

Université de Montréal

Noradrénaline et muscle squelettique : Modulation de la libération et effets
potentiels

par

Julie L. Lavoie

Département de Kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences de l'activité physique

Août, 2000

© Julie L. Lavoie, 2000



GV

201

U54

2001

v. 002



Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Noradrénaline et Muscle squelettique : Modulation de la libération et effets
potentiels

présentée par :

Julie L. Lavoie

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Phillip Gardiner	président-rapporteur
Louise Béliveau	directeur de recherche
Guy Rousseau	membre du jury
Roberto Levi	examineur externe

Thèse acceptée le : _____

Sommaire

L'activation des terminaisons sympathiques provoque la libération de noradrénaline (NA). Cette NA peut, entre autres, entrer en circulation (spillover) ou se lier à des récepteurs adrénergiques pour exercer ses effets. Le but de ce travail était d'étudier les mécanismes modulant le spillover de NA dans la région vasculaire des muscles squelettiques ainsi que certains des effets potentiels de cette NA. Lors de l'exercice, il est connu qu'il y a une augmentation des concentrations plasmatiques de NA. Cette augmentation semble principalement due à une augmentation du spillover de NA, provenant plus particulièrement de la région vasculaire des muscles squelettiques. Cette dernière peut être causée par plusieurs facteurs, dont l'activité des fibres sympathiques, mais aussi le débit sanguin et des facteurs locaux tels la concentration de bradykinine et le pH, qui peuvent affecter la libération ou la captation de NA par les terminaisons sympathiques. Nous avons voulu vérifier la contribution du débit sanguin et de la bradykinine sur le spillover et le pourcentage d'extraction de NA pendant la contraction dans un modèle *in situ* de muscle gracilis chez le Chien anesthésié. Dans notre première étude, nous avons observé une augmentation significative du pourcentage d'extraction de la NA causée par la contraction musculaire. De plus, une augmentation de trois et quatre fois la valeur du débit sanguin au repos n'a eu aucun effet sur le pourcentage d'extraction de la NA. Ainsi, le débit sanguin ne serait pas un contributeur important, contrairement à ce qui avait été suggéré dans le passé, à la baisse du pourcentage d'extraction

observée lors de l'exercice. Toutefois, nous avons observé une augmentation du spillover de NA suite à l'augmentation du débit sanguin au repos et pendant la stimulation. L'augmentation du débit sanguin lors de l'exercice contribuerait donc à l'augmentation du spillover de NA observée. Dans la deuxième étude, un blocage des récepteurs B_2 à la bradykinine par le HOE 140 a causé une baisse du spillover de NA lors de la contraction musculaire sans aucun effet sur le pourcentage d'extraction. Ainsi, la production de bradykinine lors de la contraction musculaire stimulerait les récepteurs B_2 et contribuerait à l'augmentation du spillover de NA observée dans les régions vasculaires du muscle squelettique lors de l'exercice. Dans la dernière étude nous nous sommes intéressés aux effets possibles de la noradrénaline, plus particulièrement à la régulation négative associée à une stimulation chronique des récepteurs β_2 -adrénergiques dans les muscles squelettiques. Nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur de la farnésyltransférase, le BMS 191563, sur la régulation négative causée par l'administration chronique de clenbuterol, un agoniste β_2 -adrénergique, dans le muscle squelettique chez le Rat. Nos résultats suggèrent une implication de la farnésylation dans les mécanismes sous-jacents à cette régulation négative. Ainsi, les résultats obtenus dans nos différentes études suggèrent que le débit sanguin et la bradykinine contribuent de façon importante à l'augmentation du spillover de NA dans les régions vasculaires du muscle squelettique lors de l'exercice. De plus, il semblerait que la farnésylation de certaines protéines serait impliquée dans la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques.

