les mécanismes de régulation déjà établis pour le  $\beta_2$ AR. Pour ce faire, nous avons regardé, en plus de l'effet de différentes périodes de stimulation avec l'isoprotérénol sur la signalisation  $\beta$ -adrénergique des cardiomyocytes, l'effet de l'activation directe des protéines kinase A et C ainsi que l'expression des GRK. Nos résultats démontrent, que sur des cardiomyocytes isolés, les  $\beta$ ARs spontanément exprimés à la surface de ces cellules sont beaucoup plus résistants à la désensibilisation (selon les mécanismes connus) que les  $\beta_2$ ARs surexprimés dans les lignés cellulaires. Cependant, nous ne pouvons écarter la possibilité que la

stimulation soutenue des récepteurs, avec un agoniste adrénergique, puisse induire une désensibilisation rapide des  $\beta_1$ ARs cardiaque en situation *in vivo*. Ainsi, la désensibilisation des  $\beta$ ARs cardiaque pourrait nécessiter la présence de certains ions ou de facteurs extracellulaires absents lorsque les cardiomyocytes sont isolés.

Parmi ces facteurs extracellulaires, la présence de médiateurs immunitaires pourrait avoir une implication sur la régulation des  $\beta$ ARs cardiaques. En effet, les travaux de Chung et al. (1990) ont démontré qu'une stimulation prolongée des cardiomyocytes isolés avec des médiateurs de cellules immunitaires, pouvait induire une diminution du signal de transduction  $\beta$ -adrénergique. Dans le même ordre d'idée, l'expression de ces médiateurs immunitaires, tel que l'interleukine 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) ou l'interleukine 6 (IL-6), dans certains types cellulaires peut être augmentée par la stimulation de la noradrénaline ou de l'isoprotérénol et contribuer significativement au niveau systémique d'IL-6 (Burysek et al., 1997). Par ailleurs, les cytokines ("tumor necrosis factor" (TNF)- $\alpha$ , les interférons- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-6) ont déjà été mesurés en forte concentration dans le coeur en insuffisance cardiaque (Levine et al. 1990; Torre-Amione et al., 1996). Il pourrait également exister une corrélation entre la concentration de l'IL-6, la TNF- $\alpha$  et la sévérité de l'insuffisance cardiaque (MacGowan et al., 1997). Les cytokines sont également connues pour leur effet inotrope négatif via l'induction de NO

intracellulaire (Ungureanu-Longrois et al., 1995; Finkel et al., 1992). Dans cette troisième partie, nous avons donc voulu évaluer l'effet de l'IL-6 sur la régulation des  $\beta$ ARs cardiaques exprimés à la surface des cardiomyocytes isolés. Nos résultats suggèrent qu'il puisse exister un mécanisme permettant à l'IL-6 d'induire une désensibilisation rapide des  $\beta$ ARs cardiaques exprimés à la surface des cardiomyocytes fraîchement isolés chez le chien.

**CHAPITRE 5:  $\beta$ -adrenergic responses in failing cardiomyocytes**



## CHAPITRE 5

**FUNCTIONAL DESENSITIZATION TO ISOPROTERENOL  
WITHOUT REDUCING cAMP PRODUCTION IN  
CANINE FAILING CARDIOMYOCYTES**

Charles-E. Laurent<sup>1,3</sup>, René Cardinal<sup>1,3</sup>, Guy Rousseau<sup>1,3</sup>, Michel Vermeulen<sup>3</sup>,  
Caroline Bouchard<sup>3</sup>, Michael Wilkinson<sup>4</sup>, J. Andrew Armour<sup>5</sup> and Michel Bouvier<sup>2,3</sup>

Départements de <sup>1</sup>pharmacologie et de <sup>2</sup>biochimie, Faculté de médecine, Université de  
Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, <sup>3</sup>Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur  
de Montréal, Montréal, Québec, H4J 1C5, <sup>4</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology  
and <sup>5</sup>Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Dalhousie  
University, Halifax, N.S., B3H 4B7

**Running title:**  $\beta$ -adrenergic responses in failing cardiomyocytes

Correspondence: René Cardinal, Ph.D.  
Centre de recherche  
Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal  
5400, boul. Gouin Ouest  
Montréal, (Québec)  
Canada H4J 1C5  
Tel.: (514) 338-3180, FAX: (514) 338-2694  
E-mail: cardinal@crhsc.umontreal.ca

## 5.1. ABSTRACT

To corroborate alterations in the functional responses to  $\beta$  adrenergic receptor ( $\beta$ AR) stimulation with changes in  $\beta$ AR signaling in failing cardiomyocytes, contractile and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current responses to isoproterenol along with stimulated cAMP generation were compared among cardiomyocytes isolated from canines with tachycardia-induced heart failure or healthy hearts. The magnitude of shortening of failing cardiomyocytes was significantly depressed (by  $22 \pm 4.4\%$ ) under basal conditions and the maximal response to isoproterenol was significantly reduced (by  $45 \pm 18\%$ ). Similar results were obtained when the responses in the rate of contraction and rate of relaxation to isoproterenol were considered. The L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current amplitude measured in failing cardiomyocytes under basal conditions was unchanged but the responses to isoproterenol were significantly reduced in comparison with healthy cells. Isoproterenol-stimulated cAMP generation was similar in sarcolemmal membranes derived from the homogenates of failing ( $45 \pm 6.8$ ) and healthy cardiomyocytes ( $52 \pm 8.5$  pmol cAMP/mg protein/min). However, stimulated cAMP generation was found to be significantly reduced when the membranes were derived from the homogenates of whole tissue (failing:  $67 \pm 8.1$  versus healthy:  $140 \pm 27.8$  pmol cAMP/mg protein/min). Total  $\beta$ AR density was not reduced in membranes derived from either whole tissue or isolated cardiomyocyte homogenates, but the  $\beta_1/\beta_2$  ratio was significantly reduced in the former (failing: 45/55 versus healthy: 72/28) without being altered in the latter (failing: 72/28, healthy: 77/23). We thus conclude that, in tachycardia-induced heart failure, reduction in the functional responses of isolated cardiomyocytes to  $\beta$ AR stimulation may be attributed to alterations in the excitation-contraction machinery rather than to limitation of cyclic AMP generation.

*Key words:*  $\beta$ -adrenergic receptor, heart failure, cardiomyocytes, adenylyl cyclase, contraction

## 5.2. INTRODUCTION

Long-term ventricular pacing at a rapid rate (240/min for 4-6 weeks) induces, in canines and other mammals, low output biventricular failure associated with hemodynamic and neurohumoral manifestations which are thought to be similar to those seen in humans (4). Among the many factors putatively involved in impairment of ventricular function in this model, alterations have been found to occur at the level of the contractile protein content (32), excitation-contraction (E-C) coupling (1, 27, 28, 36), efferent cardiac sympathetic nerves (12) and myocardial  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ AR) signaling (11, 18, 20, 23).

Variables related to both contraction and  $\beta$ AR signaling have been measured in several studies considering this model (3, 11, 18, 20, 23, 29). In papillary muscles excised from healthy or failing canine hearts, Juneau *et al.* (18) found that, although basal contractile activity was depressed, isoproterenol caused a similar increase in tension generation (isometric contraction) and an actually greater increase in shortening (isotonic contraction) in the failing myocardial preparations, in spite of the fact that  $\beta$ AR density and cyclic AMP generation measured in crude membranes derived from whole tissue homogenates were reduced. Vatner *et al.* (36) provided another example of possible dissociation between responses to  $\beta$  agonists and alterations in  $\beta$ AR signaling by reporting that, after only 1 day of rapid pacing, peak left ventricular  $+dP/dt$  increments in response to isoproterenol were depressed by 50%, a marked functional deficit which they deemed to be out of proportion to the modest alteration in  $\beta$ AR signaling mechanisms (20). In

contrast, Marzo *et al.* (23) found that, in the *in situ* situation, there was a depression of the dose-response curve for  $\beta$  agonist-induced increases in peak left ventricular  $+dP/dt$ , along with reductions in  $\beta$ AR density and cyclic AMP generation measured in membranes from whole tissue homogenates. In all previous studies investigating responses to nonselective  $\beta$ AR stimulation,  $\beta$ AR density and  $\beta$ AR-mediated cyclic AMP generation measurements were made only in membranes derived from whole tissue homogenates.

Therefore, we investigated whether depression of the contractile responses to isoproterenol can be detected at the level of the isolated failing cardiomyocytes and, if present, whether the depression could be related to alterations in  $\beta$ AR signaling assessed in membranes extracted from isolated cardiomyocytes. We thus measured contractile and L-type  $Ca^{2+}$  current responses to isoproterenol in cardiomyocytes isolated from healthy and failing hearts, along with the  $\beta$ AR density and  $\beta$ AR-stimulated cyclic AMP generation determined in membranes derived from the isolated cardiomyocytes.

### 5.3. METHODS

*Canine preparations of tachycardia-induced heart failure.* All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and monitored by an institutional animal care committee. Forty-five mongrel canines (18-25 kg) of either sex were anesthetized (Na thiopental, 25 mg/kg, maintenance: isoflurane 1.25%) and mechanically ventilated. A Swan-Ganz catheter inserted via the external jugular vein was introduced into the pulmonary artery. After stabilization, pulmonary capillary wedge pressure and cardiac output (thermodilution technique) were measured. Two-dimensional echocardiography (model 77020AC, Hewlett-Packard Inc.) was performed applying the probe onto the left parasternal area; the video images were recorded on VHS tape (model AG-6300, Panasonic) and subsequently analyzed to estimate the left ventricular end-diastolic dimensions. Under sterile conditions, a bipolar pacing electrode introduced through a neck incision into the right external jugular vein was positioned under fluoroscopy so that its tip lay at the right ventricular apex. The electrode was connected to a pacemaker (model SX 5984, Medtronic Inc., Minneapolis, Minn.) placed in a subcutaneous pocket and activated after recovery from surgery (3 days later) at a rate of 240 beats/min. Pacing was maintained (ascertained daily with a stethoscope) until the development of overt heart failure (12). Each dog was closely monitored to detect clinical signs of cardiac failure (ascites, dyspnea, fatigue, lack of appetite, weight gain) which became apparent after 4-6 weeks.

*Plasma catecholamine.* Venous blood samples (7 mL) were drawn from the conscious animals in the basal state and again before the terminal study. Samples obtained were then placed in heparinized tubes (0.1% EDTA, 0.2% GSH) and centrifuged at 4000

g for 15 min. The plasma was collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Norepinephrine levels were measured by HPLC (12).

*Terminal study (failing hearts and healthy controls).* Once clinical signs of overt heart failure (particularly, signs of respiratory distress) were apparent, the terminal study was promptly scheduled. Twenty-two dogs served as healthy controls (the innocuous character of pacemaker insertion was controlled in 3 sham-operated dogs). The dogs were anesthetized (meperidine 50 mg i.v. and carefully titrated Na thiopental i.v. injection; maintained with isoflurane 1%) and mechanically ventilated. Hemodynamic and functional measurements (wedge pressure, cardiac output, LV dimensions) were repeated for comparison with pre-pacing values. The hearts were then exposed through a left thoracotomy, excised and immediately placed in cold ( $4^{\circ}\text{C}$ ) Tyrode solution (128 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ,  $470\ \mu\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 11 mM dextrose, 4.5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7.4). All chemicals were obtained from Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA, unless specified otherwise. Tissue blocks (0.5-1.0 g) were dissected in cold Tyrode solution from the left ventricular anterior wall and used to prepare homogenates from which crude sarcolemmal membranes were extracted. The remainder of the anterior wall was excised and kept in cold Tyrode solution in which a large diagonal branch of the left anterior descending coronary artery was cannulated for the cardiomyocyte isolation procedure.

*Preparation of isolated cardiomyocytes.* Perfusion was first performed using Tyrode solution (0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , gassed with a 95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$  mixture) to remove blood. Afterwards, perfusion was instituted with  $\text{Ca}^{2+}$  free-HEPES buffer (115 mM NaCl, 5 mM KCl, 35 mM sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM dextrose, 4 mM taurine) supplemented with 5 mM nitrioloacetic acid (5 min). Perfusion was changed to HEPES buffer

solution containing 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and then to HEPES containing 0.05% collagenase (type A, Boehringer Mannheim, Laval, Canada), 0.02% trypsin inhibitor (type II-s) and 0.28 mg/ml protease (type XIV) for 25 min, all solutions being oxygenated and maintained at 37°C. After the collagenase-protease digestion, the perfused region was dissected and transferred to a 50 mL Erlenmeyer flask containing 10 ml of 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  HEPES-collagenase and incubated at 37°C under a stream of  $\text{O}_2$  for 20 min. This procedure was repeated 4 times using fresh HEPES-collagenase solution, collecting and filtering (200  $\mu\text{m}$  nylon filter) the supernatant after each incubation period. The collected aliquots, which contained the isolated cardiomyocytes, were centrifuged (50 g) for 1 min and the pellets were resuspended in 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -HEPES solution (pH 7.4). Cardiomyocyte enrichment and their morphological integrity were verified with an inverted microscope (Diaphot, Nikon Corp., Tokyo, Japan).

Batches of isolated cardiomyocytes were used for 1) crude membrane extraction, 2) studies of contractile activity, and 3) L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current measurement in patch clamp experiments. In preparation for the latter; the cardiomyocytes were kept in kraftbrühe (KB: "energy medium") solution (17) to allow recovery of their electrical properties. The KB solution contained 85 mM KCl, 30 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 5 mM pyruvic acid, 5 mM  $\beta$ -hydroxy butyric acid, 5 mM creatine, 20 mM taurine, 20 mM dextrose, 50 g/l PVP-40, 0.1 mM EGTA, at pH 7.2 adjusted with KOH.

In 19 cases (5 healthy, 14 failing), supernatant collected over the cardiomyocyte pellets was used to measure the  $\beta\text{AR}$  density and  $\beta_1/\beta_2$  AR ratio in a non-cardiomyocyte fraction. The pooled supernatant collections were filtered with a 50  $\mu\text{m}$  nylon filter (retaining any residual cardiomyocyte or debris) and centrifuged twice at 3000 g (5 min). Crude

membranes were prepared from the pellets (containing noncardiomyocytic cells) as described below.

*Contractile responses.* Cardiomyocytes were placed in a 200  $\mu$ L chamber on the plate of an inverted microscope equipped with phase-contrast optics (Diaphot, Nikon Corp., Tokyo, Japan). The cells were perfused with standard Tyrode solution (2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) at a rate of 1 ml/min and field-stimulated at 0.5 Hz (pulses of 5 ms-duration and 1.5 $\times$  threshold-current intensity). Bath temperature was maintained at 37°C with a custom-made Peltier-effect device. A selected cardiomyocyte was visualized under magnification (20 $\times$ ) using a CCD camera (model KP-M10, Hitachi Demshi Ltd., Tokyo, Japan) and television video display. Contraction was measured by tracking motion of the edges on either side of the cell along its longitudinal axis with the use of a video edge motion detector (model VED 105, Crescent Electronics, Sandy, Utah, USA; described in Steadman *et al.*, ref. 34). The analog output of the edge detector ( $I$ ) was converted to a digital format by a data acquisition system (Digidata 1200, Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) and transferred to a PC computer hard disk under the control of Axotape software. Analysis was performed using the Clampfit program of the pClamp 6 software package, extracting the resting length, magnitude of contraction (resting length - minimum length) as well as the maximum time derivative of the cell length during contraction and relaxation (negative and positive  $dI/dt$ , respectively). Measurements were made on a signal averaged from 10 consecutive contractions.

*L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents.* Current-voltage relationships were determined in patch clamp experiments. Cardiomyocytes were transferred into a small (0.2 mL) tissue bath placed on the stage of an inverted microscope and superfused with  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  free solution



containing 140 mM tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES (pH 7.3 - 7.4 adjusted with TEA-OH), 10 mM dextrose, 2 mM 4-aminopyridine, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . The L-type inward calcium current  $I_{\text{Ca,L}}$  was recorded in the whole-cell configuration of the patch clamp technique, using a voltage clamp amplifier (List Medical, Inc., EPC-7) and suction pipettes filled with a solution containing 125 mM CsCl, 20 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 5 mM  $\text{Mg}_2$ -ATP. Currents were monitored on an oscilloscope and stored on a microcomputer hard disk under the control of computer software (pClamp 6, Axon Instruments, Inc.) which was also used to generate the voltage clamp protocols and for data analysis. The voltage dependence of  $I_{\text{Ca,L}}$  activation was determined by delivering depolarizing voltage-clamp pulses (1s duration) in 10 mV increments every 10s, from a holding potential of -50 mV.

*Crude membrane preparations.* Whole tissue blocks, isolated cardiomyocytes or the noncardiomyocytic cell fraction were placed in lysis solution (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  soybean trypsin inhibitor and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  benzamidine) and homogenized with a Polytron (3 bursts of 10s at maximum speed; Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, USA). The homogenate was centrifuged at 1000 g for 5 min at 4°C (whole tissue homogenate was filtered through 3 layers of cheese cloth before the centrifugation step.) The supernatant was removed and centrifuged at 45000 g at 4°C for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 10 mL of the lysis solution and centrifuged at 45000 g. This step was repeated twice and the final pellet was resuspended in an ice cold buffer containing 75 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM EDTA, to a final concentration of 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Protein content was determined by the method of Bradford (5).

*Adenylyl cyclase.* Measurements were made after Salomon *et al.* (30) using 10  $\mu\text{g}$  of membrane protein from tissue or cell homogenates in a total volume of 50  $\mu\text{L}$ . The incubation medium included 0.12 mM ATP, 0.5  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 0.1 mM cAMP, 0.053 mM GTP, 2.8 mM phospho-enolpyruvate, 0.2 unit pyruvate kinase, 1 unit of myokinase, 30 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine and 0.8 mM EDTA. Reactions were initiated by adding the membranes to the incubation medium (37°C) and lasted for 30 min before being stopped by adding 1 mL of ice-cold solution containing 0.4 mM ATP, 0.3 mM cAMP and [ $^3\text{H}$ ]cAMP (25000 cpm), the latter being used to assess the efficiency of the isolation procedure. The cAMP was isolated by sequential chromatography on a Dowex cation-exchange resin and aluminum oxide. Enzyme activity stimulated by isoproterenol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), NaF (10 mM NaF) and forskolin (100  $\mu\text{M}$ ) were determined in duplicate. Isoproterenol concentration-response curves were fitted to a sigmoid using the Allfit computer software.

*$\beta$ -adrenergic receptor binding studies in tissue and cell membrane preparations.* Binding assays were conducted using [ $^{125}\text{I}$ ]iodo-cyanopindolol ([ $^{125}\text{I}$ ]CYP) in crude membranes derived from whole tissue or isolated myocytes (prepared as described above). In preliminary experiments, membrane preparations (10  $\mu\text{g}$  proteins) were incubated in duplicate assay tubes at room temperature for 90 min in a final volume of 500  $\mu\text{L}$  containing 75 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM EDTA and [ $^{125}\text{I}$ ]CYP at concentrations of 10-400 pM. Non specific binding was defined as the one not being displaced by 100  $\mu\text{M}$  isoproterenol. Since there was no difference between  $K_D$  values for [ $^{125}\text{I}$ ]CYP measured in healthy and failing heart membrane preparations (data not shown), the subsequent experiments were done in triplicate using a single saturating concentration

of [ $^{125}\text{I}$ ]CYP (300 pM), non specific binding being determined using 10  $\mu\text{M}$  alprenolol. Binding reactions were stopped by rapid filtration over Whatman GF/C fiberglass filters using a cold buffer solution containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 2 mM EDTA. To determine the proportion of  $\beta_2\text{AR}$  in the total  $\beta\text{AR}$ , competition experiments were done using [ $^{125}\text{I}$ ]CYP (50 pM) and the selective  $\beta_2\text{AR}$  antagonist ICI-118,551 ( $10^{-12}$ - $10^{-4}\text{M}$ ). It is possible that, at 50 pM [ $^{125}\text{I}$ ]CYP, the  $\beta_2\text{AR}$  sites might be slightly overestimated in competition experiments assessing the  $\beta_1/\beta_2$  AR ratio (25) but 50 pM [ $^{125}\text{I}$ ]CYP has been used by other investigators for this purpose (8). Data were subjected to non-linear least-squares regression analysis (15).

*$\beta$ -adrenergic receptor binding studies in tissue slices.* Frozen tissue blocks obtained from 6 healthy and 6 failing hearts were placed in ice-cold Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) and thawed. Micropunctures (2 mm diameter and 350  $\mu\text{m}$  thickness) were prepared using a Mc Ilwain Tissue Chopper and micropunch (37, 38) and placed in separate wells of tissue culture plates, one per well containing 500  $\mu\text{L}$  of ice-cold DPBS. Saturation experiments were done at concentrations of 0.25-3.5 nM of the hydrophilic  $\beta\text{AR}$  antagonist [ $^3\text{H}$ ](-) CGP-12177 (specific activity: 47-53 Ci/mmol). Groups of 6 wells (replicates) were used to determine total binding and 3 replicates were used for nonspecific binding ( $\approx 15\%$  at  $K_D$ , as measured in the presence of ( $\pm$ ) timolol,  $10^{-5}\text{M}$ ). After incubating at  $4^\circ\text{C}$  for 3-5 h, tissues were washed in 500  $\mu\text{L}$  ice-cold DPBS (2 $\times$ 5 min) and prepared for scintillation counting. Receptor density was determined by Eadie-Hofstee analysis of saturation curves (40).

Data are presented as mean  $\pm$  SEM and were compared between failing and healthy heart preparations using Student's *t*-test for unpaired data. Repeated measurements

(multiple isoproterenol concentrations) in the failing and healthy heart groups were analyzed by ANOVA. Differences were considered as statistically significant if  $p < .05$ .

#### 5.4. RESULTS

Cardiac output was significantly reduced by  $61 \pm 3.4\%$  following rapid ventricular pacing for 4-6 weeks in comparison to pre-pacing measurements performed in the same animals (from  $2.9 \pm 0.1$  to  $1.0 \pm 0.1$  L/min,  $p < .001$ ). There were also statistically significant increases in the norepinephrine plasma levels (from  $364 \pm 70$  to  $1336 \pm 186$  pg/mL) and left ventricular end-diastolic volume (from  $62 \pm 2.7$  to  $102 \pm 3.8$  mL).

*Cardiomyocyte contraction and relaxation.* As illustrated in Fig. 1, the cardiomyocytes isolated from failing hearts displayed an elongated resting length  $L_{MAX}$  in comparison with the ones which were isolated from healthy hearts (Table 1,A), in accordance with previous work from other laboratories (33). The magnitude of contraction  $dL$  measured under basal conditions was significantly depressed in failing cardiomyocytes, whether this variable was expressed in  $\mu\text{m}$  units or as a % of resting cell length (Table 1,B). The rate of cell shortening (negative  $dL/dt$ ) during electrically-induced contraction and the lengthening rate during relaxation (positive  $dL/dt$ ) were similar between failing and healthy cardiomyocytes when expressed in  $\mu\text{m}$  units, but they were significantly smaller when the contraction and relaxation were expressed with reference to the resting cell length (Table 1,C).

*Effect of isoproterenol on cardiomyocyte contraction.* In both the failing and the healthy cardiomyocytes, isoproterenol induced significant augmentation of the electrically-induced contractions at all concentrations tested (comparing the basal measurements with those made in the presence of isoproterenol). Inotropic responses to isoproterenol ( $\Delta_{ISO}$

$dL/L_{MAX}$ ) were concentration-dependent in the healthy group but not among the failing cardiomyocytes (Fig. 2); the response to isoproterenol  $10^{-8}$  M was significantly greater in the healthy group than among the failing cells. Similar results were obtained whether the responses were expressed in  $\mu\text{m}$  units (not shown) or as a % of resting cell length (Fig. 2:  $\Delta_{ISO} dL/L_{MAX}$ ). A  $10^{-8}$ M concentration was the maximum that could be used, beyond which the failing cardiomyocytes as well as the healthy ones developed rapid and irregular spontaneous activity preventing electrical stimulation.

*Effects of isoproterenol on the rates of contraction and relaxation.* Isoproterenol induced increases ( $\Delta_{ISO}(dL/dt)/L_{MAX}$ ) in the rate of shortening (Fig. 3,A) and relaxation (Fig. 3,B). The increases in  $(dL/dt)/L_{MAX}$  of the electrically-induced contractions were statistically significant at all concentrations in both the healthy and failing cardiomyocytes. However, significant concentration-dependence could be demonstrated only in the healthy cell group and the maximum responses induced in this group were significantly greater than among the failing cells (Fig. 3, A and B: asterisks). The results were similar whether considering the responses normalized to resting cell length (Fig. 3:  $\Delta_{ISO} (dL/dt)/L_{MAX}$ ) or expressed in  $\mu\text{m/s}$  units (not shown).

*Effects of isoproterenol on L-type  $Ca^{2+}$  currents.* The cell capacitance was significantly increased in the cardiomyocytes isolated from the failing hearts ( $261 \pm 5.2$  pF,  $n=29$  in 6 hearts) in comparison with those isolated from healthy hearts ( $170 \pm 7.4$  pF,  $n=28$  in 8 hearts,  $p < 0.05$ ). Statistical analysis of the I-V curves (using the raw, peak current values) indicated that the currents were significantly voltage-dependent (as expected) and that they were significantly increased under isoproterenol (Fig. 4,A). There was a tendency for the isoproterenol effect to be greater among the healthy than among the failing cells

(interaction:  $p=0.068$ ). When the peak current values were normalized with respect to capacitance (Fig. 4,B), the isoproterenol effect emerged as being significantly greater among the healthy than among the failing cells. Interestingly, the normalized currents measured under basal conditions were similar between the 2 groups. When the slope conductances extracted from the curves determined in each cell were analyzed, we found that this variable was not different between the 2 groups under basal conditions and that it was increased under isoproterenol, this effect being much greater in the healthy than in the failing cells.

*Adenylyl cyclase and  $\beta$ -adrenergic receptor density:* sarcolemmal membranes derived from isolated cardiomyocyte homogenate. The basal adenylyl cyclase activity as well as its maximum isoproterenol-stimulated activity were found to be similar in the healthy and failing hearts (Table 2,A). The concentration-response curves for isoproterenol-stimulated activity in healthy and failing cardiomyocytes were superimposable (Fig. 5,A) ( $EC_{50}$  - failing:  $0.5\pm 0.6 \times 10^{-7}$  M, healthy:  $0.6\pm 0.2 \times 10^{-7}$  M). The maximal adenylyl cyclase responses to NaF and forskolin were also similar in the two groups. The total  $\beta$ AR numbers were, in fact, found to be significantly higher in the failing ( $558\pm 45$  fmol/mg protein,  $n=45$ ) than in the healthy cardiomyocytes ( $386\pm 47$  fmol/mg protein,  $n=18$ ,  $p=0.04$ ), a surprising finding which contrasted with the data obtained in membranes derived from whole tissue homogenate (see below). The  $\beta_1/\beta_2$  ratios measured in competition binding experiments were similar in the preparations from the healthy and failing hearts (Fig. 5,B and Table 3,A). Regression analysis of  $\beta$ AR numbers as a function of cardiac output reduction and increase in LV end-diastolic dimensions did not indicate any clear relationship, but there was a significant trend for the  $\beta$ AR numbers to decrease as the left ventricular filling pressure

increased ( $y = 706 - 15.6x$ ,  $r = -0.46$ ,  $p = 0.03$ ,  $n = 21$  data points). This result would suggest the possibility that  $\beta$ AR density might actually be increased at a moderate degree of functional alteration while being reduced with more severe ventricular dysfunction.

*Adenylyl cyclase and  $\beta$ -adrenergic receptor density:* sarcolemmal membranes derived from whole tissue homogenate. In contrast to the data obtained in membranes derived from isolated cardiomyocytes, the basal values of adenylyl cyclase activity were significantly lower in preparations from failing than in those from healthy hearts (Table 2,B: basal). The concentration-response curve for isoproterenol-stimulated activity was markedly depressed in failing hearts (Fig. 6,A), with a significantly lower maximum isoproterenol-stimulated activity (Fig. 6,A and Table 2,B: isoproterenol), but the  $EC_{50}$  were similar in failing ( $1.2 \pm 0.4 \times 10^{-7}$  M) and in healthy hearts ( $2.0 \pm 0.9 \times 10^{-7}$  M). The responses to maximally stimulating concentrations of NaF and forskolin were similar in the two groups (Table 2,B). Total  $\beta$ AR numbers were similar in failing ( $548 \pm 67$  fmol/mg protein,  $n = 41$ ) and in healthy hearts ( $530 \pm 86$  fmol/mg protein,  $n = 17$ ). Competition binding curves (using the  $\beta_2$ AR selective antagonist ICI 118,551 and the non-selective [ $^{125}$ I]CYP) could best be fitted to a 2-site model (Fig. 6,B) with the high affinity site ( $K_{\beta_2}$ ) and lower affinity site ( $K_{\beta_1}$ ) corresponding to  $\beta_2$ AR and  $\beta_1$ AR binding, respectively. The  $\beta_1/\beta_2$  ratio was significantly lower in the failing than in the healthy ventricles (Table 3,B).

*$\beta$ -adrenergic receptor density: whole tissue slices.* No statistically significant difference was found between healthy ( $113 \pm 15$ ) and failing hearts ( $90 \pm 11$  fmol/mg protein,  $p = 0.26$ ) in [ $^3$ H]CGP-12177 binding studies performed in whole tissue slices.

*$\beta$ -adrenergic receptors in membranes derived from the homogenate of a noncardiomyocytic cell fraction.* Only weak basal adenylyl cyclase activity was detected

(healthy:  $3.2 \pm 1.5$ , failing:  $4.2 \pm 1.0$  pmol cAMP/min/mg protein, NS) and the responses to isoproterenol stimulation were irregular. However, relatively high  $\beta$  adrenergic receptor numbers were detected, without any statistical difference between preparations extracted from failing ( $337 \pm 47$  fmol/mg protein,  $n=14$ ) and healthy hearts ( $196 \pm 53$ ,  $n=5$ ,  $p=0.18$ ). Neither was there any statistically significant difference in the  $\beta_1/\beta_2$  ratios between the two groups (Table 3,C). (Note, however, that the  $\beta_1/\beta_2$  ratio measured in membranes derived from whole tissue homogenates of failing hearts was similar to the one measured in membranes from the noncardiomyocytic cell fraction.)



## 5.5. DISCUSSION

We found that the magnitude and rate of cell shortening as well as the rate of relaxation were decreased in failing *versus* healthy cardiomyocytes under basal conditions. These changes are consistent with a reduced myofibrillar content (32) and altered mechanisms of E-C coupling (27,28,36) in this model. The latter include reductions in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current (24) and dihydropyridine receptor density (ref. 24, but not 36), reduction in ryanodine receptor density (14,36) and reduction in sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA2) activity (26). We also found that the isoproterenol-induced changes in the magnitude and rate of cell shortening as well as the rate of relaxation were depressed in the failing cardiomyocytes at agonist concentrations of  $5 \times 10^{-9}$  -  $10^{-8}$  M. Still higher isoproterenol concentrations ( $10^{-6}$  M) could be achieved in the bath during the patch clamp experiments because of the presence of EGTA in the pipette and, again, the isoproterenol-induced increments in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current were found to be reduced, in agreement with Kääh *et al.* (19). The reduction was apparent when the raw measurements were analyzed and were statistically significant when normalized to cell membrane capacity. Such normalization is a common practice in the study of ionic currents (19,24,27) and its rationale is that the cell capacity is proportional to the total surface of the cell membrane (10).

The responses to isoproterenol were depressed in spite of the fact that there was no reduction in  $\beta$ AR density and  $\beta$ AR-mediated cyclic AMP generation in crude membranes derived from isolated failing cardiomyocyte homogenates in comparison with healthy ones. The simplest interpretation of these results would be that the reduced contractile responses

to isoproterenol are related to alterations in the mechanisms of E-C coupling and the contractile machinery in the face of a preserved cyclic AMP generating capacity.

The reduced basal rate of relaxation is consistent with diminished SERCA2 expression and activity as well as reduced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in preparations extracted from hearts with tachycardia-induced failure (26, 27). However,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange activity, - the other major  $\text{Ca}^{2+}$  removal system of the heart, - was found to be increased and appeared to fully compensate for the reduction in sarcoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$  uptake (27) suggesting that intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was extruded outside from the cell instead of being stored into the SR. Interestingly, isoproterenol's capacity to stimulate sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was preserved (although with a longer time constant than in healthy hearts) (27).

Thus, the present study suggests that the alterations in contractile responses to isoproterenol observed in the failing cardiomyocytes isolated from our preparations might have been due to the alterations in the contractile machinery which were already apparent in the functional depression observed under basal conditions. However, data obtained in other animal preparations of heart failure (2, 3) and in human heart failure (6, 7, 31) indicate that reductions in  $\beta\text{AR}$  density and  $\beta\text{AR}$ -mediated cyclic AMP generation may indeed be a mechanism limiting the responses to isoproterenol in other pathophysiological situations.

It is important to note that, although many studies have been devoted to various physiological and biochemical measurements made in isolated cardiomyocytes (1, 16, 24, 27, 28), this is the first one to report measurements of  $\beta\text{AR}$  density and  $\beta\text{AR}$ -mediated cyclic AMP generation made in crude membranes extracted from isolated cardiomyocyte homogenate. When we carried out our measurements in membranes extracted from whole

tissue homogenate, total  $\beta$ AR density was found to be unchanged (in agreement with our measurements made in tissue slices). Yet, we found that the  $\beta_1/\beta_2$ AR ratio was reduced, suggesting that the  $\beta_1$ AR number may have been reduced. This result, together with the reduction in adenylyl cyclase activity which we found in membranes extracted from whole tissue homogenate, are in agreement with the data reported by Kiuchi *et al.* (20).

The presence of a noncardiomyocyte fraction could be a factor explaining the fact that data concerning  $\beta$ AR density and  $\beta$ AR-mediated cyclic AMP generation differed between whole tissue membrane preparations and those from isolated cardiomyocytes. There was a relative increase in the  $\beta_2$ AR number, which happened to be predominantly expressed in cardiofibroblasts (21). Their number could be increased as a consequence of changes in the cellular composition of the cardiac tissue as, for instance, an increase in the proportion of interstitial cells versus cardiomyocytes (22). This possibility is in agreement with our observation that the  $\beta_1/\beta_2$ AR ratio in whole tissue membranes of failing hearts was similar to that in the membranes derived from the noncardiomyocytic cell fraction (Table 3). Accordingly, an increase in noncardiomyocytic cells with low basal and  $\beta$ AR-mediated adenylyl cyclase activity could explain the blunting of isoproterenol-stimulated enzyme activity that we observed in membranes from whole tissue homogenate but not those from isolated cardiomyocytes. The fact that biochemical analysis of membranes derived from isolated myocytes and whole tissue may not necessarily yield the same answer deserves further consideration.

When in the course of our study we became aware of the trend that  $\beta$ AR density and  $\beta$ AR-mediated cyclic AMP generation were not reduced in crude membranes derived from failing cardiomyocytes, we paid much attention to ensuring that a sufficiently severe degree

of failure was achieved. Several indices were used toward this end. At the whole organ and circulatory level, cardiac output was reduced by 61%, pulmonary capillary wedge pressure was increased 4-fold, left ventricular end-diastolic volume was increased by 69% and there was a 3.6-fold increase in plasma norepinephrine levels. At the level of the cardiomyocytes, they were found to be elongated and distorted and their basal contractile activity (as well as responses to isoproterenol) were depressed. The terminal study was scheduled once clear clinical signs of heart failure had developed (ascites, fatigue, lack of appetite). Close attention was paid to the development of signs of respiratory distress which was the signal for prompt scheduling of the terminal study. Thus, the canine preparations that were studied presented a clear profile of cardiac failure. To further investigate whether alterations of  $\beta$ AR signaling might have been related to the severity of heart failure, we investigated correlations between the various circulatory variables (reduction in cardiac output, *etc.*) and either  $\beta$ AR density or  $\beta$ AR-mediated cyclic AMP generation. Pulmonary capillary wedge pressure was the only variable showing some degree of correlation (negative) with  $\beta$ AR density, and even then it was a weak one.

Not only was total  $\beta$ AR density not reduced in crude membranes obtained from failing cardiomyocytes but, unexpectedly, we found it to be significantly increased (without significant change in the  $\beta_1/\beta_2$  ratio and adenylyl cyclase activity) in comparison with the healthy state. These results should be interpreted in the light of the fact that the canine preparations studied herein had been in the failing state for a short period of time; therefore, modifications of the receptor density observed in long-standing heart failure might not have had time to develop. It is also possible that the reduction in tissue norepinephrine levels and a reduced capacity of the cardiac sympathetic neurons to release norepinephrine (previously shown in our preparations: ref.12) might have caused

a reactive increase in receptor density. Yet one other explanation might be an increase in  $\beta$ AR density associated with impaired energy metabolism (9, 35), since a decrease in intracellular high-energy phosphates is intimately involved in the development of tachycardia-induced heart failure (13, 26). Interestingly, the  $\beta$ AR internalization process appears to be ATP-dependent (9, 35). Thus, chronic energy starvation might be a common factor explaining the postulated alteration of proteins involved in E-C coupling (27) as well as an increase in sarcolemmal  $\beta$ AR density (when it occurs). On the other hand, sustained rapid pacing is a complex situation which has also been shown, in isolated neonatal rat cardiomyocytes, to induce  $\beta$ AR internalization without modification of total  $\beta$ AR numbers (39). Thus, various mechanisms with divergent outcomes may be involved in the presence of sustained rapid pacing.

#### *Perspectives.*

This study suggests that functional desensitization, in the form of reduced isoproterenol-induced contractile responses and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current increments, can occur in pathologic myocardium even though  $\beta$ AR density and  $\beta$ AR-mediated cyclic AMP generation are preserved. In addition to classical desensitization of the  $\beta$ AR signaling pathway, alterations in the E-C coupling and in the contractile machinery are thus an alternative mechanism which can also be involved in limiting the cardiomyocytes' functional responses to  $\beta$ AR stimulation.

## 5.6. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (to RC). Charles-E. Laurent was supported by a Studentship from the Medical Research Council of Canada. Guy Rousseau is the recipient of a Scholarship from the Canadian Hypertension Society and Medical Research Council of Canada. The authors thank Ms. Suzan Senechal for her invaluable secretarial assistance and M. Ghislain Richard, Medtronic. Inc. Canada for generously providing the pacemakers.

## 5.7. REFERENCES

1. Altschuld, R. A., R. C. Starling, R. L. Hamlin, G. E. Billman, J. Hensley, L. Castillo, R. H. Fertel, C. M. Hohl, P-M. L. Robitaille, L. R. Jones, R-P. Xiao, and E. G. Lakatta. Response of failing canine and human heart cell to  $\beta_2$ -adrenergic stimulation. *Circulation* 92: 1612-1618, 1995.
2. Anderson, K. M., A. D. Eckart, R. N. Willette, and W. J. Koch. The myocardial  $\beta$ -adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension* 33[part II]: 402-407, 1999.
3. Anzai, T., N. C. Lai, M. Gao, and H. K. Hammond. Dissociation between regional dysfunction and  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in heart failure. *Am. J. Physiol.* 275: H1267-H1273, 1998.
4. Armstrong, P. W., T. P. Stopps, S. E. Ford, and A. J. de Bold. Rapid ventricular pacing in the dog: Pathophysiologic studies of heart failure. *Circulation* 5: 1075-1084, 1986.
5. Bradford, M. M.. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal.Biochem.*72: 248-259, 1976.
6. Bristow, M. R., F. L. Anderson, J. D. Port, L. Skerl, R. E. Hershberger, P. Larrabee, J. B. O'Connell, D. G. Renlund, K. Volkman, J. Murray, and A. M. Feldman. Differences in  $\beta$ -

adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 84: 1024-1039, 1991.

7. Bristow, M. R., R. Ginsburg, W. Minobe, R. S. Cubicciotti, W. S. Sageman, K. Lurie, M. E. Billingham, D. C. Harrison, and E. B. Stinson. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *New Engl. J. Med.* 307: 205-211, 1982.

8. Bristow, M. R., R. Ginsburg, V. Umans, M. Fowler, W. Minobe, R. Rasmussen, P. Zera, R. Menlove, P. Shah, S. Jamieson, and E. B. Stinson.  $\beta_1$ - 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.* 59:297-309, 1986.

9. Buja, L. M., K. H. Muntz, T. Rosenbaum, Z. Haghani, D. K. Buja, A. Sen, K. R. Chien, and J. T. Willerson. Characterization of a potentially reversible increase in  $\beta$ -adrenergic receptors in isolated, neonatal rat cardiac myocytes with impaired energy metabolism. *Circ Res* 57: 640-645, 1985.

10. Cahalan, M. and E. Neher. Patch clamp techniques: an overview. *Meth. Enzymol.* 207: 3-14, 1992.



11. Calderone, A., M. Bouvier, K. Li, C. Juneau, J. de Champlain, and J-L. Rouleau. Dysfunction of the  $\beta$ - and  $\alpha$ -adrenergic systems in a model of congestive heart failure. The pacing-overdrive dog. *Circ. Res.* 69: 332-343, 1991.
12. Cardinal, R., R. Nadeau, C. Laurent, G. Boudreau, and J. A. Armour. Reduced capacity of cardiac efferent sympathetic neurons to release noradrenaline and modify cardiac function in tachycardia-induced canine heart failure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 1070-1078, 1996.
13. Coleman, H. N, R. R. Taylor, P. E. Pool, G. H. Whipple, J. W. Covell, J. Ross, and E. Braunwald. Congestive heart failure following chronic tachycardia. *Am Heart J* 81: 790-798, 1971.
14. Cory, C. R., L. J. McCutcheon, M. O'Grady, A. W. Pang, J. D Geiger, and P. O'Brien. Compensatory downregulation of myocardial  $Ca^{2+}$  channel in SR from dogs with heart failure. *Am. J. Physiol.* 264: H926-H937, 1993.
15. DeLéan, A., A. A. Hancock, and R. J. Lefkowitz. Validation and statistical analysis of a computer modelling method for quantitative analysis of radioligand binding data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 21: 5-16, 1981.
16. Harding, S. E., S. M. Jones, P. O'Gara, F. del Monte, G. Vescovo, and P. A. Poole-Wilson. Isolated ventricular myocytes from failing and non-failing human heart; the relation

of age and clinical status of patients to isoproterenol response. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24, 549-564, 1992.

17. Isenberg, G., and U. Klockner. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflueger's Arch.* 395: 6-18, 1982.

18. Juneau, C., A. Calderone, and J-L. Rouleau. Myocardial  $\beta$ -adrenergic and mechanical properties in pacing-induced heart failure in dogs. *Am. J. Physiol.* 262: H1458-H1467, 1992.

19. Kääb, S., H. B. Nuss, N. Chiamvimonvat, B. O'Rourke, P. H. Pak, D. A. Kass, E. Marbán, and G. F. Tomaselli. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ. Res.* 78: 262-273, 1996.

20. Kiuchi, K., R. P. Shannon, K. Komamura, D. J. Cohen, C. Bianchi, C. J. Homcy, S. F. Vatner, and D. E. Vatner. Myocardial  $\beta$ -adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure. *J. Clin. Invest.* 91: 907-914, 1993.

21. Lau, Y. H., R. B. Robinson, M. R. Rosen, and J. P. Bilezikian. Subclassification of  $\beta$ -adrenergic receptors in cultured rat cardiac myoblasts and fibroblasts. *Circ Res.* 47: 41-48, 1980.

22. Liu, Y., E. Cigola, W. Cheng, J. Kajstura, G. Olivetti, T. H. Hintze, and P. Anversa. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the

cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab. Invest.* 73:771-787, 1995.

23. Marzo, K. P., M. T. Frey, J. R. Wilson, B. T. Liang, D. R. Manning, V. Lanoce, and P. B. Molinoff.  $\beta$ -adrenergic receptor - G protein - adenylate cyclase complex in experimental canine congestive heart failure produced by rapid ventricular pacing. *Circ. Res.* 69: 1546-1556, 1991.

24. Mukherjee, R., K. W. Hewett, J. D. Walker, C. G. Basler, and F. G. Spinale. Changes in L-type calcium channel abundance and function during the transition to pacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc. Res.* 37: 432-444, 1998.

25. Neve, K. A., P. McGonigle, and P. B. Molinoff. Quantitative analysis of the selectivity of radioligands for subtypes of  $\beta$  adrenergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 46-53, 1986.

26. O'Brien, P. J., C. D. Ianuzzo, G. W. Moe, T. P. Stopps, and P. W. Armstrong. Rapid ventricular pacing of dogs to heart failure: biochemical and physiological studies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 34-39, 1990.

27. O'Rourke, B., D. A. Kass, G. F. Tomaselli, S. Kääb, R. Tunin, and E. Marbán. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure. I. Experimental studies. *Circ. Res.* 84: 562-570, 1999.

28. Raven, U., K. Davia, C. H. Davies, P. O'Gara, A. J. Drake-Holland, J. W. Hynd, M. I. M. Noble, and S. E. Harding. Tachycardia-induced failure alters contractile properties of canine ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 32: 613-621, 1996.
29. Roth, D. A., K. Urasawa, G. A. Helmer, and H. K. Hammond. Downregulation of cardiac guanosine 5'-triphosphate-binding proteins in right atrium and left ventricle in pacing-induced congestive heart failure. *J. Clin. Invest.* 91: 939-949, 1993.
30. Salomon, P., C. Londos, and M. Rodbell. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58: 541-548, 1974.
31. Schwinger, R. H., M. Böhm, B. Pieske, and E. Erdman. Different  $\beta$ -adrenoceptor-effector coupling in human ventricular and atrial myocardium. *Eur. J. Clin. Invest.* 21: 443-451, 1991.
32. Spinale, F. G., B. M. Fulbright, R. Mukherjee, R. Tanaka, J. Hu, F. A. Crawford, and M. R. Zile. Relation between ventricular and myocyte function with tachycardia-induced cardiomyopathy. *Circ. Res.* 71: 174-187, 1992.
33. Spinale, F. G., H. H. Holzgrefe, R. Mukherjee, S. R. Arthur, M. J. Child, J. R. Powell, and W. H. Koster. LV and myocyte structure and function after early recovery from tachycardia-induced cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.* 268: H836-H847, 1995.

34. Steadman, B. W., K. B. Moore, K. W. Spitzer, and J. H. B. Bridge. A video system for measuring motion in contracting heart cells. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* BME-35: 264-272, 1988.
35. Strasser, R. H., J. Krimmer, and R. Marquetant. Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors: impaired desensitization in myocardial ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12(Suppl. 1): S15-S24, 1988.
36. Vatner, D. E., N. Sato, K. Kiuchi, R. P. Shannon, and S. F. Vatner. Decrease in myocardial ryanodine receptors and altered excitation-contraction coupling early in the development of heart failure. *Circulation* 90: 1423-1430, 1994.
37. Watson-Wright, W. M., J. A. Armour, D. E. Johnstone, and M. Wilkinson. Myocardial slice: a physiological approach to beta-adrenergic ( $[^3\text{H}]\text{CGP-12177}$ ) receptor binding in hamster and guinea pig heart. *J. Pharmacol. Meth.* 22: 37-47, 1989.
38. Watson-Wright, W. M., M. Wilkinson, D. E. Johnstone, R. Cardinal, and J. A. Armour. Prolonged supramaximal stimulation of canine efferent sympathetic neurons induced desensitization of inotropic responses without a change in myocardial beta-adrenergic receptors. *Can. J. Cardiol.* 8: 177-186, 1992.
39. Yonemochi, H., S. Yasunaga, Y. Teshima, N. Takahashi, M. Nakagawa, M. Ito, and T. Saikawa. Rapid electrical stimulation of contraction reduced the density of  $\beta$ -adrenergic receptors and responsiveness of cultured neonatal rat cardiomyocytes. Possible

involvement of microtubule disassembly secondary to mechanical stress. *Circulation* 101: 2625-2630, 2000.

40. Zivin, J. A., and D. R. Waud. How to analyze binding, enzyme and uptake data: the simplest case, a single phase. *Life Sci.* 30: 1407-1422, 1982.

## Figure Legends

Figure 5.1: Representative phase-contrast micrographs of cardiomyocytes isolated from a healthy (A) and a failing (B) heart. Failing cardiomyocytes displayed significantly longer resting length ( $L_{\max}$ ,  $\mu\text{m}$ ) in comparison with the healthy ones. Note also that the failing cell contours were wavy.

Figure 5.2: Depression of the isoproterenol-induced increments ( $\Delta_{\text{iso}}$ ) in the magnitude of contraction ( $dL/L_{\max}$ , normalized with respect to maximum cell length) in failing cardiomyocytes compared to healthy ones.

Figure 5.3: Depression of the isoproterenol-induced increments ( $\Delta_{\text{iso}}$ ) in the rate of shortening (A) and relaxation (B) in failing *versus* healthy cardiomyocytes. Rates of shortening and subsequent relaxation are expressed as % changes with reference to the maximum cell length ( $L_{\max}$ ) on a *per* second basis. Isoproterenol exerted significant effects in both cell types at all concentrations (*i.e.* significantly different from zero). The responses to isoproterenol  $10^{-8}$  M (and  $5 \times 10^{-8}$  in the case of relaxation) were significantly depressed (asterisk) in failing cardiomyocytes *versus* healthy ones.

Figure 5.4: Isoproterenol-induced stimulation of the L-type inward calcium current ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) in failing *versus* healthy hearts (A: raw measurements, B: values normalized with reference to cell capacitance). In A, there was a tendency for the isoproterenol effect to be smaller among the failing cells than among the healthy ones (group  $\times$  treatment interaction:

$p=0.068$ ); this difference was statistically significant ( $p=0.002$ ) when the normalized current values were analyzed.