Table des matières

SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XII
REMERCIEMENTS.....	XV
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
INTRODUCTION.....	1
MODULATEURS DE LA LIBÉRATION DE NORADRÉNALINE	6
<i>Qu'est-ce qui est libéré lors de la stimulation des terminaisons sympathiques ?</i>	<i>7</i>
<i>Récepteurs inhibiteurs.....</i>	<i>10</i>
<i>Récepteurs facilitateurs.....</i>	<i>20</i>
<i>Autres modulateurs de la libération de noradrénaline.....</i>	<i>25</i>
MÉCANISMES MODULATEURS DU SPILLOVER DE NORADRÉNALINE DANS LES MUSCLES	
SQUELETTIQUES AU REPOS ET À L'EXERCICE	27
<i>Modulation de la libération de noradrénaline.....</i>	<i>28</i>
<i>Variation dans la captation de noradrénaline.....</i>	<i>33</i>
<i>Sommaire des mécanismes modulateurs du spillover de noradrénaline à l'exercice ...</i>	<i>38</i>
SITES D' ACTION DES CATÉCHOLAMINES LIBÉRÉES PAR LES TERMINAISONS SYMPATHIQUES	
.....	40
<i>Récepteurs α-adrénergiques.....</i>	<i>40</i>

<i>Récepteurs β-adrénergiques</i>	41
EFFETS DES RÉCEPTEURS ADRÉNERGIQUES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE	44
<i>Effets aigus de la stimulation β-adrénergique</i>	47
<i>Effets Chroniques de la stimulation β-adrénergique</i>	52
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE LA THÈSE	57
CHAPITRE 2 : ÉTUDE 1	59
RÉSUMÉ	60
ABSTRACT	62
INTRODUCTION	63
MATERIALS AND METHODS	65
<i>Preparation of animals</i>	65
<i>Experimental protocol</i>	66
<i>Analytical methods</i>	68
<i>Data analysis and statistical methods</i>	69
RESULTS	69
DISCUSSION	70
ACKNOWLEDGEMENTS	74
REFERENCES	75
CHAPITRE 3: ÉTUDE 2	86
RÉSUMÉ	87
ABSTRACT	88
INTRODUCTION	89
MATERIALS AND METHODS	91
<i>Preparation of animals</i>	91
<i>Experimental protocol</i>	92
<i>Analytical methods</i>	93

<i>Data analysis and statistical methods</i>	94
RESULTS	95
DISCUSSION	95
ACKNOWLEDGEMENTS	99
REFERENCES	100
CHAPITRE 4 : ÉTUDE 3	109
ABSTRACT	110
INTRODUCTION.....	111
MATERIALS AND METHODS	112
<i>Animal Protocol</i>	112
<i>Contractile properties</i>	113
<i>Cultured neonatal rat cardiac fibroblasts</i>	114
<i>Measurement of total β-ADR density</i>	114
<i>Western blot analysis of Ras Distribution</i>	115
<i>Immunohistochemistry analysis of Ras in skeletal muscle</i>	115
<i>Statistical analysis</i>	116
RESULTS	116
<i>Skeletal muscle hypertrophy and contractile function</i>	116
<i>BMS-191563 modulation of β-ADR downregulation in skeletal muscle</i>	117
<i>BMS-191563 effect on agonist-mediated β-ADR downregulation in cultured neonatal rat cardiac fibroblasts</i>	118
<i>BMS-191563 effect on Ras distribution in the soleus muscle</i>	118
DISCUSSION	119
ACKNOWLEDGMENTS	123
RÉFÉRENCES	124

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	134
MODULATION DU SPILLOVER DE NORADRÉNALINE LORS DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE	135
MODULATION DU POURCENTAGE D'EXTRACTION DE LA NORADRÉNALINE LORS DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE.....	138
DÉSENSIBILISATION DES RÉCEPTEURS β -ADRENERGIQUES LORS DE L'EXERCICE.....	139
CHAPITRE 6 : CONCLUSION	142
RÉFÉRENCES.....	144

Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques des sous-types des récepteurs adrénergiques	43
Table. 1 (Étude 1) Arterial, venous and dialysate concentrations of catecholamines (pg·ml ⁻¹)	80
Table. 2 (Étude 1) Hemodynamic, hematocrit and blood pH values	81
Table. 1 (Étude 2) Hemodynamic and hematocrit values.....	105
Table 1. (Étude 3) Effect of BMS and Clenbuterol on contractile and half-relaxation times.	133