Figure 5.5: Preserved isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity (A) and  $\beta_1/\beta_2$  adrenergic receptor ratio (B) in membranes derived from homogenates of cardiomyocytes isolated from failing hearts. A. The data are expressed as increments beyond the basal adenylyl cyclase activity (taken as zero) and compared between healthy and failing hearts. Mean $\pm$ SEM; n, number of experiments per group. The isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activities were similar when measured in membranes extracted from cells isolated from either healthy or failing ventricles. B. Competition of [ $^{125}$ I]CYP binding with the  $\beta_2$  selective antagonist ICI-118,551. Points are averages of triplicate determinations. Curves were best fitted to a 2-site model using a non-linear least-squares regression program. Data are expressed as the fraction of total [ $^{125}$ I]CYP binding. The  $\beta_1/\beta_2$  ratios were found to be similar (healthy: 79/21,  $K_{\beta_1}= 2.2 \mu\text{M}$ ,  $K_{\beta_2}= 1.7 \text{ nM}$  versus failing: 75/25,  $K_{\beta_1}= 0.9 \mu\text{M}$ ,  $K_{\beta_2}= 1.4 \text{ nM}$ ).

Figure 5.6: Depression of isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity (A) and modification of the  $\beta_1/\beta_2$  adrenergic receptor ratio (B) in membranes derived from failing ventricular tissue homogenates. Same format as in Fig. 5. A. Isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity was significantly depressed when measured in membranes extracted from whole tissue homogenates of failing hearts (\*,  $p < 0.05$ ). B. The  $\beta_1/\beta_2$  ratio was significantly lower in the membranes extracted from failing ventricular homogenates (45/55,  $K_{\beta_1}= 6 \mu\text{M}$ ,  $K_{\beta_2}= 2 \text{ nM}$ ) than in membranes from healthy ones (83/17,  $K_{\beta_1}= 0.3 \mu\text{M}$ ,  $K_{\beta_2}= 0.5 \text{ nM}$ ).



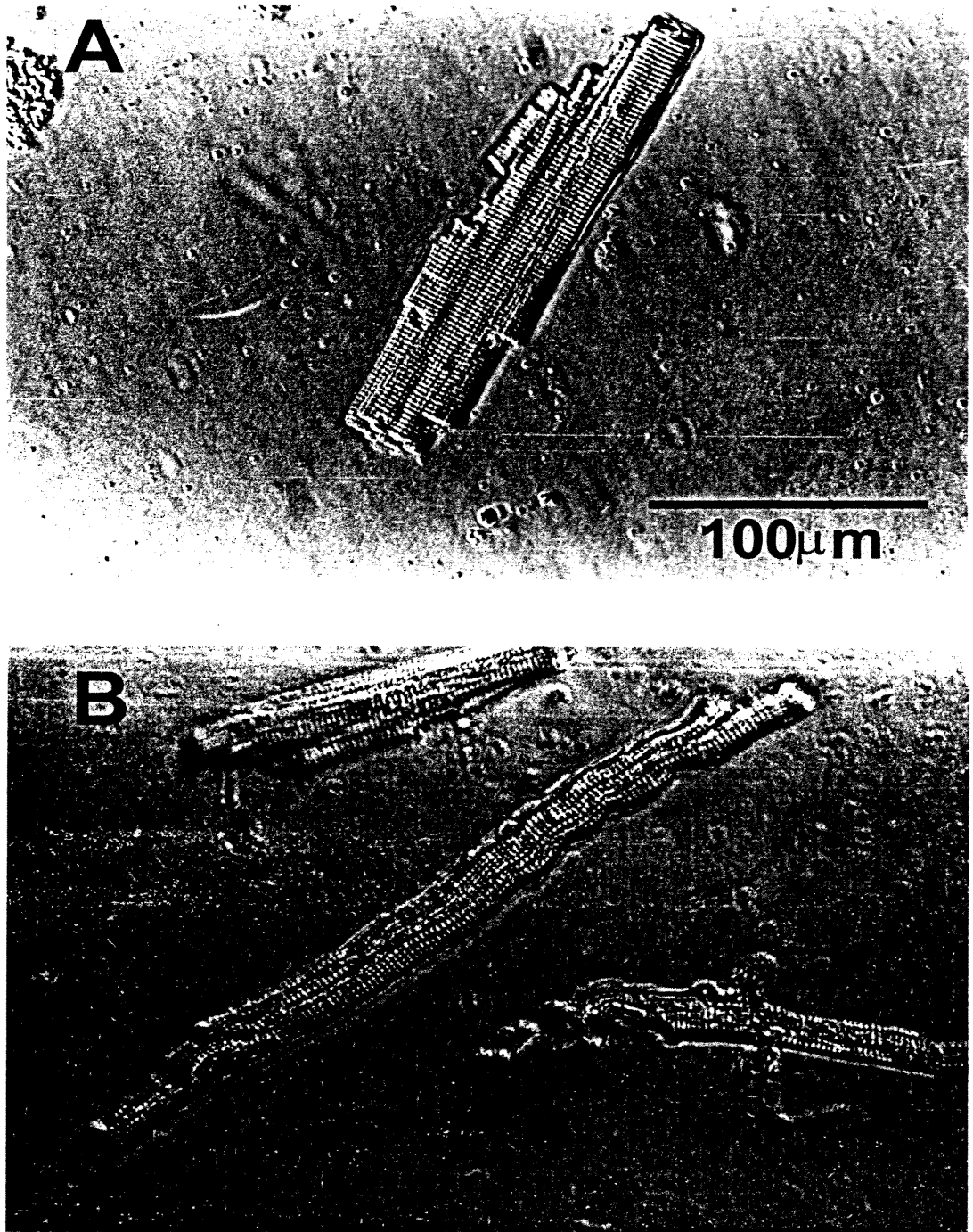


Figure 5.1

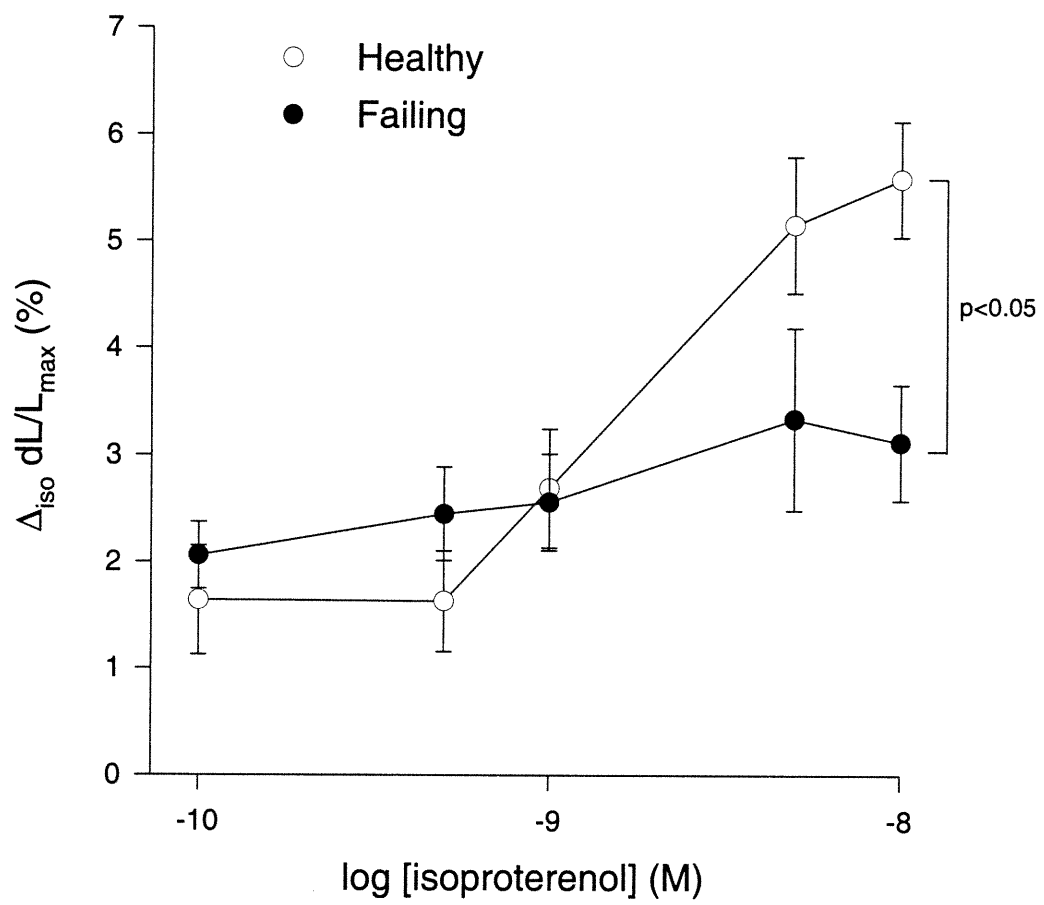


Figure 5.2

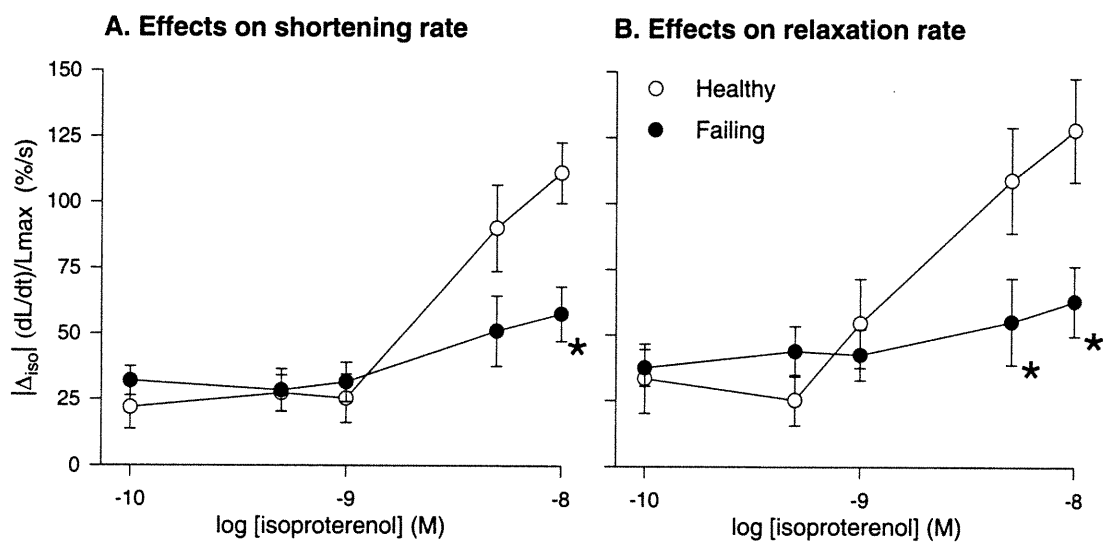


Figure 5.3

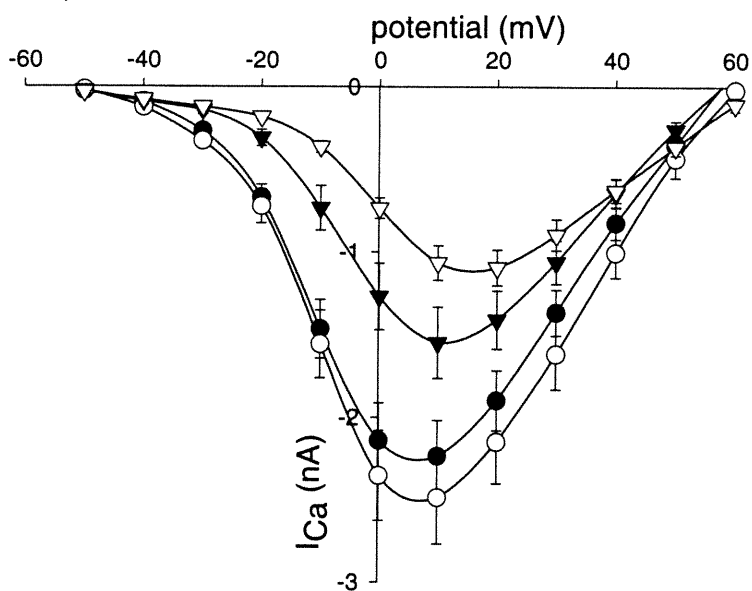
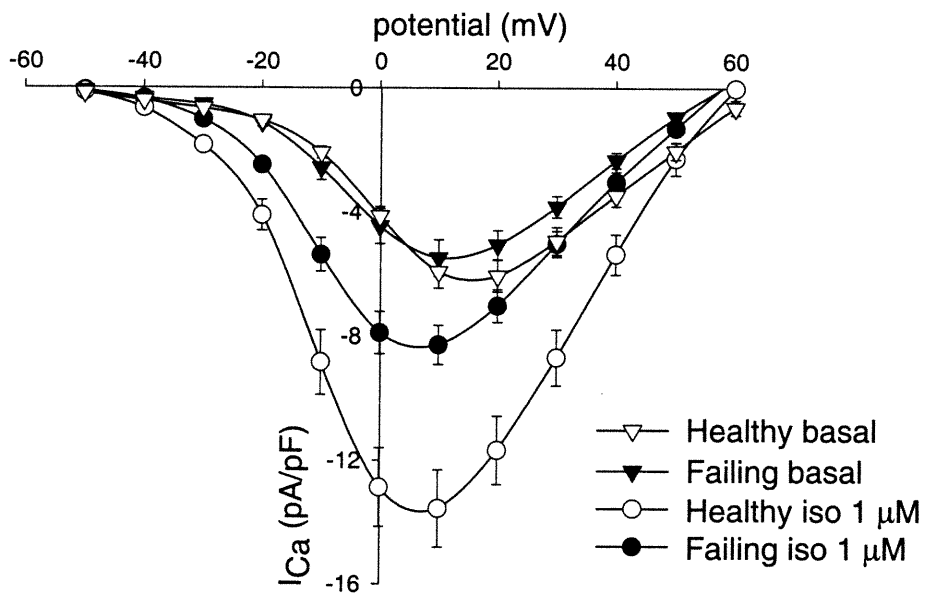
**A. Peak  $I_{Ca,L}$** **B. Normalized peak  $I_{Ca,L}$** 

Figure 5.4

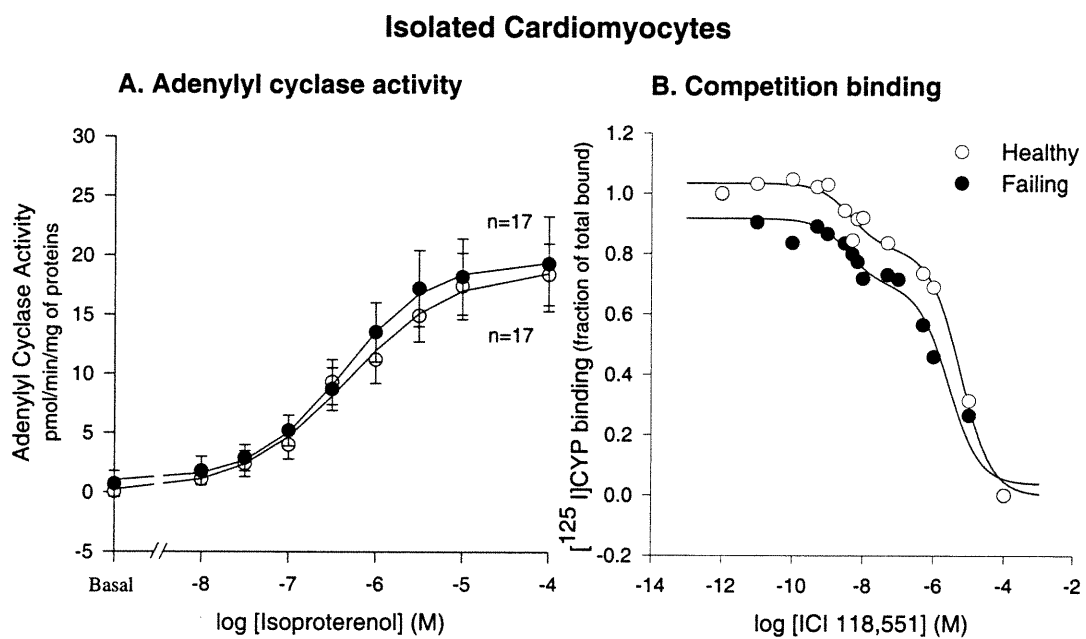


Figure 5.5

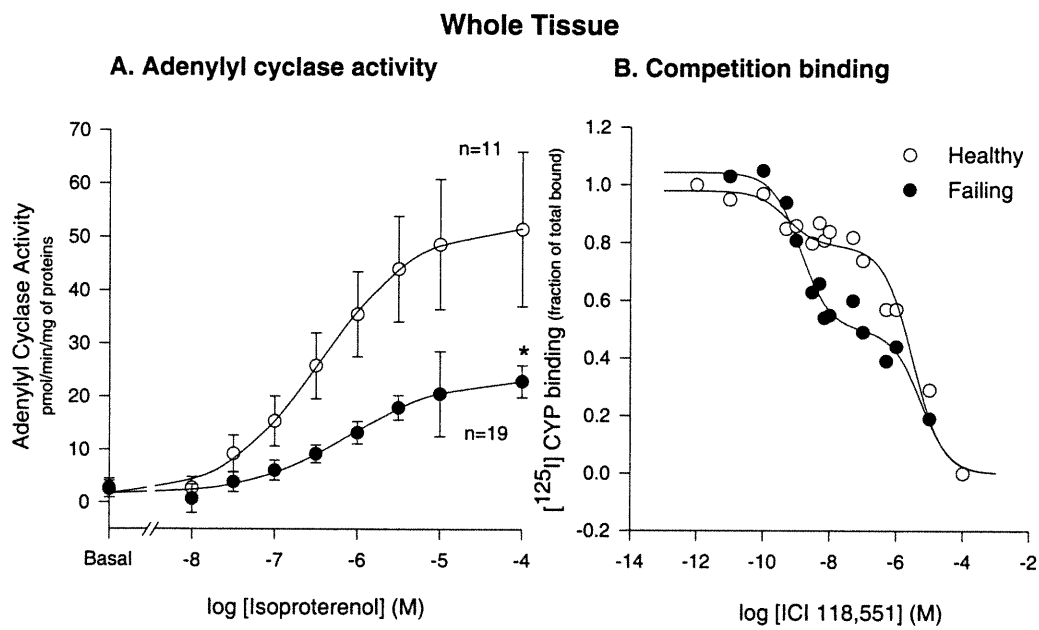


Figure 5.6

Table 5.1: Resting and shortening characteristics of myocytes isolated from healthy and failing hearts.

	variable	Healthy	Failing
	n	199	318
A. Resting length	$L_{\max}$ ( $\mu\text{m}$ )	181 $\pm$ 2.1	206 $\pm$ 1.8*
B. Shortening	dL ( $\mu\text{m}$ )	11.0 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.3 *
	dL/ $L_{\max}$ (%)	6.2 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.2*
C. Rates of shortening and subsequent relaxation	- dL/dt ( $\mu\text{m/s}$ )	151 $\pm$ 59	148 $\pm$ 92
	+ dL/dt ( $\mu\text{m/s}$ )	166 $\pm$ 84	158 $\pm$ 116
	- (dL/dt)/ $L_{\max}$ (%/s)	85 $\pm$ 2	74 $\pm$ 3*
	+ (dL/dt) / $L_{\max}$ (%/s)	94 $\pm$ 3	79 $\pm$ 3*

Data are mean  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0.05$ , comparing failing *versus* healthy. B, C: Values are presented in  $\mu\text{m}$  or normalized with reference to resting length,  $L_{\max}$ .

Table 5.2: Stimulated adenylyl cyclase activity in membranes from whole tissue or isolated myocytes.

	Activity (pmol cAMP/mg protein/min)	
	healthy	failing
A. Isolated		
Cardiomyocytes		
n	17	17
basal	33 ± 6	26 ± 4
isoproterenol	52 ± 9	45 ± 7
NaF	151 ± 32	157 ± 22
Forskolin	242 ± 54	244 ± 35
B. Whole Tissue		
n	11	19
basal	86 ± 15	45 ± 7*
isoproterenol	140 ± 28	67 ± 8*
NaF	478 ± 96	420 ± 43
Forskolin	779 ± 118	735 ± 76

Data are maximal responses expressed as mean ± SEM. n, number of experiments in each group.

\*;  $p < 0.05$  comparing failing *versus* healthy.



Table 5.3:  $\beta_1/\beta_2$  adrenergic receptor ratio measured in membranes from healthy or failing hearts.

	Healthy	Failing
<b>A. Isolated Cardiomyocyte Homogenate</b>		
n	6	14
$\beta_1/\beta_2$	77 / 23 ( $\pm 3$ )	72 / 28 ( $\pm 4$ )
$K_{\beta_1}(\mu\text{M})$	4.7 $\pm$ 1.4	2.2 $\pm$ 0.7
$K_{\beta_2}(\text{nM})$	10 $\pm$ 6.2	18 $\pm$ 8.9
<b>B. Whole Tissue Homogenate</b>		
n	4	5
$\beta_1/\beta_2$	72 / 28 ( $\pm 5$ )	45 / 55 ( $\pm 5$ )*
$K_{\beta_1}(\mu\text{M})$	3.0 $\pm$ 1.5	3.4 $\pm$ 0.7
$K_{\beta_2}(\text{nM})$	12 $\pm$ 11	24 $\pm$ 15
<b>C. Noncardiomyocyte Homogenate</b>		
n	5	12
$\beta_1/\beta_2$	59 / 41 ( $\pm 6$ )	51 / 49 ( $\pm 6$ )
$K_{\beta_1}(\mu\text{M})$	5.1 $\pm$ 1.5	2.9 $\pm$ 1.0
$K_{\beta_2}(\text{nM})$	49 $\pm$ 9.2	15 $\pm$ 8.5

[<sup>125</sup>I]CYP binding competition with ICI 118,551. Data are mean  $\pm$  SEM. n, number of observations in each group. \*,  $p < 0.05$  comparing preparations derived healthy and failing hearts.  $\beta_1/\beta_2$  adrenergic receptor ratio expressed as a proportion of 100.  $K_{\beta_1}$  and  $K_{\beta_2}$ : dissociation constants of ICI 118-551 for  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptors.

**CHAPITRE 6: Absence of  $\beta$ AR desensitization in isolated cardiomyocyte**

## CHAPITRE 6

ABSENCE OF ISOPROTERENOL-INDUCED RAPID HOMOLOGOUS  $\beta$ AR  
DESENSITIZATION IN CANINE CARDIOMYOCYTESCharles-E Laurent<sup>1,2</sup>, Guy Rousseau<sup>1,2</sup>, Michel Vermeulen<sup>1</sup>Michel Bouvier<sup>1,3</sup> and René Cardinal<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Québec, H4J 1C5, Départements de <sup>2</sup>Pharmacologie et <sup>3</sup>Biochimie, faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7

**Running title** : Absence of  $\beta$ AR desensitization in isolated cardiomyocyte

Correspondence:

René Cardinal, Ph.D.  
Centre de recherche  
Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal  
5400, boul. Gouin ouest  
Montréal. (Québec)  
Canada, H4J 1C5  
Tel.: (514) 338-3180  
FAX: (514) 338-2694  
E-mail: cardinal@crhsc.umontreal.ca

## 6.1. Abstract

It is generally recognized that short-term stimulation of cells expressing  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ AR) induces a rapid desensitization characterized by uncoupling of the receptor from a G-protein. However, the degree of desensitization varies between  $\beta$ AR subtypes and may depend on the particular cell line in which the receptor is studied. Since  $\beta$ AR are important for cardiac function, we examined the phenomenon of agonist-induced rapid  $\beta$ AR desensitization in adult canine isolated cardiomyocytes. Exposure to either low (10 nM) or high (1  $\mu$ M) concentrations of isoproterenol (ISO) for 15 min had no effect on subsequent ISO-induced adenylyl cyclase activity. Prolonged exposure (up to 60 min) to ISO did not induce the expected  $\beta$ AR desensitization in terms of its capacity to induce adenylyl cyclase activity or to increase calcium current. Cardiomyocyte exposure to dibutyryl cyclic AMP (1mM) did not change the maximal responsiveness to subsequent challenge with ISO, whereas activation of PKC with the phorbol 12-myristate-13 acetate (10  $\mu$ M) induced a relatively small but significant 20% desensitization. In all cases, NaF- and forskolin-induced maximal activation of adenylyl cyclase were not affected. To further characterize our system, GRK expression and activity were studied in cardiomyocytes. Although an increase in GRK activity was measured in membrane proteins derived from cardiomyocytes stimulated with 1  $\mu$ M ISO for 15 min, we were unable to detect either GRK2 or GRK5 expression. These results suggest that  $\beta$ AR expressed in isolated canine cardiomyocytes are resistant to short term desensitization and may be a poor substrate for GRK.

**Key Words:** Cardiomyocytes,  $\beta$ AR, desensitization, GRK, PKC

## 6.2. Introduction

Rapid agonist-induced desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ AR) is a well-understood process that has been extensively studied in various cell lines (for complete review Nantel and Bouvier, 1993). Briefly, it involves phosphorylation of the receptor by at least two protein kinases, the cAMP-dependent protein kinase (PKA) and the G-protein receptor kinase (GRK). While phosphorylation of the receptor by PKA is believed to be effective at low agonist concentration, higher concentrations may be required for GRK phosphorylation. Regulation of  $\beta$ AR in a physiological context also involves, to a lesser extent, cross talk phosphorylation by the calcium-dependent protein kinase (PKC). Both PKA and PKC are kinases with broad substrate spectrums whereas GRK (in this case GRK 2 and 5) display a greater specificity. Most of the molecular processes involved in reduced signaling efficacy upon sustained stimulation were observed in cell lines expressing the human  $\beta_2$ AR considered a prototype of this receptor family. However, several studies using animal models (Valet et al., 1989; Vatner et al., 1989; Zhao and Muntz, 1993) or cultured cell lines (Suzuki et al., 1992; Neve et al., 1985) have demonstrated that  $\beta_1$ AR presents a pattern of regulation distinct from the one characterizing the  $\beta_2$ AR. For instance, studies performed in chinese hamster fibroblast expressing human  $\beta_1$ AR demonstrate that agonist-induced sequestration and down-regulation are considerably blunted in comparison with the  $\beta_2$ AR (Suzuki et al. 1992). In murine Ltk<sup>-</sup> fibroblasts expressing the  $\beta_2$ AR, the level of rapid desensitization induced by 1  $\mu$ M of isoproterenol was much more pronounced (47.5%) than in cells expressing the  $\beta_1$ AR (23.5%) (Rousseau et al., 1996). It thus appears that the mechanisms of desensitization observed for the  $\beta_2$ AR are not necessarily transposable to the  $\beta_1$ AR.

In left ventricular isolated cardiomyocytes, cardiac  $\beta$ ARs are mostly represented by  $\beta_1$  subtypes (>75%, Laurent et al. 2001). Yet, little information is available concerning cardiac  $\beta_1$ AR regulation in freshly isolated cardiomyocytes. Understanding  $\beta_1$ AR regulation is important for physiological and therapeutic consequences; for instance, it has been proposed that depressed  $\beta$ -adrenergic responsiveness occurs in cardiovascular diseases such as heart failure and that it reflects an exaggerated agonist-induced desensitization and down-regulation of  $\beta$ AR. The elevation of catecholamines in plasma or myoneural junction associated with heart failure could promote agonist-induced desensitization of cardiac  $\beta$ AR as an early protective mechanism that might contribute in the long term to cardiac dysfunction. This concept, based on the paradigm of rapid agonist-induced desensitization, has however, never been demonstrated in isolated cardiomyocytes derived from adult large animals.

The purpose of this present study was to determine if the mechanisms of desensitization that have been reported for cells expressing human  $\beta_2$ AR could be observed in isolated canine cardiomyocytes spontaneously expressing a majority of  $\beta_1$ AR. We found that, under similar conditions as the ones used to study culture cell lines, isolated canine cardiomyocytes were resistant to agonist-induced  $\beta$ AR uncoupling even with increase GRK activity. Interestingly heterologous desensitization could only be obtained by activating the protein kinase C (PKC), suggesting a possible role for PKC in cardiomyocytes  $\beta$ AR regulation.

### **6.3. Materials and methods**

#### *Animals*

All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and monitored by an institutional animal care committee. Mongrel dogs (18-25 Kg) of either sex were anesthetized with sodium thiopental (25 mg/Kg). The heart was exposed through a left thoracotomy, heparinized, excised and immediately placed in cold (4°C) Tyrode solution containing 128 mM NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 470 μM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mM dextrose, 4.5 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.2). All chemicals were obtained from Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA, unless specified otherwise. The left ventricular anterior wall was excised and kept in cold Tyrode solution and a large diagonal branch of the left anterior descending coronary artery was cannulated for the cardiomyocyte isolation procedure, as previously reported (Laurent et al. 2001).

#### *Preparation of isolated cardiomyocytes*

Perfusion began with Tyrode solution containing 0.3 mM Ca<sup>2+</sup> to remove blood cells. Afterwards, perfusion (5 min) was instituted with Ca<sup>2+</sup> free-HEPES buffer supplement with 5 mM nitriloacetic acid. The HEPES buffer contained 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 35 mM sucrose, 4 mM taurine, 10 mM HEPES (pH 7.0). Perfusion was again changed to HEPES buffer solution containing 0.3 mM Ca<sup>2+</sup> and then to HEPES containing 0.05% collagenase (type A, Boehringer Mannheim, Laval, Canada), 0.02% trypsin inhibitor (type II-s) and 0.28 mg/ml protease (type XIV) for 25 min, all solutions being oxygenated and maintained at 37°C. After collagenase-protease digestion, the perfused region was dissected and transferred to a 50 ml Erlenmeyer flask containing 10 ml of 0.3 mM Ca<sup>2+</sup> HEPES-collagenase and incubated at 37°C under a stream of O<sub>2</sub> for 20 min. This procedure was repeated 4 times using fresh HEPES-collagenase solution, collecting and filtering (200 μm

nylon filters) the supernatant after each incubation period. The collected aliquots, which contained the isolated cardiomyocytes, were centrifuged ( $50 \times g$ ) for 1 min and the pellets were resuspended in 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -HEPES solution (pH 7.4). Aliquot cardiomyocyte enrichment and their morphological integrity were verified visually with an inverted microscope (Diaphot, Nikon Corp., Tokyo, Japan). Batches of isolated cardiomyocytes were used 1) to extract the crude membranes used for biochemical analyses, and 2) for L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current measurement in patch clamp experiments.

*Isoproterenol pretreatment protocol.* Batches of pretreated cardiomyocytes were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 15, 30 or 60 min-periods in 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -HEPES solution containing isoproterenol (10 nM or  $1\mu\text{M}$ ). Batches of control (untreated) cardiomyocytes were incubated similarly, but in the absence of isoproterenol.

#### *Crude membrane preparations*

The pretreated and the control cardiomyocytes were placed in lysis solution (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 5  $\mu\text{g}$ -ml leupeptin, 5  $\mu\text{g}$ -ml soybean trypsin inhibitor and 10  $\mu\text{g}$ -ml benzamidine) and homogenized with a Polytron (3 bursts of 10 sec at maximum speed; Brinkmann Instruments, Inc., Wesbury, NY, USA). The homogenate was centrifuged at  $1000 \times g$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was then collected and centrifuged at  $45,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 10 ml of the lysis solution and centrifuged at  $45,000 \times g$ . The final pellet was resuspended in ice-cold buffer containing 75 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM EDTA, to a final concentration of 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of protein (determined by the method of Bradford, 1976).



### *Adenylyl cyclase assays*

Measurements were made after Salomon et al. (1974) using 10  $\mu\text{g}$  of the crude membrane extract placed in a 50  $\mu\text{l}$  volume of incubation medium containing 120  $\mu\text{M}$  ATP, 0.5  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 100  $\mu\text{M}$  cAMP, 53  $\mu\text{M}$  GTP, 2.8 mM phospho-enolpyruvate, 0.2 unit pyruvate kinase, 1 unit of myokinase, 30 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine and 0.8 mM EDTA. The adenylyl cyclase reaction was initiated by adding the membrane to the incubation medium at 37°C and it was allowed to run for 30 min before being stopped by adding 1ml of ice-cold solution (0.4 mM ATP, 0.3 mM cAMP) containing [ $^3\text{H}$ ]cAMP (25,000 cpm) to assess the efficiency of the following isolation procedure. The cAMP was isolated by sequential chromatography on a Dowex cation-exchange resin column and an aluminum oxide column.

*Adenylyl cyclase stimulation protocol.* Enzyme activity in membranes extracted from either isoproterenol-treated or control cardiomyocytes was measured under stimulation with isoproterenol ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M), NaF (10 mM) or forskolin (100  $\mu\text{M}$ ). Determinations were made in duplicate. The isoproterenol concentration-response curves were fitted to a sigmoid using the Allfit computer software (De Léan et al. 1981).

### *$\beta$ -adrenergic receptor binding studies*

Binding assays were conducted using [ $^{125}\text{I}$ ]CYP in membranes derived from isoproterenol-pretreated and from control cells. The membrane preparations ( $\sim 10$   $\mu\text{g}$  protein) were incubated (in triplicate) for 90 min at room temperature using a single

saturating concentration of [ $^{125}$ I]CYP (300 pM) in a final volume of 500  $\mu$ l Tris buffer (75 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA). Non specific binding was determined with 10  $\mu$ M alprenolol. The binding reactions were stopped by rapid filtration over Whatman GF/C fibreglass filters and immediate washing with a cold solution (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA).

#### *Measurement of $I_{Ca-L}$*

The cardiomyocytes used in the patch clamp experiments were kept in kraftbrühe (KB: "energy medium") solution to allow recovery of their electrical properties (Isenberg et al. 1982). The KB solution contained 85 mM KCl, 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>ATP, 5 mM pyruvic acid, 5 mM  $\beta$ -hydroxy butyric acid, 5 mM creatine, 20 mM taurine, 20 mM dextrose, 20 g/l PVP-40, 0.1 mM EGTA, at pH 7.2 adjusted with KOH, 310 mosmol/l. Isoproterenol-pretreated or control cardiomyocytes were transferred into a small (0.3 mL) tissue bath placed on the stage of an inverted microscope and superfused with Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-free solution containing 140 mM tetraethyl-ammonium (TEA) chloride, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES (pH 7.3 - 7.4 adjusted with TEA-OH), 10 mM dextrose, 2 mM 4-aminopyridine, 5 mM CaCl<sub>2</sub>. The L-type inward calcium current ( $I_{Ca,L}$ ) was recorded in the whole-cell configuration of the patch clamp technique using a voltage clamp amplifier (List Medical, Inc., EPC-7) and suction pipettes filled with a solution containing 125 mM CsCl, 20 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 5 mM Mg<sub>2</sub>-ATP. Current-voltage relationships were determined by delivering depolarizing voltage-clamp pulses (1 s duration) in 10-mV increments every 10s from a holding potential of -50mV. The currents were monitored with an oscilloscope and stored on a microcomputer hard disk under the control of computer software (pClamp 6, Axon Instruments, Inc.) which was also used to generate

the voltage clamp protocols and for data analysis. The current-voltage relationships were determined under basal conditions and in the presence of 1  $\mu$ M isoproterenol.

*Assessment of GRK2 and GRK 5 content by immunoblotting*

Determinations were made using standard SDS-PAGE and immunoblotting techniques. Cytosolic and membrane fractions were derived from whole tissue or isolated cardiomyocytes homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor and 10  $\mu$ g/ml benzamidine) and centrifuged at 45,000 $\times$ g. The supernatant was collected and served as the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in solubilisation buffer (1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA), incubated for 30 min at 4°C, and then centrifuged (45,000 $\times$ g for 15 min); the supernatant was collected and served as the membrane protein fraction. Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951). 50  $\mu$ g protein from each the cytosolic and membrane fractions were electrophoresed on a 10% denaturing gel, and then electroblotted onto nitrocellulose membrane (Amersham, UK). Transfer efficiency was determined by Ponceau staining. The nitrocellulose membrane was blocked for 60 min at room temperature or overnight at 4°C in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 5 % nonfat dry milk and immunoblotted with either anti-GRK2 or 5 rabbit antiserum. This was followed by exposure to horseradish peroxidase-linked anti-rabbit immunoglobulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The immunoblots were developed by the enhanced chemiluminescence method, and the protein bands were visualized after exposing the blots to X-ray film. The 80-kDa protein GRK2 (or  $\beta$ ARK1) was confirmed by co-migrating with purified bovine  $\beta$ ARK1 (courtesy of Dr. Jeffrey L. Benovic, Thomas Jefferson University, Philadelphia PA,

USA). To confirm that the band migrating at 68 kDa represented GRK5, recombinant GRK5 peptide was used in a neutralization assay (Santa Cruz Biotechnology).

*GRK activity assays.*

Measurements were made using a previously described method (Benovic et al., 1987). Urea-treated bovine rod outer segments containing rhodopsin were prepared from bovine retinae as described by Gagnon and Kelly (1997). Myocardial extracts were prepared by homogenization of whole cardiac tissue or freshly isolated cardiomyocytes in 2 mL of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor and 10  $\mu$ g/ml benzamidine). The homogenates were centrifuged at 45 000  $\times$  g for 20 min at 4°C. The supernatant was collected (NaCl being added to a final concentration of 50 mM) and used as the cytosolic protein fraction. The pellet was resuspended in lysis buffer containing 250 mM NaCl, homogenized again with the Polytron (a single 10 s-burst at maximum speed) and centrifuged at 45 000  $\times$  g for 20 min. The supernatant thus obtained was used as the membrane protein fraction. Both the cytosolic and membrane fractions were equilibrated with 0.5 mL 50% (vol/vol) diethylaminoethyl Sephacel, pH 7.0, at 4°C for 30 min. The slurry was then placed into small columns and eluted with 0.5 mL lysis buffer (without NaCl). The eluate was reduced by filtration in a microconcentrator (Centricon 30, Amicon) to yield ~100  $\mu$ L. Samples containing 50  $\mu$ g of protein (determined according to Bradford, 1976) were incubated for 20 min in a 30°C water bath under white light, with 500 pmol rhodopsin from urea-treated rod outer segments, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.3 mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP in a total volume of 100  $\mu$ L lysis buffer. Reactions were stopped by addition of 600  $\mu$ L ice-cold lysis buffer. All tubes were centrifuged for 15 min at 13,000  $\times$  g. The supernatant was discarded, and the pellet was

resuspended in 50  $\mu\text{L}$  of Laemmli buffer containing 10% mercaptoethanol by vigorous shaking and sonication for 30 min. The samples were electrophoresed on 10% SDS-PAGE gels, and the phosphorylated rhodopsin was visualized by autoradiography of dried gels.

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Comparisons of the biochemical variables between treated and control cells were made using Student's t test. Comparisons of  $I_{\text{Ca-L}}$  basal values and responses to isoproterenol (within factor) in the treated and control cells (between factor) were made by 2-way ANOVA.

#### 6.4. Results

##### *Adenylyl cyclase stimulation*

To determine if the mechanisms of desensitization that have been reported for cells over-expressing human  $\beta_2\text{AR}$  occur in cardiomyocytes expressing mainly  $\beta_1\text{AR}$ ,  $\beta\text{AR}$  desensitization was evaluated in freshly isolated canine cardiomyocytes studied under conditions similar to the ones used for cultured cell lines transfected with human  $\beta_1$  or  $\beta_2\text{AR}$  (Rousseau et al. 1996). We first observed that sustained stimulation of cardiomyocytes with isoproterenol (ISO) for a short period of time (15 min) did not induce the expected reduction of  $\beta\text{AR}$ -mediated cAMP production on subsequent ISO stimulation.  $\beta\text{AR}$  desensitization was not elicited by pretreatment with ISO at either the low concentration (Fig. 1,A: 10 nM, corresponding to stimulation by physiological catecholamine concentrations) nor the high concentration (Fig. 1,B: 1  $\mu\text{M}$ ).  $\beta\text{AR}$  desensitization also failed to be induced by prolonged pretreatment of the cardiomyocytes with the higher agonist concentration (Fig. 2,A and B: 1  $\mu\text{M}$  ISO for 30 and 60 min, respectively). The absence of desensitization was associated with preserved total  $\beta\text{AR}$  densities (in comparison with untreated controls) measured with

a non-selective antagonist ( $[^{125}\text{I}]\text{CYP}$ ) in membrane preparations derived from isolated cardiomyocyte homogenates (Table 1).

#### *GRK level and activity in cardiomyocytes*

Since GRKs are thought to be responsible for rapid desensitization of the agonist-occupied receptor, we determined GRK expression in cardiomyocytes using protein immunoblotting with GRK-specific antibodies. GRK2 expression was could be detected in membranes derived from whole tissue homogenate but not in the membranes derived from isolated cardiomyocytes (Fig. 3). Likewise, GRK5 expression was detected in the membrane and cytosolic fractions of whole tissue homogenates, but not in the isolated cardiomyocyte fractions. We tested for GRK activity in proteins extracted from isolated cardiomyocytes using rhodopsin as a substrate in an *in vitro* phosphorylation assay. Fig. 4 shows that, with ISO pretreatment ( $1\mu\text{M}$ , for 15 min), phosphorylation of light-activated rhodopsin was increased in the membrane protein fraction but not in the cytosolic fraction derived from cardiomyocytes. This increased membrane activity is consistent with the notion of ISO-induced GRK translocation to the sarcolemmal membrane. Inhibition by heparin (2 IU) confirmed that rhodopsin phosphorylation was related to GRK activity.

#### *$I_{\text{Ca-L}}$ current*

We measured  $I_{\text{Ca-L}}$  to study the effect of ISO pretreatment on functional responses to  $\beta\text{AR}$  stimulation. Current-voltage curves were determined under basal conditions and in the presence of ISO ( $1\mu\text{M}$ ) in control cardiomyocytes and in cells pretreated with a high agonist concentration ( $1\mu\text{M}$  ISO for 60 min at  $37^\circ\text{C}$ ) (Fig. 5). Peak currents measured under basal conditions were slightly higher in pretreated ( $-8.7\pm 1.3$  pA/pF) than in control cells (-

6.7±0.6 pA/pF,  $p=0.24$ ). When the cardiomyocytes were subsequently exposed to 1  $\mu$ M ISO,  $I_{Ca-L}$  was increased at each test potential. The  $\beta$ AR capacity to increase peak  $I_{Ca-L}$  was preserved in the ISO pretreated cells (increased to -17.8±0.6 pA/pF) in comparison with the control cells (-17.9±1.4 pA/pF, not statistically significant by 2-way ANOVA). The slope conductances under ISO test stimulation were similar in the pretreated (0.38±0.03 fS/pF) and control cells (0.44±0.04 fS/pF).

*Pretreatment with dibutyryl cAMP.* We previously demonstrated in murine fibroblast L cells expressing human  $\beta_2$ AR a significant 30% reduction of adenylyl cyclase responses to ISO in dibutyryl cAMP-pretreated *versus* control cells (Rousseau et al., 1997). In the present study, the adenylyl cyclase responses to ISO were similar in control cardiomyocytes (Fig. 6,A:  $EC_{50}$ :  $2.8 \pm 0.5 \times 10^{-7}$  M) and in cardiomyocytes pretreated with 1mM dibutyryl cAMP (Fig. 6,A:  $EC_{50}$ :  $4.2 \pm 1.4 \times 10^{-7}$  M). Also, the maximal adenylyl cyclase responses to NaF and forskolin were similar in the two groups (Table 1).

#### *Pretreatment with phorbol ester*

In contrast, pretreatment of the cardiomyocytes with 10  $\mu$ M 4  $\beta$ -phorbol-12-myristat-13-acetate (PMA) caused a reduction in cAMP production on subsequent ISO stimulation (Fig. 6,B), the maximal stimulation of adenylyl cyclase activity by ISO being significantly reduced by 20% ( $p < 0.05$ ). This effect of PMA was abolished by the PKC inhibitor bisindolylmaleimide.  $\beta$ AR density was not changed in PMA-pretreated cells (486±90 fmol/mg) in comparison with untreated controls (498±115 fmol/mg), suggesting that the desensitization was related to receptor uncoupling. The maximal responses to NaF and forskolin were not altered by PMA (Table 1).

## 6.5. Discussion

### *Preserved $\beta$ AR desensitisation under sustained stimulation*

The results of this study suggest that isolated canine cardiomyocytes (which express mainly  $\beta_1$ AR at their surface) do not obey the classical pattern of rapid  $\beta$ AR desensitization observed in cultured cell lines transfected with human  $\beta_2$ AR. In fact, although cardiac  $\beta$ -adrenergic signal transduction was still functional in the isolated cardiomyocytes, the mechanisms of sustained agonist-mediated regulation were found to be ineffective. Indeed, short term agonist stimulation at either low or high ISO concentrations failed to promote desensitization of ISO-induced cAMP generation, and prolonged exposure to high ISO concentrations (up to 60 minutes) also failed to reduce  $\beta$ AR coupling efficacy with the adenylyl cyclase. This contrasts sharply with the considerable degree of desensitization observed in cell lines expressing  $\beta_2$ AR (Rousseau et al. 1996).

The virtual absence of agonist-induced desensitization of cardiac  $\beta_1$ AR in canine cardiomyocytes is consistent with evidence that the mechanisms of  $\beta_2$ AR regulation cannot be directly extrapolated to the  $\beta_1$ AR. For instance, human  $\beta_1$ AR expressed in chinese hamster fibroblast were shown to be down-regulated much slowly than  $\beta_2$ AR (Suzuki et al. 1992). Furthermore, when expressed in murine Ltk<sup>-</sup> fibroblasts,  $\beta_1$ AR desensitization was less pronounced than  $\beta_2$ AR desensitization (Rousseau et al. 1996). Yet, a study conducted with rat cardiomyocytes demonstrated a reduced total cAMP content (20%) on subsequent ISO stimulation after being exposed for 10 min with nanomolar concentration of ISO without, however, reporting adenylyl cyclase activity (Murphy and Horackova, 1994). One possible explanation for the divergence between the latter observations and our results is that the rat cardiac  $\beta_1$ AR has 12 potential phosphorylation sites for GRK in its carboxyl



terminus (Machida et al. 1990) whereas the canine  $\beta_1$ AR only has 9 sites (Huang et al. 1997); thus, the rat  $\beta_1$ AR might respond more effectively to agonist-promoted desensitization than the canine  $\beta_1$ AR.

In this regard, phosphorylation of the  $\beta_2$ AR by GRK has been shown to play a key role in the development of rapid agonist-induced desensitization (for a review: Benovic et al. 1988; Kobilka et al. 1992). Whether this concept also applies to  $\beta_1$ AR remains controversial. Indeed, Zhou and Fishman (1991) reported that desensitization of  $\beta_1$ AR expressed in the SK-N-MC cell lines was independent of GRK. These observations were vigorously contradicted by another study using  $\beta_1$ AR expressed in chinese hamster fibroblast and 293 cell lines (Freedman et al. 1995). More recently, Rousseau et al. (1996) have clearly reconfirmed the fact that  $\beta_1$ AR is a poor substrate for GRK and  $\beta$ -arrestin. This may be inherent to the receptor's structure since substituting the last 130 amino acid sequence of the  $\beta_1$ AR for those of the  $\beta_2$ AR restored the desensitization pattern typical of  $\beta_2$ AR.

Among the different GRK subtypes known to date, GRK2 and GRK5 appear to be the dominant ones expressed in the heart and they have been detected in human (Ungerer et al. 1994) as well as in other species including pig (Ping et al. 1997) and rabbit (Maurice et al. 1999). Even then, it remains to be demonstrated whether GRK is actually expressed in the cardiomyocytes. In spite of all the evidence suggesting an association between an increased GRK activity, protein expression and a decreased  $\beta$ AR responsiveness when they are measured in whole heart tissue extracts from pathological animal models, no one has demonstrated that  $\beta$ AR stimulation could induce increased GRK activity in normal

cardiomyocytes. The current study provides, for the first time, evidence that ISO-induced GRK activity really does occur in isolated cardiomyocytes. However, it is not clear which of the two GRK was responsible for this increased activity since neither GRK2 nor GRK5 were detected in proteins extracted from isolated cardiomyocytes. Interestingly, both kinases were observed when proteins were extracted from the whole tissue. To date, no one has reported GRK expression in isolated cardiomyocytes. In a previous study, GRK activity was measured in cardiomyocytes derived from failing rabbit hearts and the authors assumed that this increased activity corresponded to the increase in GRK expression which they measured in whole tissue preparations (Maurice et al. 1999). Our results suggest that either the GRK activity observed in cardiomyocytes does not derive from the two kinases mentioned above or, if so, their expression is too low to be detected. Moreover, the fact that increasing GRK activity was measured under ISO stimulation, without any  $\beta$ AR desensitization, additionally supports the notion that  $\beta_1$ AR is a poor substrate for GRK, even in isolated cardiomyocytes that still demonstrate a functional  $\beta$ -adrenergic transduction system.

#### *Preserved functional $\beta$ -adrenergic transduction system*

The L-type voltage calcium channel has been identified as a downstream phosphorylation target of the  $\beta$ AR transduction system (Kamp and Hell, 2000). Using the whole-cell patch-clamp technique, we measured a 2 fold increase in  $I_{Ca,L}$  after exposing the isolated cardiomyocytes to ISO. Thus pre-treated cardiomyocytes displayed an increased  $I_{Ca,L}$  baseline, consistent with an increased basal phosphorylation of channels in these cells. Still, subsequent ISO stimulation of either pre-treated or control cells produced a similar increase in  $I_{Ca,L}$ , further supporting the absence of  $\beta$ AR desensitization in pre-treated

cardiomyocytes. In fact, direct PKA activation with the permeable cAMP analogues DBTcAMP did not alter the  $\beta$ AR capacity to induce adenylyl cyclase activity. Previous studies have shown that although ISO induced a rightward shift of the adenylyl cyclase response curve to ISO, no desensitization of  $\beta_1$ AR was observed when cells (SK-N-MC) were exposed to DBTcAMP or dopamine (Zhou and Fishman, 1991). Likewise, Murphy and Horackova (1994) showed that in rat cardiomyocytes  $\beta$ AR could not be desensitized by only increasing cAMP production with forskolin.

In contrast to DBTcAMP, direct activation of PKC with PMA was able to induce a relatively small but significant desensitization of  $\beta$ AR-coupled-adenylyl cyclase. Since  $\beta_2$ AR possesses important consensus sites for PKC (Bouvier et al. 1987; 1991), it cannot be excluded that  $\beta_1$ AR might contain similar sites. In cardiomyocytes,  $Ca^{2+}$ -dependent PKC isoforms have been demonstrated to play an important role in cardioprotection (Mitchell et al. 1995; Cohen and Downey, 1996; Wang and Ashraf, 1999). However, the mechanism by which PKC acts as a cardioprotector remains to be clarified. Interestingly, Muth et al. (1999) put forth the notion of "reciprocal regulation" between  $\beta$ AR signalling and an increased influx of  $Ca^{2+}$  and suggested that the effect of  $Ca^{2+}$  on  $\beta$ AR signaling might be mediated by PKC activation (Muth et al. 1999). Our observations are in agreement with this new regulation pathway for cardiac  $\beta$ AR. It has been previously demonstrated that PMA has the ability to modulate GRK activity in a PKC-dependent manner (Chuang et al. 1995; Winstel et al. 1996). Whether this occurs in isolated cardiomyocytes was not addressed here. Even so, according to the present findings increased GRK activity is less likely to be responsible for PMA-induced  $\beta$ AR desensitization in these cells.

In summary, our findings demonstrate that increased PKA and GRK activities in freshly isolated canine cardiomyocytes does not effectively induce desensitization of spontaneously expressed  $\beta$ ARs. The results thus suggest that cardiac  $\beta$ ARs are either 1) resistant to short term desensitization, 2) possess a compensatory mechanism prolonging isolated cell desensitization or 3) using a different desensitization pathway. In this regard, the involvement of PKC in the process of agonist-induced rapid cardiac  $\beta$ AR desensitization in a physiological context is consistent with a role of increased cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  as the feedback signal for reduced cardiac  $\beta$ AR coupling efficiency. Whether  $\text{Ca}^{2+}$  influx regulates  $\beta$ AR signaling in isolated cardiomyocytes deserves to be further investigated.

#### **6.6. Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (to RC). Charles-E. Laurent was supported by a studentship from the Medical Council of Canada. Guy Rousseau is the recipient of a Scholarship from the Canadian Hypertension Society and Canadian Institutes of Health Research. The authors thank Caroline Bouchard and Pierre Fortier for their excellent animal care assistance, Chantal De Montigny for her laboratory assistance and Suzan Senechal for her invaluable secretarial assistance.

## 6.7. References

- Benovic, J.L., Mayor, F., Staniszewski, C., Lefkowitz, R., and Caron, M.G. 1987. Purification and characterization of the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **262**: 9026-9032.
- Benovic, J.L., Bouvier, M., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. 1988. Regulation of adenylyl cyclase-coupled  $\beta$ -adrenergic receptors. *Ann. Rev. Cell Biology* **4**: 405-428.
- Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L.M.F., Benovic, J.L., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. 1987. Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation: Effects of agonist occupancy on phosphorylation of  $\alpha_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **262**: 3106-3113.
- Bouvier, M., Guilbault, N., and Bonin, H. 1991. Phorbol-ester-induced phosphorylation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor decreases its coupling to Gs. *FEBS Lett.* **279**: 243-248.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-259.
- Chuang, T.T., LeVine, H., and De Blasi, A. 1995. Phosphorylation and activation of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **270**: 18660-18665.

- Cohen, M.V., and Downey, J.M. 1996. Myocardial preconditioning promises to be a novel approach to the treatment of ischemic heart disease. *Annu. Rev. Med.* **47**: 21-9.
- De Léan, A., Hancock, A.A., and Lefkowitz, R.J. 1981. Validation and statistical analysis of a computer modelling method for quantitative analysis of radioligand binding data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* **21**: 5-16.
- Freedman, N.J., Liggett, S.B., Drachman, D.E., Pei, G., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. 1995. Phosphorylation and desensitization of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor; Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 17953-17961.
- Gagnon, A.W., and Kelly, E. 1997. Assay of G protein-coupled receptor kinase activity by rhodopsin phosphorylation. *Methods in Molecular Biology, Receptor Signal Transduction Protocols*, Edited by Challiss R.A.J., Humana Press Inc., Totowa, NJ vol. 83: pp. 235-242.
- Huang, R.R., Rapoport, D., Schaeffer, M.T., Cascieri, M.A. and Fong, T.M. 1997. Molecular cloning of the dog  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **17**: 599-607.
- Isenberg, G., and Klockner, U. 1982. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflueger's Arch.* **395**: 6-18.

- Kamp, T.J., and Hell, J.W. 2000. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ. Res.* **87**: 1095-1102.
- Kobilka, B.K. 1992. Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **15**: 87-114.
- Laurent, C-E., Cardinal, R., Rousseau, G., Vermeleun, M., Bouchard, C., Wilkinson, M., Armour, J.A., and Bouvier, M. 2001. Functional desensitization to isoproterenol without reducing cAMP production in canine failing cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **280**: R355-R364.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randal, R. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Machida, C.A., Bunzow, J.R., Searles, R.P., Van Tol, H., Tester, B., Neve, K.A., Teal, P., Nipper, V., and Civelli, O. 1990. Molecular cloning and expression of the rat  $\beta_1$ -adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.* **265**: 12960-12965.
- Maurice, J.P., Shah, A.S., Kypson, A.P., Hata, J.A., White, D.C., Glower, D.D., and Koch, W.J. 1999. Molecular  $\beta$ -adrenergic signaling abnormalities in failing rabbit hearts after infarction. *Am. J. Physiol.* **276**: H1853-H1860.

- Mitchell, M.B., Meng, X., Ao, L.H., Brown, J.H., Harken, A.H., and Banerjee, A. 1995. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ. Res.* **76**: 73-81.
- Murphy, M.G., and Horackova, M. 1994. Short-term exposure of intact ventricular myocytes to isoproterenol results in desensitization of adenylyl cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* **268**: 121-128.
- Muth, J.N., Yamaguchi, H., Mikala, G., Grupp, I.L., Cheng, H., Song, L-S., Lakatta, E.G., Varadi, G., and Schwartz, A. 1999. Cardiac-specific overexpression of the  $\alpha_1$  subunit of the L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel in transgenic mice; Loss of isoproterenol-induced contraction. *J. Biol. Chem.* **274**: 21503-6.
- Nantel, F., and Bouvier, M. 1993. Receptor regulation. *Neurotransmitter Receptors*, Edited by Hucho F., Elsevier, Amsterdam; New York pp. 99-109.
- Neve, K.A., Barrett, D.A., and Molinoff, P.B. 1985. Selective regulation of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptors by atypical agonists. *Pharmacol. Exp. Ther.* **235**: 657-664.
- Ping, P., Anzai, T., Gao, M., and Hammond, H.K. 1997. Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure. *Am. J. Physiol.* **273**: H707-H717.



- Rousseau, G., Nantel, F., and Bouvier, M. 1996. Distinct receptor domains determine subtype-specific coupling and desensitization phenotypes for human  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.* **49**: 752-760.
- Rousseau, G., Guilbault, N., Da Silva, A., Mouillac, B., Chidiac, P., and Bouvier, M. 1997. Influence of receptor density on the patterns of  $\beta_2$ -adrenoceptor desensitization. *Eur. J. Pharmacol.* **326**: 75-84.
- Salomon, P., Londos, C., and Rodbell, M. 1974. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* **58**: 541-548.
- Suzuki, T., Nguyen, C.T., Nantel, F., Bonin, H., Valiquette, M., Frielle, T., and Bouvier, M. 1992. Distinct regulation of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors in chinese hamster fibroblasts. *Mol. Pharm.* **41**: 542-48.
- Ungerer, M., Parruti, G., Böhm, M., Puzicha, M., De Blasi, A., Erdmann, E., and Lohse, M.J. 1994. Expression of  $\beta$ -arrestins and  $\beta$ -adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ. Res.* **74**: 206-213.
- Valet, P., Montastruc, J.L., Berlan, M., Tran, M.A., Lafontan, M., and Montastruc, P. 1989. Differential regulation of fat cell  $\beta_2$ - and  $\beta_1$ -adrenoceptors by endogenous catecholamines in dog. *Pharmacol. Exp. Ther.* **249**: 271-277.

- Vatner, D.E., Vatner, S.F., Nejima, J., Uemura, N., Susanni, E.E., Hintze, T.H., and Homcy, C.J. 1989. Chronic norepinephrine elicits desensitization by uncoupling the  $\beta$ -receptor. *J. Clin. Invest.* **84**: 1741-1748.
- Wang, Y., and Ashraf, M. 1999. Role of protein kinase C in mitochondrial  $K_{ATP}$  channel-mediated protection against  $Ca^{2+}$  overload injury in rat myocardium. *Circ. Res.* **84**: 1156-1165.
- Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E., and Lohse, M. 1996. Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2105-2109.
- Zhao, M., and Muntz, K. 1993. Differential downregulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in tissue compartments of rat heart is not altered by sympathetic denervation. *Circ. Res.* **73**: 943-951.
- Zhou, X-M., and Fishman, P.H. 1991. Desensitization of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor; Involvement of the cyclic AMP-dependent but not a receptor-specific protein kinase. *J. Bio. Chem.* **266**: 7462-68.

## Figure Legends

Figure 6.1. Preserved isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity after short-term stimulation with isoproterenol. Cardiomyocytes were treated for 15 min at 37°C with low (A) and high (B) concentrations of isoproterenol. For each experiment, the activity of the treated cells was expressed with reference to the maximal isoproterenol response (minus the basal activity) of untreated cells (100%). The data are expressed in pmol of cAMP produced per min per mg of membrane protein and mean±SEM of 4 (A) and 8 (B) separate experiments.

Figure 6.2. Preserved isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity after prolonged stimulation. Isolated cardiomyocytes were treated with 1  $\mu$ M of isoproterenol for 30 min (A) and 60 min (B). Measurements were made in membrane preparations and expressed as described in figure 1. Data are mean±SEM of 5 independent experiments for each condition.

Figure 6.3. Detection of GRK2 (A) and GRK 5 (B) in protein extracted from membrane preparations derived from whole tissue, but not from isolated cardiomyocytes. Representative autoradiograms (SDS-PAGE) of ventricular GRK expression. The GRK5 levels were also measured in protein extracted from cytosolic preparations.

Figure 6.4. Induction of GRK activity by exposure to isoproterenol in membrane and cytosolic fractions derived from isolated cardiomyocyte homogenates. Representative autoradiographs from dried gel shows GRK activity assay. Purified cytosolic and membrane

preparations (100 $\mu$ g) derived from control and isolated cardiomyocytes treated with 10 $\mu$ M isoproterenol (15 min at 37°C) were incubated with rhodopsin as the GRK substrate. The first two lanes represent rhodopsin phosphorylation with 50 nM of purified GRK2 (or  $\beta$ ARK1, courtesy of Dr. Jeff Benovic) in the absence or presence of 2 Units of heparin (Hep) to inhibit GRK activity. Increased GRK activity was observed in membrane preparations treated with isoproterenol while reduced activity was observed after treatment with heparin (last three lanes).

Figure 6.5. Similar magnitude of isoproterenol-induced stimulation of  $I_{Ca,L}$  in cardiomyocytes pre-treated with isoproterenol 10  $\mu$ M (60 min, 37°C) and cardiomyocytes pre-treated with vehicle (control). Current values were normalized with respect to cell capacitance and are presented as means $\pm$ SEM of 8 cells from 5 dogs. The maximal  $I_{Ca,L}$  in response to the test isoproterenol stimulation was similar in control untreated cells (-13.6 $\pm$ 1.4 pA/pF) and in cells pre-treated with isoproterenol (-17.8 $\pm$ 1.6 pA/pF ; p=0.075).

Figure 6.6. Heterologous desensitization of  $\beta$ AR with PMA but not with dibutyryl cAMP (DBTcAMP) in membranes extracted from isolated cardiomyocytes. Freshly isolated cardiomyocytes were treated either with (A) 1mM of DBTcAMP or (B) 10  $\mu$ M PMA. The adenylyl cyclase responses to isoproterenol were expressed as described in Fig. 1 and are presented as means $\pm$ SEM of 4 (A) and 7 (B) independent experiments. Adenylyl cyclase activities are presented as the means $\pm$ SEM of four (A) and seven (B) independent experiments.

Table 6.1:  $\beta$ AR density and adenylyl cyclase activity: effects of NaF and forskolin on treated cardiomyocytes isolated from canine heart.

Condition		$\beta$ AR density	NaF (10 mM)	Forskolin (100 $\mu$ M)
	(n)	<i>fmol/mg</i>	<i>pmol/min/mg</i>	
CTL	4	368 $\pm$ 40	148 $\pm$ 53	298 $\pm$ 110
ISO (10 nM; 15 min)	4	359 $\pm$ 24	157 $\pm$ 57	304 $\pm$ 107
CTL	8	390 $\pm$ 30	150 $\pm$ 37	236 $\pm$ 60
ISO (1 $\mu$ M; 15 min)	8	364 $\pm$ 33	137 $\pm$ 29	250 $\pm$ 60
CTL	5	377 $\pm$ 65	246 $\pm$ 94	372 $\pm$ 146
ISO (1 $\mu$ M; 30 min)	5	356 $\pm$ 63	210 $\pm$ 80	327 $\pm$ 128
CTL	5	258 $\pm$ 16	145 $\pm$ 31	206 $\pm$ 32
ISO (1 $\mu$ M; 60 min)	5	232 $\pm$ 16	128 $\pm$ 18	200 $\pm$ 21
CTL	4	345 $\pm$ 39	147 $\pm$ 105	298 $\pm$ 221
DBTcAMP (1 mM; 15 min)	4	379 $\pm$ 47	153 $\pm$ 66	281 $\pm$ 119
CTL	7	498 $\pm$ 115	116 $\pm$ 36	148 $\pm$ 71
PMA (10 $\mu$ M; 15 min)	7	486 $\pm$ 90	124 $\pm$ 43	137 $\pm$ 57

Data are mean $\pm$ SEM, n= number of observations in each group.

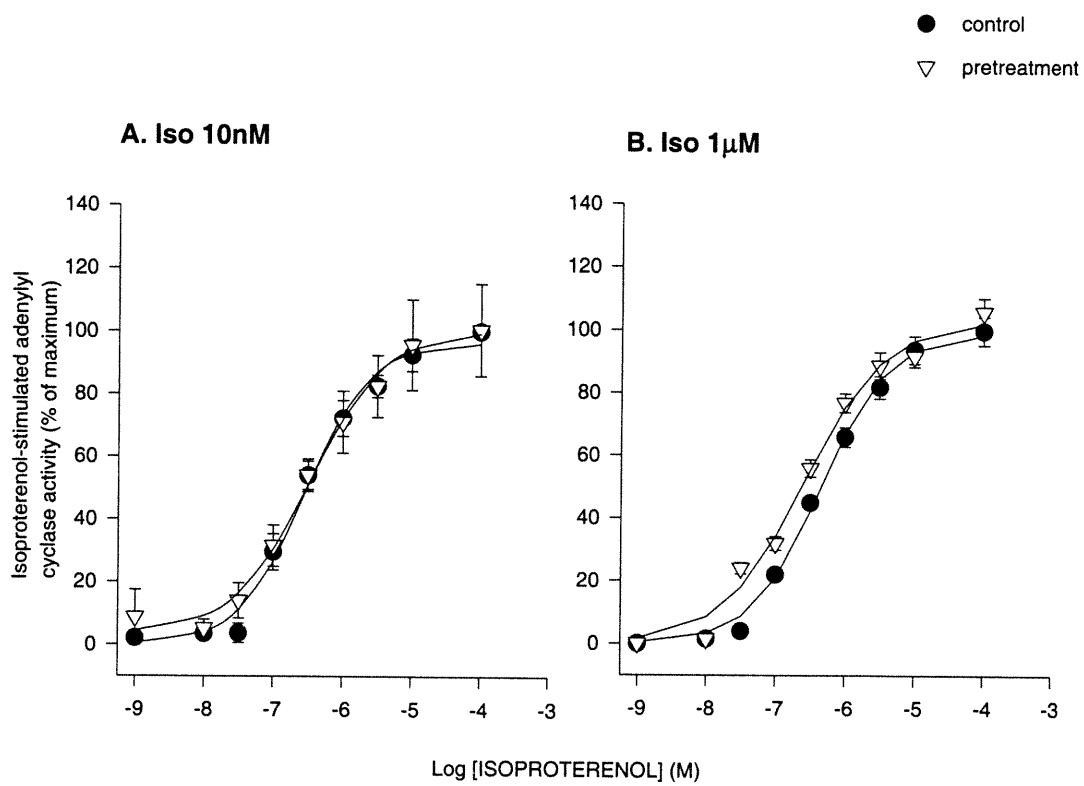


Figure 6.1

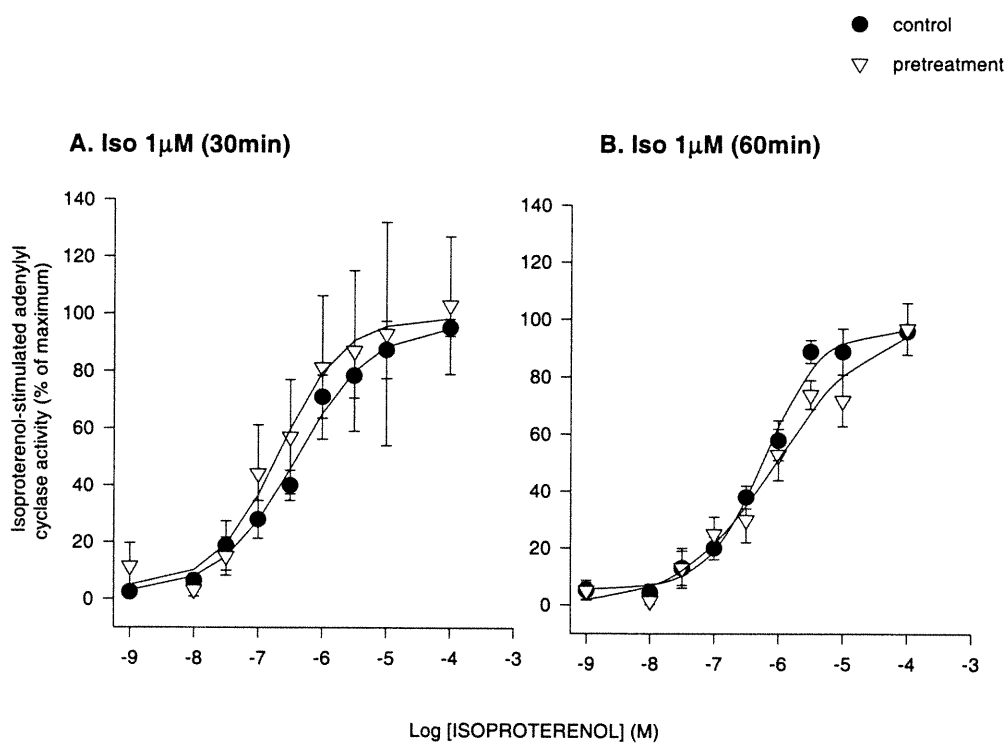
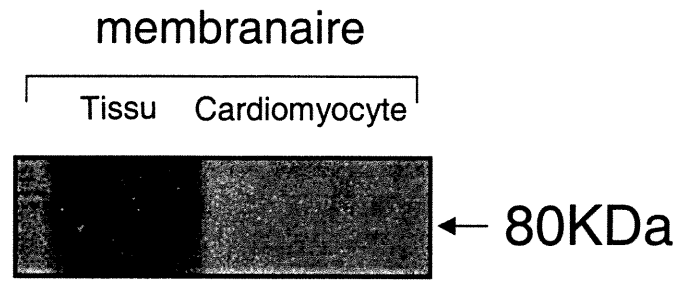


Figure 6.2

## A. GRK2



## B. GRK5

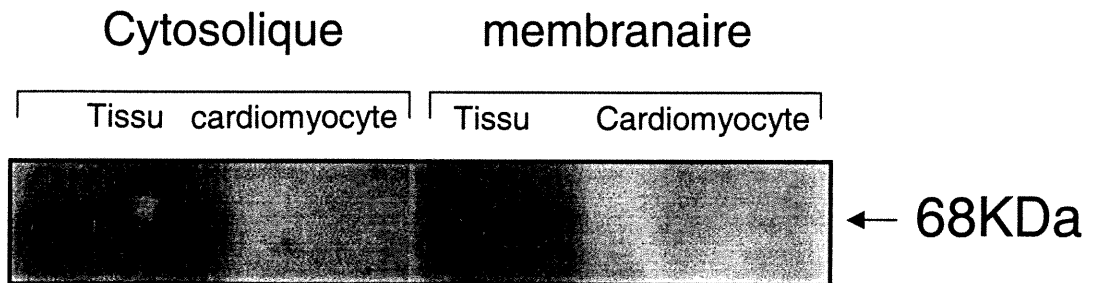


Figure 6.3



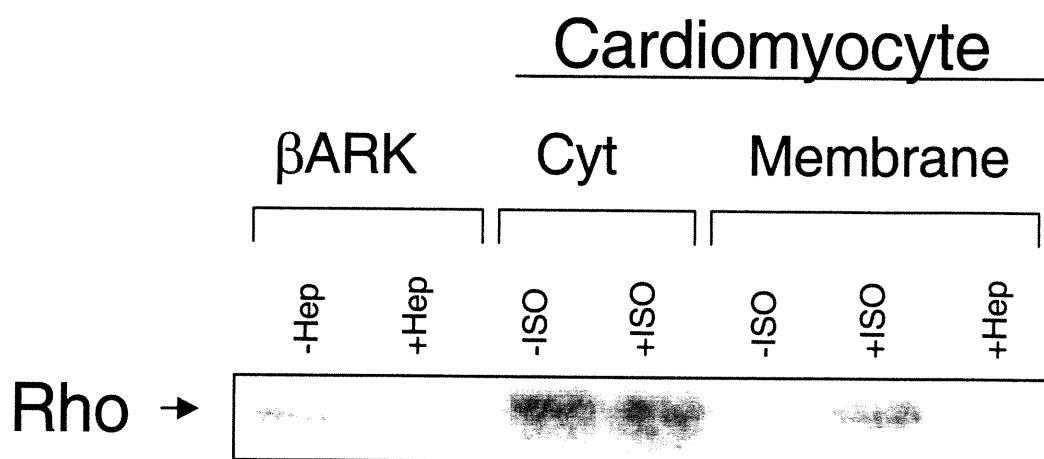


Figure 6.4

### Courbe I-V des canaux calcique de type-L

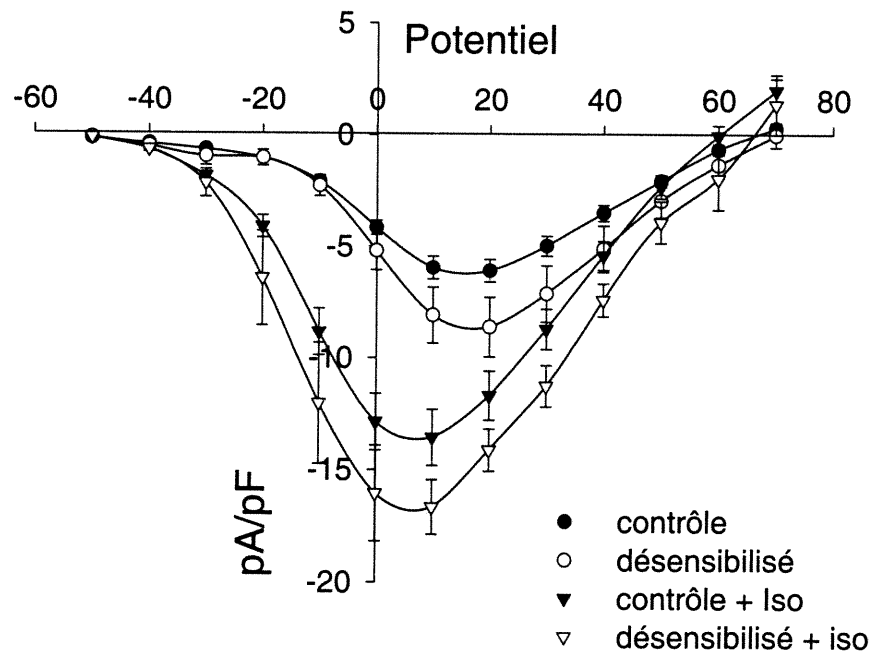


Figure 6.5

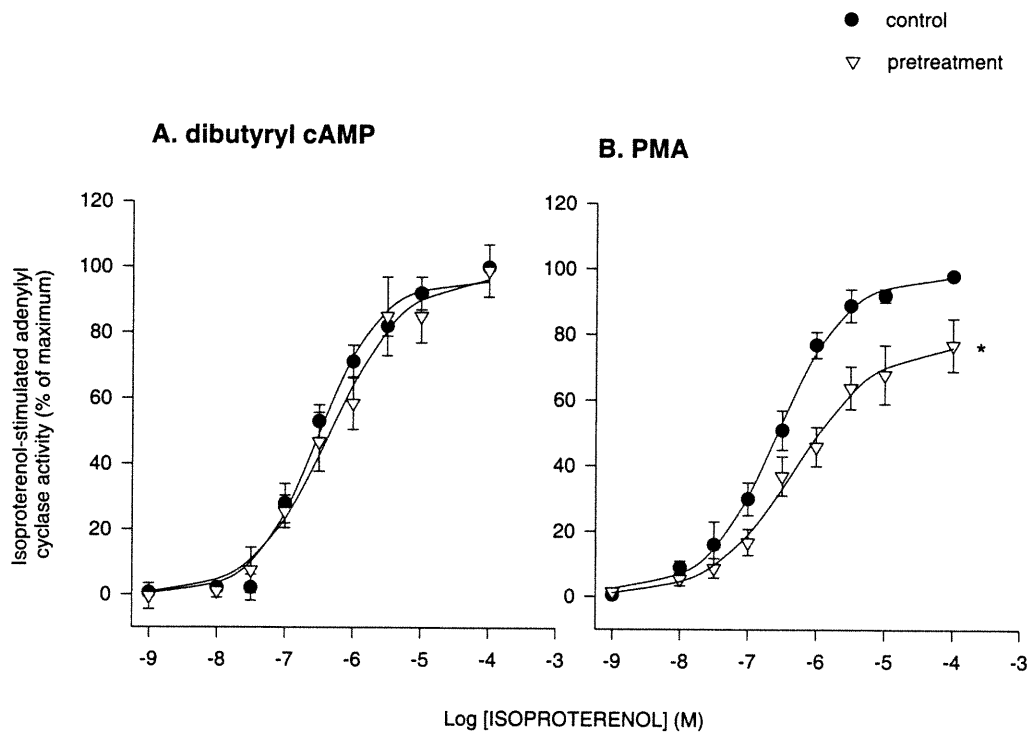


Figure 6.6

**CHAPITRE 7: Interleukin 6-induced  $\beta$ AR desensitization**

## CHAPITRE 7

Interleukin 6-induced  $\beta$ -adrenergic receptor uncoupling through stimulation of NO synthase in canine isolated cardiomyocytes

Charles-E Laurent<sup>1,2</sup>, Guy Rousseau<sup>1,2</sup>, Michel Bouvier<sup>1,3</sup> and René Cardinal<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Québec, H4J 1C5, Départements de <sup>2</sup>Pharmacologie et <sup>3</sup>Biochimie, faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7

**Running title** : Interleukin 6-induced  $\beta$ AR desensitization

Correspondence: René Cardinal, Ph.D.  
Centre de recherche  
Hôpital du Sacré-Coeur de Montreal  
5400, boul. Gouin ouest  
Montréal. (Québec)  
Canada, H4J 1C5  
Tel.: (514) 338-3180  
FAX: (514) 338-2694  
E-mail: cardinal@crhsc.umontreal.ca

### 7.1. Abstract

Cytokine-induced reduction in contractile response to isoproterenol has been shown to be mediated through the nitric oxide (NO) synthase (NOS) stimulation and NO production. The mechanism by which NO reduces contractile response has been suggested to be related not only to reduced  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the myofilaments, but also to modulation of the  $\beta$ -adrenergic signaling pathway. In the present study, we treated cardiomyocytes isolated from canine hearts with interleukin-6 (IL-6, 20 U/ml for 15 min) and observed a significant 30% ( $p < .05$ ) reduction of  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ AR) -mediated adenylyl cyclase activity. This effect was most likely due to  $\beta$ AR uncoupling since no changes were observed in cAMP production under forskolin stimulation (control:  $188 \pm 27$  vs treated:  $211 \pm 36$  pmol/min/mg of proteins) and  $\beta$ AR density (control:  $593 \pm 170$  vs treated:  $584 \pm 143$  fmol/mg protein). IL-6-induced  $\beta$ AR uncoupling was blocked by the NOS inhibitor L-nitroarginine-methyl ester (L-NAME) suggesting that  $\beta$ AR uncoupling was related to NO production. This study suggests that rapid cardiac  $\beta$ AR desensitization can occur through a novel pathway requiring NOS stimulation and NO production.

## 7.2. Introduction

Macrophage-derived cytokines such as tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), and interleukin-6 (IL-6) are present in high levels in heart failure (Levine *et al.* 1990; Torre-Amione *et al.*, 1996) and have been shown to exert a negative inotropic effect (Ungureanu-Longrois *et al.*, 1995; Finkel *et al.*, 1992). Such cytokine-induced negative inotropic effects are mainly related to increased nitric oxide (NO). In cardiomyocytes, NO is generated by two types of NO synthase (NOS), the endothelial-type NOS (eNOS) and the inducible NOS (iNOS). Although, eNOS is constitutively expressed, cytokines strongly induce iNOS which is thought to be responsible for most of the cardiac myocyte NO production (Ing *et al.*, 1999). Increased cytosolic levels of NO exert many effects in cardiac myocytes such as depression of contractility and electrophysiological stabilization through several mechanisms, including modulation of L-type calcium channel current ( $I_{CaL}$ ), generation of peroxynitrite (Kelly and Smith, 1997) and activation of the soluble guanylyl cyclase (GC), leading to the production of cGMP and subsequent activation of cGMP-dependent protein kinase (PKG) (Moncada *et al.*, 1991; Ignarro and Kadoitz, 1985). Activated PKG has several protein targets including the L-type calcium channel (Wahler and Dollinger, 1995), reducing the inward current  $I_{CaL}$ , and the inhibitory subunits of troponin (Pfitzer *et al.*, 1982), decreasing the  $Ca^{2+}$  sensitivity of the myofilaments (Vila-Petroff *et al.*, 1999).

Recently Adam *et al.* (1999) reported that, in a cell line, NO could also inhibit  $\beta$ -adrenergic-stimulated cAMP production through functional uncoupling of the receptor from Gs. It is not clear whether such desensitization might occur in cardiomyocytes. However,

previous studies have demonstrated reduced  $\beta$ -adrenergic response after prolonged stimulation with soluble mediators secreted by immune cells on neonatal cardiomyocytes (Chung et al., 1990; Balligand et al., 1993). In this report, we demonstrated that short term exposure with IL-6 produced rapid desensitization of  $\beta$ AR-mediated adenylyl cyclase activity in isolated adult canine cardiomyocytes. The IL-6 effect on  $\beta$ AR signaling could be prevented by adding a nonspecific inhibitor of NOS, suggesting a possible implication of the endogenous NO signaling pathway.

### 7.3. Methods

*Animals.* Mongrel dogs (18-25 Kg) of either sex were anaesthetized with sodium thiopental (25 mg/Kg). The heart was exposed through a left thoracotomy, heparinized, excised and immediately placed in cold (4°C) tyrode solution containing 128 mM NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 470  $\mu$ M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.2), 11 mM dextrose, 4.5 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>. (All chemicals were obtained from Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA, unless specified otherwise). The left ventricular anterior wall was excised and kept in cold Tyrode solution in which a large diagonal branch of the left anterior descending coronary artery was cannulated for the cardiomyocyte isolation procedure.

*Preparation of isolated cardiomyocytes.* Cardiomyocytes were isolated by perfusing a ventricular tissue block through a branch of the main left anterior descending coronary artery. Perfusion began with Tyrode solution containing 0.3 mM Ca<sup>2+</sup> to remove blood cells. Afterwards, perfusion (5 min) was instituted with Ca<sup>2+</sup> free-HEPES buffer supplement with 5 mM nitriloacetic acid. The HEPES buffer contained 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 35 mM sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.0), 4 mM taurine. Perfusion was again changed to HEPES



buffer solution containing 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and then to HEPES containing 0.05% collagenase (type A, Boehringer Mannheim, Laval, Canada), 0.02% trypsin inhibitor (type II-s) and 0.28 mg/ml protease (type XIV) for 25 min, all solutions being oxygenated and maintained at 37°C. During perfusion, the left ventricle was electrically stimulated with a Grass electrode apparatus set at 60 batt./min. After collagenase-protease digestion, the perfused region was dissected and transferred to a 50 ml Erlenmeyer flask containing 10 ml of 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  HEPES-collagenase and incubated at 37°C under a stream of  $\text{O}_2$  for 20 min. This procedure was repeated 4 times using fresh HEPES-collagenase solution, collecting and filtering (200 $\mu$  nylon filter) the supernatant after each incubation period. The collected aliquots, which contained the isolated cardiomyocytes, were centrifuged (50  $\times$  g) for 1 min and the pellets were resuspended in 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -HEPES solution (pH 7.4). Aliquot cardiomyocyte enrichment and their morphological integrity were verified visually with an inverted microscope (Diaphot, Nikon Corp., Tokyo, Japan).

*Crude membrane preparations.* Isolated cardiomyocytes were placed in lysis solution (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA), 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor and 10  $\mu$ g/ml benzamidine) and homogenized with a polytron (3 bursts of 7 sec. at maximum speed; Brinkmann Instruments, Inc., Wesbury, NY, USA). The homogenate was centrifuged at 1000  $\times$  g for 5 minutes at 4°C (Whole tissue homogenate was filtered through 3 layers of cheese cloth before the centrifugation step). The supernatant was removed and centrifuged at 45 000  $\times$  g at 4°C for 20 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 10 ml of the lysis solution and centrifuged at 45 000  $\times$  g. The final pellet was resuspended in an ice cold buffer containing 75 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM EDTA, to a final concentration of 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l of proteins. Protein content was determined by the method of Bradford (1976).

*Adenylyl cyclase assay.* Adenylyl cyclase activity was measured after Salomon et al. (1974) using 10  $\mu\text{g}$  of membrane protein from tissue or cell homogenates in a total volume of 50  $\mu\text{l}$ . The incubation medium included 120  $\mu\text{M}$  ATP, 0.5  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 100  $\mu\text{M}$  cAMP, 53  $\mu\text{M}$  GTP, 2.8 mM phospho-enolpyruvate, 0.2 unit pyruvate kinase, 1 unit of myokinase, 30 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine and 0.8 mM EDTA. Reactions were initiated by adding the membrane to incubation medium ( $37^\circ\text{C}$ ) for 30 minutes before being stopped by adding 1ml of ice-cold solution containing 0.4 mM ATP, 0.3 mM cAMP and [ $^3\text{H}$ ]cAMP (25,000 cpm), the latter being used to assess the efficiency of the isolation procedure. The cAMP was isolated by sequential chromatography on a Dowex cation-exchange resin and aluminum oxide. Enzyme activity stimulated by isoproterenol ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$ ), NaF (10 mM NaF) and forskolin (100  $\mu\text{M}$ ) were determined in duplicate. Isoproterenol concentration-response curves were fitted to a sigmoid using the Allfit computer software.

*$\beta$ -adrenergic receptor binding studies.* Binding assays were conducted using [ $^{125}\text{I}$ ]CYP in crude membranes derived from isolated myocytes (prepared as described above). Membrane preparations (10  $\mu\text{g}$  protein) were incubated in triplicate using a single saturating concentration of [ $^{125}\text{I}$ ]CYP (300 pM), non specific binding being determined using 10  $\mu\text{M}$  alprenolol at room temperature for 90 minutes in a final volume of 500  $\mu\text{l}$  containing 75 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM EDTA. Binding reactions were stopped by rapid filtration over Whatman GF/C fiberglass filters using a cold solution containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 2 mM EDTA.

#### **7.4. Results**

To determine if IL-6 can modulate cardiac  $\beta$ -adrenergic signaling, the effect of IL-6 on isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity was assessed in canine isolated cardiomyocytes. As shown in Fig. 1A, treatment with 20 U/ml IL-6 for 15 min at 37°C decreased (30%;  $p < 0.05$ ) the capacity of  $\beta$ -adrenergic agonist to induce adenylyl cyclase activity. In contrast to the significant effect on the receptor-stimulated cAMP production, IL-6 was without effect on cAMP accumulation when concentration of forskolin that gave submaximal cAMP responses was used (control:  $188 \pm 27$  vs treated:  $211 \pm 36$  pmol/min/mg of protein). When total  $\beta$ ARs numbers were measured, similar results were obtained in control ( $593 \pm 170$  fmol/mg of protein) and treated cells ( $584 \pm 143$  fmol/mg of protein).

IL-6 is believed to induce NO production in cardiomyocytes, which in turn can increase the hydrolysis of cAMP by activating phosphodiesterase through, a cGMP pathway (Han et al., 1995). However, the blunting effect of IL-6 on the response to isoproterenol observed here is unlikely to be due to increased degradation of cAMP since a nonspecific phosphodiesterase inhibitor, IBMX, was present in all experiments. Furthermore, if IL-6 effect was due to increase NO-induced phosphodiesterase activity, reduction in the forskolin-stimulated adenylyl cyclase would have also been observed.

To determine if IL-6 capacity to induce NO production in isolated cardiomyocytes could also have an effect on receptor-stimulated cAMP production, L-nitroarginine-methyl ester (L-NAME) was used as an inhibitor of NOS. Addition of L-NAME (10  $\mu$ M), 20 min prior to IL-6, completely blocked the IL-6-induced  $\beta$ AR desensitization (Fig. 1B). In absence of IL-6, L-NAME was without effect on isoproterenol-stimulated cAMP production (data not shown). These results thus suggest that the endogenous production of NO is responsible for IL-6-induced decrease in receptor-stimulated cAMP production.

## 7.5. Discussion

The present study suggests that IL-6 produces, through activation of NOS, a small but significant rapid inhibition of  $\beta$ AR capacity to induce adenylyl cyclase activity in adult canine isolated cardiomyocytes. The notion that interleukin and NO induce a functional inhibition of  $\beta$ -adrenergic signaling has previously received experimental report (Chung et al., 1990; Balligand et al., 1993). However, the molecular basis for an antagonist action of NO on  $\beta$ -adrenergic signal transduction is just starting to emerge. Indeed, Adam et al. (1999) have demonstrated that the effect of NO on the  $\beta$ -adrenergic-stimulated adenylyl cyclase activity occurs upstream of the G protein in a cell line over expressing the  $\beta_2$ AR subtype. The data reported herein suggest that the  $\beta$ -adrenergic antagonistic effect of NO on isolated cardiomyocytes, predominantly expressing  $\beta_1$ AR subtypes (Laurent et al., 2001), might also occur upstream of the G protein since forskolin-stimulated activity is not affected. Whether IL-6 induces cardiac  $\beta$ AR desensitization through NO-promoted depalmitoylation of the cardiac  $\beta$ AR as observed for the  $\beta_2$ AR (Adam et al., 1999) still remains unclear.

In cardiomyocytes, endogenous NO induced by cytokines is linked to increased iNOS expression (Balligand et al., 1994). Such expression reaches its peak after 12 hours of stimulation. Accordingly, Chung et al., (1990) observed a 74% inhibition in the intracellular cAMP accumulation in response to isoproterenol after 72 hours of cytokine stimulation in neonatal rat myocytes. Here, we observe a 30% reduction in  $\beta$ -adrenergic-mediated induction of adenylyl cyclase activity in adult canine cardiomyocytes treated with IL-6 for 15 min. Interestingly, even after only 15 min, this IL-6 effect was shown to be dependent on NO production since the effect was blocked with the NOS inhibitor L-NAME. However, it is unlikely that the expression of iNOS after only 15 min of IL-6 stimulation is

sufficient for the NO production responsible for  $\beta$ AR desensitization. It is thus possible that fresh isolated cardiomyocytes were already expressing iNOS, which would explain the rapid response observed.

In summary, we have shown that IL-6 inhibit cardiomyocyte  $\beta$ -adrenergic agonist - stimulated adenylyl cyclase activity by disrupting signal transduction across the sarcolemma. Our data suggest that the action of IL-6 through NOS stimulation regulate  $\beta$ -adrenergic signaling upstream of the Gs protein. This uncoupling appears to represent a novel biological mechanism by which endogenous agents, such as cytokines, might contribute to rapid modulation of cardiac function.

## **7.6. Acknowledgments**

This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (to RC). Charles-E. Laurent was supported by a studentship from the Medical Council of Canada. Guy Rousseau is the recipient of a Scholarship from the Canadian Hypertension Society and Medical Research Council of Canada. The authors thank Caroline Bouchard for her excellent animal care assistance and Suzan Senechal for her invaluable secretarial assistance.

## 7.7. References

- Adam L., Bouvier M., Jones T.L., 1999. Nitric oxide modulates  $\beta_2$ -adrenergic receptor palmitoylation and signaling. *J Biol Chem* 274:26337-43.
- Balligand J-L., Ungureanu D., Kelly R.A., Kobzik L., Pimental D., Michel T., Smith T.W. 1993. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J. Clin. Invest.* 91:2314-2319.
- Chung M.K., Gulick T.S., Rotondo R.E., Schreiner G.F., Lange L.G. 1990. Mechanism of cytokine inhibition of  $\beta$ -adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes: Impairment of signal transduction. *Circ. Res.* 67:753-763.
- Finkel M.S. Oddis C.V. Jacob T.D. Watkins S.C. Hattler B.G. Simmons R.L. 1992. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* 257:387-9.
- Han X., Shimoni Y., Giles W.R. 1995. A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. *J. Gen. Physiol.* 106: 45-65.
- Ignarro L.J., Kadoitz p.J. 1985. The pharmacological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 25:171-191.
- Ing D.J., Zang J., Dzau V.J., Webster K.A., Bishopric N.H. 1999. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ Res.* 84:21-33.

- Kelly R.A., Smith T.W. 1997. Cytokines and cardiac contractile function. *Circulation* 95:778-781.
- Laurent C-E., Cardinal R., Rousseau G., Vermeulen M., Bouchard C., Wilkinson M., Armour J.A., Bouvier M. 2001. Functional desensitization to isoproterenol without reducing cAMP production in canine failing cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 280:R355-R364.
- Levine B., Kalman J., Mayer L., Fillit H.M., Packer M. 1990. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 223:236-241.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142.
- Pfister G., Rüegg J.C., Flockerzi V., Hofmann F. 1982. cGMP-dependent protein kinase decreases calcium sensitivity of skinned cardiac fibers. *FEBS lett.* 149:171-175.
- Torre-Amione G., Kapadia S., Benedict C., Oral H., Young J.B., Mann D. 1996. Proinflammatory cytokines levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). *J. Am. Coll. Cardiol.* 27:1201-1206.
- Ungureanu-Longrois D., Balligand J-L., Simmons W.W., Okada I., Kobzik L., Lowenstein C.J., Kunkel S.L., Michel T., Kelly R.A., Smith T.W. 1995. Induction of nitric oxide synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but not sufficient to decrease contractile responsiveness to  $\beta$ -adrenergic agonists. *Circ Res.* 77:494-502.



Vila-Petroff M.G., Younes A., Egan J., Lakatta E.G., Sollott S.J. 1999. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 84:1020-31.

Wahler G.M., Dollinger S.J. 1995. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol.* 268:C45-C54.

## Figure Legends

Figure 7.1: Inhibition by IL-6 of isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity in isolated cardiomyocytes. (A) Intact cardiomyocytes were incubated with IL-6 (20 U/mL) for 15 min at 37°C or (B) with L-NAME (10  $\mu$ M) for 20 min prior to IL-6 and membranes derived from homogenates of these cells were subsequently challenged with increasing concentrations of isoproterenol. A. Isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity was significantly depressed when cardiomyocytes were treated with IL-6 (\*,  $p < 0.05$ ). B. IL-6 effect was completely blocked when cells were treated with L-NAME. For each experiment, the maximal isoproterenol response minus the basal response of the control cells was set to 100%. The data (mean  $\pm$  SEM of 3 separate experiments) are expressed in pmol of cAMP produced per minute per mg of membrane protein.

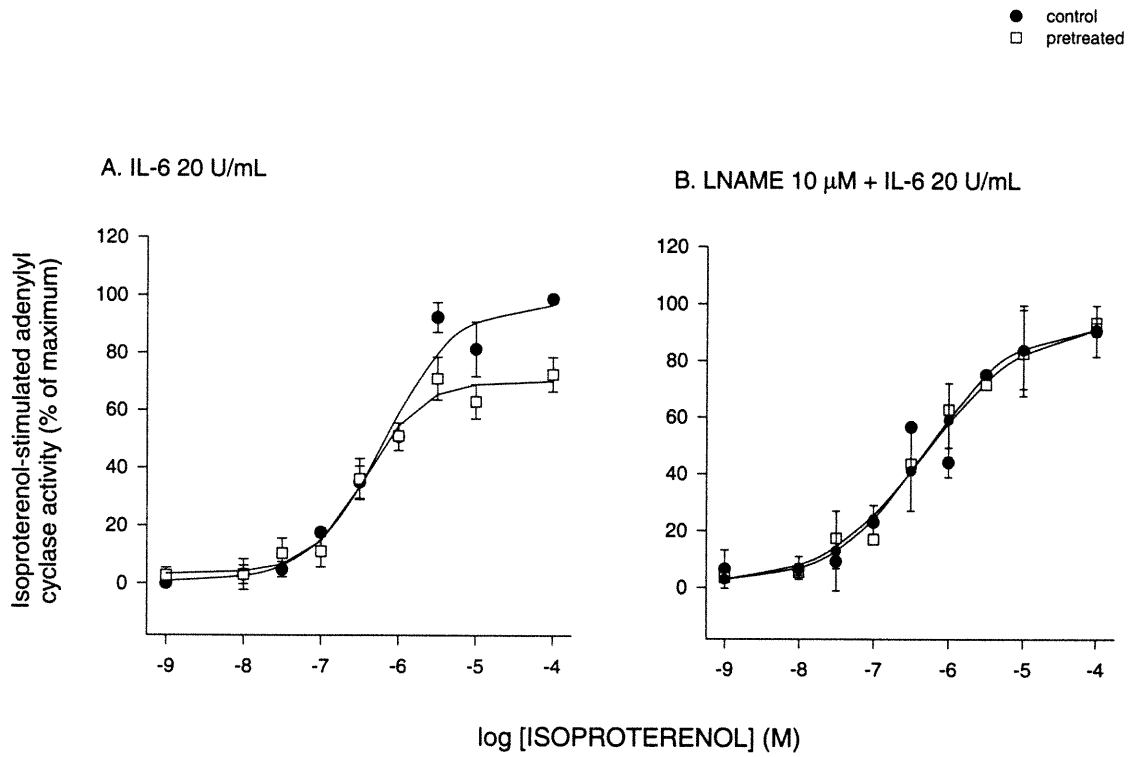


Figure 7.1

## DISCUSSION

Plusieurs études antérieures ont démontré que dans l'insuffisance cardiaque, observée soit chez l'humain ou sur des modèles animaux, les fonctions contractiles du ventricule gauche à l'état basal et en réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique sont diminuées. De telles modifications ont été observées dans le modèle d'insuffisance cardiaque induite par entraînement rapide, à la fois lorsque mesurées au niveau du tissu (Calderone et al 1991; Marzo et al. 1991; Kiuchi et al. 1993) ou au niveau des cellules isolées (Ravens et al. 1996). En effet, une baisse des fonctions contractiles a été généralement reliée à une diminution de la signalisation  $\beta$ -adrénergique, celle-ci étant mesurée uniquement à partir de préparations membranaires de tissu homogénéisé. Cependant, une relation spécifique entre les modifications moléculaires dans le système de transduction  $\beta$ -adrénergique et les fonctions contractiles au niveau des cardiomyocytes isolés n'a jamais été établie. Dans cette étude, qui vise justement à faire cette relation, nous avons utilisé le modèle d'insuffisance cardiaque induite par entraînement rapide des ventricules chez le chien, lequel a déjà démontré des caractéristiques d'insuffisance cardiaque représentatives de celles observées chez l'humain. Ce modèle nous permet également d'obtenir un nombre suffisant de cardiomyocytes viables pour effectuer les mesures moléculaires.

Dans la première partie de cet ouvrage, nous avons observé qu'à l'état basal l'amplitude et la vitesse de contraction ainsi que la vitesse de relaxation des cellules étaient significativement diminuées dans les cardiomyocytes insuffisants. Ces changements sont cohérents avec la diminution en myofibrilles (Spinale et al. 1992) et les modifications du couplage excitation-contraction (O'Rourke et al. 1999; Raven et al. 1996; Vatner et al. 1994) rapportées pour ce modèle d'insuffisance cardiaque. Une baisse des fonctions contractiles a également été mesurée en réponse à l'isoprotérénol ( $5 \times 10^{-9}$  à  $10^{-8}$  M). De même, l'effet de l'isoprotérénol sur le courant  $I_{Ca-L}$  était diminué dans les cardiomyocytes dérivés de coeurs en insuffisance cardiaque, corroborant les résultats de Kääb et al. (1996).

Les fonctions contractiles des cardiomyocytes insuffisants se sont avérées diminuées, bien qu'il n'y ait eu aucune réduction de la densité des  $\beta$ ARs, ni réduction de la génération d'AMPc induite par la stimulation des  $\beta$ ARs lorsque mesurées dans l'homogénat de cardiomyocytes. Ces résultats suggèrent donc que la réduction de la réponse contractile à la stimulation  $\beta$ -adrénergique pourrait être reliée aux modifications dans le mécanisme de couplage excitation-contraction et de l'appareil contractile plutôt qu'à une modification dans la capacité des  $\beta$ ARs d'induire la production d'AMPc. Cependant, les résultats obtenus dans d'autres modèles d'insuffisance cardiaque (Anderson et al., 1999 ; Anzai et al. 1998) ainsi que chez l'humain en insuffisance cardiaque (Bristow et al. 1991) indiquent que la réduction du nombre de  $\beta$ ARs et de la génération d'AMPc pourrait être effectivement un

facteur limitant la réponse contractile à l'isoprotérénol dans d'autres situations pathophysiologiques.

Toutefois, lorsque mesurée dans l'homogénat de tissu, la densité des  $\beta_1$ ARs, ainsi que la génération d'AMPc se sont avérées être significativement diminuées, tel qu'observé par Kiuchi et al. (1993) dans ce même modèle. Cette diminution de production d'AMPc semblait être causée par la diminution des  $\beta_1$ ARs puisque contrairement à ce qui a déjà été publié (Calderone et al. 1991 ; Marzo et al., 1991; Kiuchi et al., 1993), la stimulation avec la forskoline dans notre préparation de tissu homogénéisé insuffisant n'était pas réduite. Selon Ishikawa et al. (1994), une diminution du taux d'ARN messenger codant pour l'adénylyl cyclase de types V et VI ne serait perçue que dans les cas où l'insuffisance est très sévère. Il semble donc que la diminution de l'adénylyl cyclase soit le résultat, plutôt que la cause de la progression de la pathologie. Il est possible que l'adénylyl cyclase n'ait pas eu le temps d'être affectée dans notre préparation, suggérant que les autres études avaient atteint un niveau d'insuffisance plus avancé. Néanmoins, plusieurs variables mesurées nous indiquent que les coeurs de chien utilisés dans cette étude étaient bien dans un état pathologique. En effet, la fraction d'éjection était diminuée d'environ 61%, la pression capillaire pulmonaire bloquée était augmentée de 69% et la concentration de noradrénaline plasmatique était augmentée de 3 à 6 fois. Ainsi, les autres composantes du signal de transduction des  $\beta$ ARs ont probablement été affectées dans le tissu entier avant qu'il n'y ait eu une modification au niveau de l'adénylyl cyclase.

Ainsi, nos résultats suggèrent que la diminution de la capacité des  $\beta$ ARs de stimuler l'adénylyl cyclase dans notre préparation de tissu homogénéisé était le résultat d'une diminution des  $\beta_1$ ARs fonctionnels (voir tableau 5.3) plutôt que le résultat d'une diminution de l'expression ou de l'intégrité de l'adénylyl cyclase.

Le fait que nous obtenions des résultats divergents entre les mesures prises dans l'homogénat de cardiomyocytes et celles prises dans le tissu pourrait s'expliquer en considérant la fraction non-cardiomyocytaire. En effet, l'augmentation relative du nombre de  $\beta_2$ ARs, majoritairement exprimés dans les fibroblastes cardiaques (Lau et al. 1980), pourrait être la conséquence des changements dans la composition du tissu, comme par exemple une augmentation plus importante des cellules interstitielles par rapport aux cardiomyocytes (Weber et al. 1990). Par contre, Liu et al. (1995) ont mesuré une augmentation du nombre de cardiomyocytes en cours d'apoptose dans ce modèle d'insuffisance cardiaque; ceci pourrait aussi contribuer aux changements dans la composition du tissu, en plus de participer à la progression de l'insuffisance. Ainsi, l'augmentation des cellules interstitielles est en accord avec le fait que le ratio  $\beta_1/\beta_2$  observé dans le tissu de coeurs de chiens en insuffisance cardiaque est semblable à celui mesuré dans la fraction non-cardiomyocytaire. De la même façon, l'augmentation des cellules non-cardiomyocytaires avec une production d'AMPc faible pourrait expliquer la diminution de la capacité des  $\beta$ ARs cardiaques de produire

l'AMPc dans le tissu des coeurs pathologiques mais pas dans les cardiomyocytes isolés.

Dans les cardiomyocytes isolés de coeurs insuffisants, nous avons mesuré une densité de  $\beta$ ARs significativement augmentée, sans changement dans le ratio  $\beta_1/\beta_2$ , ni dans la capacité des  $\beta$ ARs d'induire une hausse de l'activité de l'adénylyl cyclase. Malheureusement, nous n'avons pas d'explication précise pour cette augmentation. Cependant, nous avons rapporté dans le chapitre 1 des études de l'ischémie myocardique dans lesquelles la densité des  $\beta$ ARs était augmentée. Cette pathologie crée une situation de déficience énergétique qui pourrait nuire au processus d'internalisation des récepteurs adrénérgiques, expliquant l'augmentation des  $\beta$ ARs dans les modèles d'ischémie (Strasser et al., 1988). Il faut réaliser, sous ce rapport, qu'un état de déficience énergétique est induit par l'entraînement rapide des ventricules chez le chien (Coleman et al. 1971; O'Brien et al. 1990) et que d'ailleurs, cette déficience pourrait être à l'origine du développement de l'insuffisance cardiaque dans ce modèle.

Ces résultats suggèrent que la réduction de la réponse fonctionnelle observée sous stimulation à l'isoprotérénol dans ce modèle pourrait être avant tout le résultat d'une modification au niveau des mécanismes de couplage excitation-contraction et des protéines de contraction. Une modification au niveau de ces mécanismes peut donc être observée sans



changement apparent dans le signal de transduction des  $\beta$ ARs mesuré dans les cardiomyocytes isolés. Ceci pourrait expliquer pourquoi Juneau et al. (1992) ont observé une diminution de la contraction basale dans une préparation de muscles papillaires insuffisants alors que la réponse à l'isoprotérénol était préservée (tout en mesurant une diminution du signal de transduction  $\beta$ AR dans l'homogénat de tissu). Nos résultats impliquent également que les mesures prises à partir de l'homogénat de tissu ne soient pas nécessairement représentatives des mesures prises dans les cardiomyocytes. D'autres études méritent d'être faites afin de déterminer la nature exacte de cette différence.

L'absence de modification de la transduction  $\beta$ -adrénergique mesurée dans les cardiomyocytes insuffisants, nous a conduit à nous interroger sur la régulation des  $\beta$ ARs exprimés à la surface de ces cellules. En fait, peu d'efforts ont été déployés pour caractériser la régulation des  $\beta$ ARs sur des cardiomyocytes fraîchement isolés. Cependant, les travaux effectués sur des cellules en culture (Suzuki et al. 1992; Neve 1985) ou sur du tissu exprimant le  $\beta_1$ AR (Valet et al. 1989; Zhao et al. 1993), nous suggèrent que les  $\beta_1$ ARs pourraient être soumis à une régulation distincte de celle des  $\beta_2$ ARs.

Les résultats présentés dans cette deuxième partie renchérissent sur cette hypothèse. Nous avons effectivement démontré qu'une stimulation prolongée des cardiomyocytes avec l'isoprotérénol (60min) n'induisait pas de

diminution de la capacité des  $\beta$ ARs cardiaques à stimuler l'activité de l'adénylyl cyclase. Malgré l'absence de GRK2 et de GRK5 dans la préparation membranaire de nos cardiomyocytes, nous avons observé une activité marquée des GRKs à la suite d'une stimulation avec l'isoprotérénol (15 min). Il est possible qu'il existe d'autres sous-types de GRKs, ayant peu d'affinité pour les  $\beta_1$ ARs, qui aient été activés dans notre préparation. Il faut se rappeler que Zhou et al. (1991) ont démontré que les GRKs n'induisaient pas de désensibilisation des  $\beta_1$ ARs et que l'augmentation des GRKs dans le tissu cardiaque de coeurs insuffisants apparaissait bien avant les modifications du signal de transduction  $\beta$ -adrénergique (Ping et al. 1997). Cette absence de GRKs dans les cardiomyocytes alors que nous pouvons les détecter dans les protéines extraites du tissu est en concordance avec le concept que les mesures prises dans le tissu entier ne sont pas nécessairement représentatives des mesures effectuées dans les cardiomyocytes isolés.

Malgré l'absence de désensibilisation des  $\beta$ ARs cardiaques par les mécanismes conventionnels, nous avons quand même observé une désensibilisation hétérologue avec le phorbol ester (PMA) et les cytokines (IL-6). Le PMA, qui active les PKCs, a produit une désensibilisation rapide de 23% des  $\beta$ ARs cardiaques, un effet clair mais relativement modeste. Ces résultats s'ajoutent à la nouvelle tendance suggérant la possibilité que l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire puisse avoir un effet régulateur sur les  $\beta$ ARs cardiaques (Muth et al. 1999; Serikov et al., 2001). En effet, plusieurs

formes de PKC sont activées par le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. De façon hypothétique, ce concept impliquant le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans la régulation des  $\beta$ ARs cardiaques pourrait expliquer l'absence de désensibilisation rapide des  $\beta$ ARs dans les cardiomyocytes pré-traités avec l'isoprotérénol. En effet, l'absence de désensibilisation des cellules pré-traitées coïncide avec l'absence de potentiel d'action et une concentration de calcium dix fois inférieure à la concentration physiologique dans le tampon utilisé.

La présence de compartiments dans les cellules spécialisées, comme les cardiomyocytes, est également une voie intéressante pour expliquer nos résultats. En effet, certains auteurs ont émis l'hypothèse que les  $\beta_1$ ARs pourraient être associés aux cavéoles, alors que les  $\beta_2$ ARs seraient associés aux vésicules enrobées de la protéine clathrine (Muntz et al. 1994). Il est intéressant de noter que les sous-types de PKCs activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire subissent également une translocation dans ces cavéoles (Rybin et al. 1999). Une accumulation d'oxyde nitrique synthase est aussi observée dans ces cavéoles (Hare et al. 2000) corroborant la désensibilisation des  $\beta$ ARs cardiaques observée dans les cardiomyocytes pré-traités avec l'IL-6, un activateur de iNOS.

Le pré-traitement d'une durée de 15 minutes de nos cardiomyocytes isolés avec l'IL-6 induisait effectivement une désensibilisation rapide de la capacité des  $\beta$ ARs d'activer l'adénylyl cyclase. Cet effet semble, à première

vue, être associé à l'augmentation de NO puisqu'il pouvait être bloqué en présence de L-NAME, un inhibiteur de NO synthase. Il a déjà été démontré que les cytokines pouvaient induire une réduction de la production d'AMPc (Chung et al., 1990) et de la réponse contractile produite par la stimulation des  $\beta$ ARs (Balligand et al., 1993). Par contre, cet effet semblait nécessiter une période prolongée de 72 heures (présumément pour la synthèse de iNOS) de 72 heures chez les cardiomyocytes de rats nouveau-nés mis en culture (Chung et al. 1990) et une période d'au moins 24 heures chez les cardiomyocytes de rats adultes pré-traités dans un milieu de culture contenant TNF $\alpha$  et IL-1. Il est donc possible que dans les conditions de nos expériences sur des cardiomyocytes fraîchement isolés, il y ait eu un niveau basal d'expression de iNOS, ce qui expliquerait la réponse rapide que nous avons observée. Des études récentes (Adam et al. 1999) ont démontré que l'action de la NO sur la dépalmitoylation des  $\beta_2$ ARs pourrait être la cause primaire de la baisse de signalisation des  $\beta_2$ ARs induite par l'augmentation de NO. Cependant, les processus impliqués dans ce mécanisme de désensibilisation demeurent encore peu approfondis. Toutefois, il est intéressant de soulever le fait que les  $\beta_1$ ARs possèdent 2 sites de palmitoylation dans leur séquence d'acides aminés, suggérant un mécanisme d'action de la NO sur les  $\beta_1$ ARs cardiaques semblable à celui observé par Adam et al. (1999).

## CONCLUSION

À la suite de ces expériences, nous concluons dans un premier temps que, dans l'insuffisance cardiaque induite par tachycardie ventriculaire chez le chien, la réduction des réponses à la stimulation des  $\beta$ ARs dans les cardiomyocytes isolés peut être attribuée aux modifications du couplage excitation-contraction et de la machinerie contractile, plutôt qu'à un plafonnement de la production d'AMP cyclique. Deuxièmement, nous pensons que les modifications liées à la transduction  $\beta$ -adrénergique observées dans la préparation de tissu homogénéisé dérivé des coeurs insuffisants ne représente pas nécessairement celles des cardiomyocytes. Une redistribution du nombre de cellules interstitielles par rapport au nombre de cardiomyocytes lors du développement de l'insuffisance pourrait être à l'origine de cette différence entre les résultats obtenus à partir du tissu et ceux obtenus à partir des cardiomyocytes homogénéisés. Cette distinction s'est maintenue lorsque nous avons décelé la présence des GRKs dans le tissu alors qu'elles n'étaient pas détectables dans les cardiomyocytes isolés. Cette observation corrobore cependant l'absence de désensibilisation des  $\beta$ ARs cardiaques exprimés à la surface des cardiomyocytes isolés. Nous croyons donc que des mécanismes autres que ceux prévus par le concept de désensibilisation démontré pour les  $\beta_2$ ARs, seraient impliqués dans la désensibilisation des  $\beta$ ARs cardiaques. Entre autres, nous envisageons que l'activation des PKCs joue un rôle dans la désensibilisation rétrograde du récepteur. Une telle voie rétrograde pourrait signifier qu'à la suite d'une augmentation des courants calciques par l'activation des récepteurs

adrénergiques, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  activeraient la translocation des PKCs à la membrane qui en retour désensibiliseraient les  $\beta$ ARs. Finalement, nous croyons que l'IL-6 est capable d'induire une désensibilisation des  $\beta$ ARs cardiaques par une voie d'activation de la NO. À la lumière de nos résultats, nous soulignons l'importance de la contribution de l'environnement physiologique des cardiomyocytes à la désensibilisation rapide des  $\beta$ ARs cardiaques observée in situ.

## RÉFÉRENCES

- Adam L., Bouvier M., Jones T.L.,** (1999). Nitric oxide modulates  $\beta_2$ -adrenergic receptor palmitoylation and signaling. *J Biol Chem* 274:26337-43.
- Altschuld R.A., Starling R.C., Hamlin R.L., Billman G.E., Hensley J., Castillo L., Fertel R.H., Hohl C.M., Robitaille P-M. L., Jones L.R., Xiao R-P., Lakatta E.G.,**(1995). Response of failing canine and human heart cell to  $\beta_2$ -adrenergic stimulation. *Circulation* 92: 1612-8.
- Anderson R.G.,** (1993). Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10909-13.
- Anderson R.G.,** (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225.
- Anderson K.M., Eckart A.D., Willette R.N., Koch W.J.,** (1999). The myocardial  $\beta$ -adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension* 33[part II]:402-7.
- Anzai, T., Lai N.C., Gao M.,Hammond H. K.** (1998). Dissociation between regional dysfunction and  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in heart failure. *Am J Physiol* 275:H1267-H1273.
- Asaoka Y., Nakamura S., Yoshida K., Nishizuka Y.,** (1992). Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem Sci* 17:414-7.
- Attramadal H. Arriza J.L. Aoki C. Dawson T.M. Codina J. Kwatra M.M. Snyder S.H. Caron M.G. Lefkowitz R.J.,** (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 267:17882-90.
- Balligand J.L., Ungureanu D., Kelly R.A., Kobzik L., Pimental D., Michel T., Smith T.W.** (1993). Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest* 91:2314-19.
- Benovic J.L., Mayor Jr F., Staniszewski C., Lefkowitz R.J., Caron M.G.,** (1987). Purification and characterization of the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 262:9026-32.
- Bogoyevitch M.A., Andersson M.B., Gillespie-Brown J., Clerk A., Glennon P.E., Fuller S., Sugden P.H.,** (1996). Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochem. J.* 314:115-21.
- Böhm M., Reiger B., Schwinger R.H.G., Erdmann E.,** (1994). cAMP concentrations, cAMP dependent protein kinase activity, and phospholamban in non-failing and failing myocardium. *Cardiovascular Research* 28:1713-9.
- Bouvier M., Leeb-Lundberg L.M.F., Benovic J.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J.** (1987). Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation: Effects of agonist occupancy on phosphorylation of  $\alpha_1$  -and  $\beta_2$  -adrenergic

receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* , **262**: 3106-3113.

**Bouvier M., Huadorff W.P., De Blasi A., O'Dowd B.F., Kobilka B.K., Caron M., Lefkowitz R.J.**, (1988). Removal of phosphorylation sites from the  $\beta_2$ -adrenergic receptor delays onset of agonist promoted desensitization. *Nature (Lond)* 333:370-3.

**Bouvier M., Collins S., O'Dowd B.F., Campbell P.T., De Blasi A., Kobilka B.K., McGregor C., Irons G.P., Caron M., Lefkowitz R.J.**, (1989). Two distinct pathways of cAMP mediated down-regulation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor: phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J Biol Chem* 264:16786-92.

**Bouvier M., Guilbault N., Bonin H.** (1991). Phorbol-ester-induced phosphorylation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor decreases its coupling to Gs. *FEBS Lett* **279**: 243-248.

**Bristow M.R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R.S., Sageman, W.S., et al.**, (1982). Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307:205-11.

**Bristow M.R., Ginsburg R, Umans V., Fowler M., Minobe W., Rasmussen R., Zera P., Menlove R., Shah P., Jamieson S., Stinson E.B.** (1986).  $\beta_1$ - 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* 59:297-309.

**Bristow M.R., Anderson F.L., Port J.D., Skerl L., Hershberger R.E., Larrabee P., O'Connell J.B., Renlund D.G., Volkman K., Murray J., Feldman A.M.**, (1991). Differences in  $\beta$ -adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 84:1024-39.

**Brodde O-E.**, (1991).  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacological reviews* 43:203-42.

**Brodde O-E.**, (1996).  $\beta$ -Adrenergic receptors in failing human myocardium. *Basic Res Cardiol* 91:35-40.

**Bueno O.F., De Windt L.J., Tymitz K.M., Witt S.A., Kimball T.R., Klevitsky R., et al.**, (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO* 19:6341-50.

**Buja L.M., Muntz K.H., Rosenbaum T., Haghani Z., Buja D.K., Sen A., Chien K. R., Willerson J.T.**, (1985). Characterization of a potentially reversible increase in  $\beta$ -adrenergic receptors in isolated, neonatal rat cardiac myocytes with impaired energy metabolism. *Circ Res* 57: 640-5.



**Burysek L., Houstek J.,** (1997).  $\beta$ -adrenergic stimulation of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Letters* 411: 83-6.

**Bylund D.B., Clarke D.E., Eikenburg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Mollinaff P.B., Ruffolo R.R., Strosberg A.D., Trendelenburg U.G.,** (1998). Adrenoceptors, in *The IUPHAR Compendium of receptor characterization and classification* (Girdlestone D ed) pp. 58-74, IUPHAR Media, London.

**Calderone A., Thaik C.M., Takahashi N., Chang D.L.F., Colucci W.S.,** (1998). Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J.Clin Invest.* 101:812-18.

**Calderone A., Bouvier M., Li K., Juneau C., de Champlain J., Rouleau J-L.** (1991). Dysfunction of the  $\beta$ - and  $\alpha$ -adrenergic systems in a model of congestive heart failure. The pacing-overdrive dog. *Circ. Res.* 69: 332-43.

**Calderone A., Abdelaziz N., Colombo F., Schreider K.L., Rindt H.,** (2000). A farnesyltransferase inhibitor attenuates cardiac myocyte hypertrophy and gene expression. *J Mol Cell Cardiol.* 32:1127-40.

**Canale E.D., Campbell G.R., Smolich J.J., Campbell J.H.,** (1986). *Cardiac Muscle*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 1.

**Cardinal R., Nadeau R., Laurent C., Boudreau G., Armour J.A.,** (1996). Reduced capacity of cardiac efferent sympathetic neurons to release noradrenaline and modify cardiac function in tachycardia-induced canine heart failure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 1070-8.

**Choukroun G., Hajjar R., Kyriakis J.M., Bonventre J.V., Rosenzweig A., Force T.,** (1998). Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J.Clin.Invest.* 102:1311-20.

**Chuang T.T., Levine H., De Blasi A.,** (1995). Phosphorylation and activation of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270: 18660-5.

**Chung M.K., Gulick T.S., Rotondo R.E., Schreiner G.F., Lange L.G.,** (1990). Mechanism of cytokine inhibition of  $\beta$ -adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes; Impairment of signal transduction. *Cir Res* 67:753-63.

**Clerk A., Michael A., Sugden P.H.,** (1998). Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonist, endothelin-1 and phenylephrine: A role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol* 142:523-35

**Cohen M.V., Downey J.M.,** (1996). Myocardial preconditioning promises to be a novel approach to the treatment of ischemic heart disease. *Annu Rev Med* 47:21-9.

**Coleman H.N., Taylor R.R., Pool P.E., Whipple G.H., Covell J.W., Ross J., Braunwald E.,** (1971). Congestive heart failure following chronic tachycardia. *Am Heart J* 81:790-8.

**Communal C., Singh K. Pimentel D.R., Colucci W.S.,** (1998). Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the  $\beta$ -adrenergic pathway. *Circulation* 98:1329-34.

**Communal C., Colucci W.S., Singh K.,** (2000). P38 Mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against  $\beta$ -adrenergic receptors-stimulated apoptosis: Evidence for Gi-dependent activation. *J.Biol.Chem.* 275: 19395-19400.

**Cong M., Perry S.J., Lin F-T., Fraser I.D., Hu L.A., Chen W., Pitcher J.A., Scott J.D., Lefkowitz R.J.,** (2001). Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J. Biol. Chem.* 276:15192-9.

**Cory C.R., McCutcheon L.J., O'Grady M., Pang A.W., Geiger J.D., O'Brien P.,** (1993). Compensatory downregulation of myocardial  $Ca^{2+}$  channel in SR from dogs with heart failure. *Am J Physiol* 264:H926-H937.

**Daaka Y., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J.,** (1997). Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390: 88-91.

**Daaka Y., Luttrell L.M., Ahn S., Della Rocca G.J., Ferguson S.S.G., Caron M.G., Lefkowitz R.J.,** (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 273: 685-8.

**DeBburman S.K., Plassienki J., Benovic J.L., Hosey M.M.,** (1996). G protein-coupled receptor kinase GRK2 is phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *J Biol Chem* 271: 22552-62.

**Delehanty J.M., Himura Y., Elam H., Hood jr. W.B., Liang C-S.,** (1994).  $\beta$ -adrenoceptor downregulation in pacing-induced heart failure is associated with increased interstitial NE content. *Am. J. Physiol.* 266: H930-H935.

**Disatnik M-H., Buraggi G., Mochly-Rosen D.,** (1994). Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp. Cell Res.* 210:287-97.

**Downing S.E, Lee J.C.,** (1983). Contribution of  $\alpha$ -adrenoceptor activation to the pathogenesis of norepinephrine cardiomyopathy. *Circ Res.* 52: 471-8.

**Emorine L.J. Marullo S. Briend-Sutren M.M. Patey G. Tate K. Delavier-Klutchko C. Strosberg A.D.,** (1989). Molecular characterization of the human  $\beta_3$ -adrenergic receptor. *Science.* 245:1118-21.

**Engelhardt S., Böhm M., Erdmann E., Lohse M.J.,** (1996). Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: Progressive reduction

of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 27:146-54.

**Eschenhagen T., Mende U., Nose M., Schmitz W., Scholz H., Haverich A., Hirt S., Doring V., Kalmar P., Hoppner W., Seitz H.J.,** (1992). Increased messenger RNA levels of the inhibitory G-protein  $\alpha$ -subunit  $G_{i\alpha-2}$  in human end-stage heart failure. *Circ Res* 70:688-96.

**Espinasse I. Iourgenko V. Defer N. Samson F. Hanoune J. Mercadier J.J.,** (1995). Type V, but not type VI, adenylyl cyclase mRNA accumulates in the rat heart during ontogenic development. Correlation with increased global adenylyl cyclase activity. *J Mol Cell Cardiol* 27:1789-95.

**Fan G-F., Shumay E., Malbon C.C., wang H-Y.,** (2001). C-Src tyrosine kinase binds the  $\beta$ 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase2, and mediates agoniste-induced receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 276:13240-47.

**Feldman M.D., Copelas L., Gwathmey J.K., Phillips P., Warren S.E., Schoen F.J., Grossman W., Morgan J.P.,** (1987). Defficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 75:331-9.

**Feldman A.M., Cates A.E. Veazey W.B., Hershberger R.E., Bristow M.R., Baughman K.L., Baumgartner W.A., Van Dop C.,** (1988). Increase in the 40,000-mol wt. Pertussis toxin substrate (G-protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 82:189-97.

**Finkel M.S. Oddis C.V. Jacob T.D. Watkins S.C. Hattler B.G. Simmons R.L.,** (1992). Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 257:387-9.

**Fishman P.H. Nussbaum E. Duman R.S.,** (1991). Characterization and regulation of beta 1-adrenergic receptors in a human neuroepithelioma cell line. *J Neur* 56:596-602.

**Freedman N.J., Ligett S.B., Drachman D.E., Pei G., Caron M.G., Lefkowitz R.J.,** (1995). Phosphorylation and desensitization of the human  $\beta$ 1-adrenergic receptor; Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 270:17953-61.

**Frielle T. Collins S. Daniel K.W. Caron M.G. Lefkowitz R.J. Kobilka B.K.,** (1987). Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:7920-4.

**Gao M., Ping P., Post S., Insael P.A., Tang R., Hommond H.K.,** (1998). Increased expression of adenylyl cyclase type VI proportionately increases  $\beta$ -adrenergic receptor-stimulated production of cAMP in neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1038-43.

**Garcia-Higuera I., Penela P., Murga C., Egea G., Bonay P., Benovic J.L., Mayor jr. F.,** (1994). Association of the regulatory  $\beta$ -adrenergic receptor kinase with rat liver microsomal membranes. *J Biol Chem* 269:1348-55.

**Gerdes A.M., Capasso J.M.,** (1995). Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27:849-56.

**Glennon P.E., Kaddoura S., Sale E.M., Sale G.J., Fuller S.J., Sugden P.H.,** (1996). Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ res.* 78:954-61.

**Green S.A., Liggett S.B.,** (1994). A proline-rich region of the third intracellular loop imports phenotypic  $\beta_1$ - versus  $\beta_2$ -adrenergic receptors coupling and sequestration. *J Biol Chem* 269:26215-9.

**Hall S.A. Cigarroa C.G. Marcoux L. Risser R.C. Grayburn P.A. Eichhorn E.J.,** (1995). Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with  $\beta$ -adrenergic blockade. *J Am Col Cardiol* 25:1154-61.

**Hare J.M., Lofthouse R.A., Juang G.J., Colman L., Ricker K.M., Kim B., Senzaki H., Cao S., Tunin R.S., Kass D.A.,** (2000). Contribution of caveolin protein abundance to augmented nitric oxide signaling in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 86:1085-92.

**Hawthorn M.H., Broadley K.J.,** (1982). Evidence from use of neuronal uptake inhibition that beta 1-adrenoceptors, but not beta 2-adrenoceptors, are innervated. *J Pharm Pharmacol* 34:664-6.

**Himura Y., Felten S.Y., Kashiki M., Lewandowski T.J., Delehanty J.M., Liang C-S.,** (1993). Cardiac noradrenergic nerve terminal abnormalities in dogs with experimental congestive heart failure. *Circulation* 88: 1299-1309.

**Hopie L.H.,** (1998). The heart; physiology, from cell to circulation. Lippincott-Raven 3 edition Philadelphia, Pa, chapter 13.

**Iaccarino G., Dolber P.C., Lefkowitz R.J., Koch W.J.,** (1999).  $\beta$ -Adrenergic receptor kinase-1 levels in catecholamine-induced myocardial hypertrophy: Regulation by  $\beta$ - but not  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation. *Hypertension*, 33 [part II]: 396-401.

**Ignarro L.J., Kadoitz p.J.,** (1985). The pharmacological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 25:171-191.

**Ing D.J., Zang J., Dzau V.J., Webster K.A., Bishopric N.H.,** (1999). Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ Res.* 84:21-33.

**Inoguchi T., Battan R., Handler E., Sportsman J.R., Heath W., King G.L.,** (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform  $\beta_2$  and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: Differential reversibility of glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11059-62.

**Ihl-Vahl R., Eschenhagen T., Küber W., Marquetant R., Nose M., Schmitz W., Scholz H., Strasser R.H.** (1996). Differential regulation of mRNA specific for  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors in human failing hearts. Evaluation of the absolute cardiac mRNA levels by two independent methods. *J Mol Cell Cardiol* 28:1-10

**Ishikawa Y., Sorota S., Kiuchi K., Shannon R.P., Komamura K., Katsushika S., Vatner D.E., Vatner S.F. and Homcy C.J.**, (1994). Downregulation of adenylylcyclase type V and VI mRNA levels in pacing-induced heart failure in dogs. *J Clin Invest* 93:2224-9.

**Juneau C., Calderone A., Rouleau J-L.**, (1992). Myocardial  $\beta$ -adrenergic and mechanical properties in pacing-induced heart failure in dogs. *Am J Physiol* 262:H1458-H1467.

**Kääb S., Nuss H.B., Chiamvimonvat N., O'Rourke B., Pak P.H., Kass D.A., Marbán E., Tomaselli G.F.** (1996). Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 78:262-73.

**Kagaya Y., Kanno Y., Takeyama D., Ishide N., Maruyama Y., Takahashi T., Ido T., Takishima T.**, (1990). Effects of long-term pressure overload on regional myocardial glucose and free fatty acid uptake in rats; A quantitative autoradiographic study. *Circulation* 81:1353-61.

**Kameyama K., Haga K., Haga T., Kontani K., Katada T., Fukada Y.**, (1993). Activation by G protein  $\beta\gamma$  subunits of  $\beta$ -adrenergic and muscarinic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 268: 7753-8.

**Katz A.M.**, (1999) Heart failure: Pathophysiology, molecular and clinical management. Lippincott Williams & Wilkins.

**Kaumann A.J., Molenaar P.**, (1997). Modulation of human cardiac function through 4  $\beta$ -adrenoceptor populations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355:667-81.

**Keaney J.F., Hare J.M., Balligand J-L., Loscalzo J., Smith T.W., Colucci W.S.**, (1991). Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Am J Physiol* 271:H2646-H2652.

**Kiuchi K., Shannon R.P., Komamura K, Cohen D.J., Bianchi C., Homcy C.J., Vatner S.F., Vatner D.E.**, (1993). Myocardial  $\beta$ -adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure. *J Clin Invest* 91:907-14.

**Kobilka B.K., Kobilka T.S., Daniel K., Regan J.W., Regan J.W., Caron M.G., Lefkowitz R.J.**, (1988). Chimeric  $\alpha$ 2,  $\beta$ 2-adrenergic receptors: Delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science (Wash DC)* 240:1310-16.

**Kobilka B. K.**, (1992). Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 15:87-114.

**Koch W.J., Inglese J., Stone W.C., Lefkowitz R.J.,** (1993). The binding site for  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins on the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 268:8256-60.

**Krupinski J., Coussen F., Bakalyar H.A., Tang W.J., Feinstein P.G., Orth K., Slaughter C., Reed R.R., Gilman A.G.,** (1989). Adenylyl cyclase amino acid sequence: Possible channel- or transporter-like structure. *Science (Wash DC)* 244:1558-64.

**Kunapuli P., Gurevich V.V., Benovic J.L.,** (1994). Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J. Biol. Chem.* 269:10209-12.

**Laflamme M.A., Becker P.L.,** (1999). Gs and adenylyl cyclase in transverse tubules of heart: implications for cAMP-dependent signaling. *Am J Physiol* 277:H1841-H1848.

**Lau Y.H., Robinson R.B., Rosen M.R., Bilezikian J.P.,** (1980). Subclassification of  $\beta$ -adrenergic receptors in cultured rat cardiac myoblasts and fibroblasts. *Circ Res.* 47:41-48.

**Levine B., Kalman J., Mayer L., Fillit H.M., Packer M.,** (1990). Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 223:236-41.

**Liu, Y., Cigola E., Cheng W., Kajstura J., Olivetti G., Hintze T.H., Anversa P.,** (1995). Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest* 73:771-87.

**Lohse M.J., Benovic J.L., Codina J., Caron M.G., Lefkowitz R.J.,** (1990).  $\beta$ -Arrestin: A protein that regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function. *Science (Wash DC)* 248:1547-50.

**Lohse M.J.,** (1996). Mechanism of  $\beta$ -adrenergic receptor regulation. *Zeitschr Kardiol* 85 (suppl):1-3.

**Lowe B.D., Gill E.A., Rodriguez-Larrain J., Abraham W.T., Bristow M.R., Gilbert E.M.,** (1996). Carvedilol is associated with a reversal of remodeling in chronic heart failure. (Abstr.) *Circulation* 94(suppl 1):I-407.

**MacGowan G.A., Mann D.L., Kormos R.L., Feldman A.M., Murali S.,** (1997). Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am. J. Cardiol.* 79: 1128-31.

**Mochly-Rosen D., Khaner H., Lopez J.,** (1991). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3997-4000.

**Mochly-Rosen D., Smith B.L., Chen C.H., Disatnik M.H., Ron D.,** (1995). Interaction of protein kinase C with RACK1, a receptor for activated C-kinase: role in  $\beta$  protein kinase C mediated signal transduction. *Biochemical society Transduction* 23: 596-600.

**Marzo, K.P., Frey M.T., Wilson J.R., Liang B.T., Manning D.R., Lanoce V., Molinoff P.B.,** (1991).  $\beta$ -adrenergic receptor - G protein - adenylyate cyclase complex in experimental canine congestive heart failure produced by rapid ventricular pacing. *Circ Res* 69:1546-56.

**Maurice J.P., Shah A.S., Kypson A.P., Hata J.A., White D.C., Glower D.D., Koch W.J.,** (1999). Molecular  $\beta$ -adrenergic signaling abnormalities in failing rabbit heart infarction. *Am J Physiol* 276:H1853-H1860.

**Mayor jr F., Penela P., Ruiz-Gòmez A.,** (1998). Role of G protein-coupled receptor kinase2 and arrestins in  $\beta$ -adrenergic receptor internalization. *Trends Cardiovasc med* 8:234-240.

**Mende U., Eschenhagen T., Geertz B., Schmitz W., Scholz H., Schulte am Esch J., Sempell R., Steinfath M.,** (1992). Isoprenaline-induced increase in the 40/41 kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 345:44-50.

**Mitchell M.B., Meng X., Ao L.H., Brown J.H., Harken A.H., Banerjee A.,** (1995). Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 76:73-81.

**Mochly-Rosen D., Henrich C.J., Cheever L., Khaner H., Simpson P.C.,** (1990). A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regulat* 1:693-706.

**Moe G.W., Grima E.A., Howard R.J., Seth R., Armstrong P.W.,** (1994). Left ventricular remodeling and disparate changes in contractility and relaxation during the development of and recovery from experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 28:66-71.

**Molenaar P., Sarsero D., Kaumann A.J.,** (1997). Proposal for the interaction of non-conventional partial agonist and catecholamines with the "putative  $\beta_4$ -adrenoceptor" in mammalian heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24:647-56.

**Molkentin J.D., Lu J.R., Antos C.L., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S.R., Olson E.N.,** (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-28.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A., (1991). Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142.

**Mukherjee, R., Bush L.R., McCoy K.E., Duke R.J., Hagler H., Buja L.M., Willerson J.T.,** (1982). Relationship between  $\beta$ -adrenergic receptor numbers and physiological responses during experimental canine myocardial ischemia. *Circ Res* 50:735-41.

**Mukherjee R., Hewett K.W., Walker J.D., Basler C.G., Spinale F.G.,** (1998). Changes in L-type calcium channel abundance and function during the transition to pacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 37:432-44.

**Muntz K.H., Zhao M., Miller J.C.,** (1994). Downregulation of myocardial  $\beta$ -adrenergic receptors; Receptor subtype selectivity. *Cir Res* 74:369-75.

**Murga C., Esteban N., Ruiz-Gomez A., Mayor jr F.,** (1997). The basal subcellular distribution of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase is independent of G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *FEBS lett.* 409:24-8.

**Murphree S.S., Saffitz J.E.,** (1989). Distribution of beta-adrenergic receptors in failing human myocardium. Implications for mechanisms of down-regulation. *Circulation* 79:1214-25.

**Muth J.N., Yamaguchi H., Mikala G., Grupp I.L., Cheng H., Song L-S., Lakatta E.G., Varadi G., Schwartz A.,** (1999) Cardiac-specific overexpression of the  $\alpha 1$  subunit of the L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel in transgenic mice; Loss of isoproterenol-induced contraction. *J Biol Chem* 274:21503-6.

**Nantel F., Bouvier M.,** (1993). Receptor regulation. In: *Neurotransmitter Receptors*, edited by HUCHO, F. Elsevier Science Publishers B.V. p. 99-109.

**Neve K.A., Barette D.A., Molinoff P.B.,** (1985). Selective regulation of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors by atypical agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 235:657-64.

**Newton A.C.,** (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:161-67.

**Nishisuka Y.,** (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature (lond)* 334:661-5.

**Nishisuka Y.,** (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258; 607-14.

**O'Dowd B.F., Hnatowich M., Regan J.W., Leader W.M., Caron M.G., Lefkowitz R.J.,** (1988). Site directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human  $\beta 2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 263:15985-92.

**O'Brien P.J., Ianuzzo C.D., Moe G.W., Stopps T.P., Armstrong P.W.,** (1990). Rapid ventricular pacing of dogs to heart failure: biochemical and physiological studies. *Can J Physiol Pharmacol* 68:34-39.

**Okamoto T., Schlegel A., Scherer P.E., Lisanti M.P.,** (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:5419-22.

**O'Rourke, B., Kass D.A., Tomaselli G.F., Kääb S., Tunin R., Marbán E.,** (1999). Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure. I. Experimental studies. *Circ Res* 84:562-70.

**Parker J.D., Landzberg J.S., Bittl J.A., Mirsky I., Colucci W.S.,** (1991) Effects of  $\beta$ -adrenergic stimulation with dobutamine on isovolumic relaxation in the normal and failing human left ventricle. *Circulation* 84:1040-8.



**Pfitzer G., Rüegg J.C., Flockerzi V., Hofmann F.,** (1982). cGMP-dependent protein kinase decreases calcium sensitivity of skinned cardiac fibers. *FEBS lett.* 149:171-175.

**Ping P., Hammond H.K.,** (1994). Diverse G-protein and  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA expression in normal and failing porcine hearts. *Am J Physiol.* 267:H2079-85.

**Ping P., Anzai T., Gao M., Hammond H.K.,** (1997). Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure. *Am. J. Physiol.* 273:H707-H717.

**Pitcher J.A., Tesmer J.J., Freeman J.L., Capel W.D., Stone W.C., Lefkowitz R.J.,** (1999). Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J. Bio. Chem.* 274:34531-4.

**Popescu L, Diculescu I., Zelck U., Ionescu N.,** (1974). Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study. *Cell tissue Res.* 154:357-358.

**Post S.R., Hilal-Dandan R., Urasawa K., Brunton L.L., Insel P.A.,** (1995). Quantification of signalling components and amplification in the  $\beta$ -adrenergic-receptor-adenylylate cyclase pathway in isolated adult rat ventricular myocytes. *Biochem J* 311:75-80.

**Premont R.T., Inglese J., Lefkowitz R.J.,** (1995). Protein kinase that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB j* 9:175-82.

**Pronin A.N., Satpaev D.K., Slepak V.Z., Benovic J.L.,** (1997). Regulation of G protein-coupled receptor kinase by calmodulin binding domain.. *J. Biol. Chem.* 272: 18273-80.

**Pronin A.N., Benovic J.L.,** (1997). Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272: 3806-12.

**Rakusan K., Flanagan M.F., Geva T., Southern J., Van Praagh R.,** (1992). Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 86:38-46.

**Ramirez M.T., Sah V.P., Zhao X-L., Hunter J.J., Chien K.R., Brown J.H.,** (1997). The MEKK-JNK pathway is stimulated by  $\alpha$ 1-adrenergic receptor and Ras activation and is associated with in vitro and vivo cardiac hypertrophy. *J.Bio. Chem.* 272:14057-61.

**Raven U., Davia K., Davies C.H., O'Gara P., Drake-Holland A.J., Hynd J.W., Noble M.I.M., Harding S.E.,** (1996). Tachycardia-induced failure alters contractile properties of canine ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 32:613-21.

**Roth D.A., Urasawa K., Helmer G.A., Hammond H.K.,** (1993). Downregulation of cardiac guanosine 5'-triphosphate-binding proteins in right

atrium and left ventricle in pacing-induced congestive heart failure. *J. Clin Invest* 91:939-49.

**Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y-S., Glenney J.R., Anderson R.G.W.,** (1992). Caveolin a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68:673-82.

**Rousseau G., Nantel F., Bouvier M.,** (1996). Distinct receptor domains determine subtype-specific coupling and desensitization phenotypes for human  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 49:752-60.

**Rybin V.O., Xu X., Steinberg S.F.,** (1999). Activated protein kinase C isoforms target to cardiomyocyte caveolae; Stimulation of local protein phosphorylation. *Circ Res* 84:980-8.

**Sadoshima J., Zebrowski D.C.,** (1998). Stimulation of the  $\beta$ -adrenergic receptor activates transcription of ANF through  $Ca^{2+}$  -dependent mechanisms. *Circulation* 98:(suppl 1): I-64. Abstract.

**Schwartz D.D., Naff B.P.,** (1997). Activation of protein kinase C by angiotensin II decrease  $\beta_1$ adrenergic receptor responsiveness in the heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 29: 257-64.

**Schwencke C., Okumura S., Yamamoto M., geng Y-J., Ishikawa Y.,** (1999). Colocalization of  $\beta$ -adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane. *J Cell Biochem* 75:64-72.

**Schröder F., Handrock R., Beuckelmann D.J., Hirt S., Hullin R., Priebe L., Schwinger R.H.G., Weil J., Herzig S.,** (1998). Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 98:969-76.

**Serikov V.B., Petrashevskaya N.N., Canning A.M., Schwartz A.,** (2001). Reduction of  $[Ca^{2+}]_i$  restores uncoupled  $\beta$ -adrenergic signaling in isolated perfused transgenic mouse hearts. *Circ Res.* 88:9-11.

**Sheng Z., Knowlton K., Chen J., Hoshijima M., brown J.H., Chien K.R.,** (1997). Cardiotropin I (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 272:5783-91.

**Spinale, F.G., Fulbright B.M., Mukherjee R., Tanaka R., Hu J., Crawford F. A., Zile M.R.,** (1992). Relation between ventricular and myocyte function with tachycardia-induced cardiomyopathy. *Circ Res* 71:174-87.

**Staudinger J., Zhou J., Burgess R., Elledge S.J., Olson EN.,** (1995). PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J. Cell Biol.* 128:263-71.

**Strasser R.H., Krimmer J., Marquetant R.,** (1988). Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors: Impaired desensitization in myocardial ischemia. *J Cardiocasc Pharmacol* 12 (suppl. 1) S15-S24.

**Strosberg A.D.**, (1995). Structural and functional diversity of  $\beta$ -adrenergic receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 757:253-60.

**Suzuki T., Nguyen C.T., Nantel F., Bonin H., Valiquette M., Frielle T. Bouvier M.**, (1992). Distinct regulation of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors in chinese hamster fibroblasts. *Mol Pharm* 41:542-48.

**Tanigawa T., Yano M., Kohno M., Yamamoto T., Hisaoka T., Ono K., Ueyama T., Kobayashi S., Hisamatsu Y., Ohkusa T., Matsuzaki M.**, (2000). Mechanism of preserved positive lusitropy by cAMP-dependent drug in heart failure. *Am J Physiol* 278:H313-H320.

**Thoburn J., Thoburn A.**, (1994). The tyrosine kinase inhibitor, genistein, prevents  $\alpha$ -adrenergic-induced cardiac muscle cell hypertrophy by inhibiting activation of the Ras-MAP kinase signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 202:1586-91.

**Tobise K., Ishikawa Y., Holmer S.R., Im M-J., Newwell J.B., Yoshie H., Fujita M., Susannie E.E., Homcy C.J.**, (1994). Changes in type VI adenylyl cyclase isoform expression correlate with a decreased capacity for cAMP generation in the aging ventricle. *Circ Res* 74:596-603.

**Torre-Amione G., Kapadia S., Benedict C., Oral H., Young J.B., Mann D.**, (1996). Proinflammatory cytokines levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). *J. Am. Coll. Cardiol.* 27:1201-6.

**Ungere M., Bohm M., Elce J.S., Erdmann E., Lohse M.L.**, (1993). Altered expression of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and  $\beta_1$ -adrenergic receptors in the failing heart. *Circulation* 87:454-63.

**Ungere M., Kessebohm K., Kronsbein K., Lohse M.J., Richardt G.**, (1996). Activation of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circ Res* 79:455-460.

**Ungureanu-Longrois D., Balligand J-L., Simmons W.W., Okada I., Kobzik L., Lowenstein C.J., Kunkel S.L., Michel T., Kelly R.A., Smith T.W.**, (1995) Induction of nitric oxide synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but not sufficient to decrease contractile responsiveness to  $\beta$ -adrenergic agonists. *Circ Res* 77:494-502.

**Valet P., Montastruc J.L., Berlan M., Tran M.A., Lafontan M., Montastruc P.**, (1989). Differential regulation of fat cell beta-2 and beta-1 adrenoceptors by endogenous catecholamines in dog. *J Pharmacol Exp Ther* 249:271-77.

**Vatner D.E., Sato N., Kiuchi K., Shannon R.P., Vatner S.F.**, (1994). Decrease in myocardial ryanodine receptors and altered excitation-contraction coupling early in the development of heart failure. *Circulation* 90:1423-30.

**Wahler G.M., Dollinger S.J.**, (1995). Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 268:C45-C54.

**Vila-Petroff M.G., Younes A., Egan J., Lakatta E.G., Sollott S.J., (1999).** Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 84:1020-31.

**Wang Y., Ashraf M., (1999).** Role of protein kinase C in mitochondrial  $K_{ATP}$  channel-mediated protection against  $Ca^{2+}$  overload injury in rat myocardium. *Circ Res* 84:1156-65.

**Weber K.T., Pick R., Silver M.A., Moe G.W., Janicki J.S., Zucker I.H., Armstrong P.W. (1990).** Bibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 82:1387-1401.

**Wolff A.A., Hines D.K., Karliner J.S., (1994).** Preserved  $\beta$ -adrenoceptor-mediated adenylyl cyclase activity despite receptor and postreceptor dysfunction in acute myocardial ischemia. *Am Heart J* 128:542-50.

**Xiao R-P., Lakatta E.G., (1993).**  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation and  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic  $Ca^{2+}$ , and  $Ca^{2+}$  current in single rat ventricular cells. *Circ Res* 73:286-300.

**Xiao R-P., Avdonin P., Zhou Y-Y., Cheng H., Akhter S.A., Eschenhagen T., Lefkowitz R.J., Koch W.J., Lakatta E.G., (1999).** Coupling of  $\beta_2$ -adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Cir Res.* 84: 43-52.

**Yamazaki T., Komuro I., Zou Y., Kudoh S., Shiojima I., Hiroi Y., Mizuno T., Aikawa R., Takano H., Yazaki Y., (1997).** Norepinephrine induces the raf-1 kinase /mitogen-activated protein kinase through both  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptors. *Circulation* 95:1260-8.

**Yano M., Kim S., Izumi Y., Yamanaka S., Iwao H., (1998).** Differential activation of cardiac c-Jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ res* 83:752-60.

**Zechner D., Craig R., Hanford D.S., Mc Donough P.M., Sabbadini R.A., Glembotski C.C., (1997).** MKK6 activates myocardial cell NF- $\kappa$ B and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J.Bio.Chem.* 273:8232-39.

**Zhao M., Muntz K.H., (1993).** Differential downregulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in tissue compartments of rat heart is not altered by sympathetic denervation. *Circ Res* 73:943-51.

**Zhou X-M., Fishman P.H., (1991).** Desensitization of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor; Involvement of the cyclic AMP-dependent but not a receptor-specific protein kinase. *J Biol Chem* 266:7462-68.

**Zou Y., Komuro I., Yamazaki T., Kudoh S., Uozumi H., Kadowaki T., Yazaki Y., (1999).** Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 274:9760-70.