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique des effets modulateurs pré-synaptiques sur la libération de NA et de ses co-transmetteurs.	2
Figure 2. Représentation schématique des effets modulateurs possibles du spillover de NA lors de la contraction musculaire.	39
Figure 1. (Étude 1) Time line illustrating the experimental protocol.	82
Figure 2. (Étude 1) Fractional extractions of ³ H-adrenaline (top) and ³ H-noradrenaline (bottom) at flow 1 (18 ml min ⁻¹ •100 g ⁻¹ ; solid bars) and flow 2 (24 ml min ⁻¹ •100 g ⁻¹ ; hatched bars).	84
Figure 3. (Étude 1) Noradrenaline spillover during flow 1 (18 ml min ⁻¹ •100 g ⁻¹ ; solid bars) and flow 2 (24 ml min ⁻¹ •100 g ⁻¹ ; hatched bars).	85
Figure 1. (Étude 2) Time line illustrating the experimental protocol.	106
Figure 2. (Étude 2) Noradrenaline spillover during control conditions and HOE treatment.	107
Figure 3. (Étude 2) Fractional extraction of ³ H-noradrenaline during control conditions and HOE treatment.	108
Figure 1A. (Étude 3) β-adrenergic receptor regulation in skeletal muscle.	129
Figure 1B. (Étude 3) β-adrenergic receptor regulation cardiac fibroblasts.	130
Figure 2A. (Étude 3) Ras distribution in the soleus muscle.	131
Figure 2B. (Étude 3) Ras distribution in the soleus muscle.	132

Figure 4. Contribution relative des différents lits vasculaires à l'augmentation du spillover de NA total comme rapporté par Péronnet et al. (1988) (pourcentage à l'extérieur de la figure) et contribution de différents facteurs à l'augmentation du spillover de NA dans le muscle squelettique lors de l'exercice (pourcentage à l'intérieur de la figure). BK, bradykinine. 136

Liste des sigles et abréviations

A : Adrénaline

ACh : Acétylcholine

ACTH : Hormone corticotrope hypophysaire

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ANF : Facteur natriurétique auriculaire

Angio II : Angiotensine II

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

AV : Auriculo-ventriculaire

β -ADR : récepteur β -adrénergique

BF : Débit sanguin

BK : Bradykinine

BMS : BMS 191563

BP : Pression artérielle moyenne

C_a : Concentration artérielle plasmatique de catécholamines

C_v : Concentration veineuse plasmatique de catécholamines

CB : Cannabinoïde

CLEN : Clenbuterol

CON : Groupe contrôle

CGRP : Calcitonin gene-related peptide

D : Dopamine

D (Étude 1) : Concentration de catécholamines dans le dialysat

ECG : Électrocardiogramme

Fx : Fraction d'extraction

GABA : Acide γ -amino-butyrique

GPP : Pression de perfusion du gracilis

GPR : Récepteur couplé à une protéine G

GRK : Kinase reliée aux récepteurs couplés aux protéines G

Hct : Hématocrite

HOE : HOE 140

Iso : Isoproterenol

i.v. : intraveineux

M : Muscarinique

MG : Gastrocnemius médial

MSA : Muscle sympathetic nerve activity

N : Nicotinique

NA : Noradrénaline

NO : Oxyde nitrique

NPY : Neuropeptide Y

ORL : Opioid receptor like

PG : Prostaglandine

PGE : Prostaglandine de la série E

PCO_2 : Pression partielle du dioxyde de carbone

PO_2 : Pression partielle d'oxygène

Sp : Spillover

T_a : Concentration artérielle de catécholamines tritiées

T_v : Concentration veineuse de catécholamines tritiées

VIP : Polypeptide intestinal vasoactif

5-HT : 5-hydroxytryptamine (ou sérotonine)

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de thèse, Louise Béliveau, pour m'avoir dirigé tout au long de mon doctorat. Elle a su me guider vers la bonne direction lors d'embranchement difficile. J'aimerais également remercier Angelino Calderone qui a su m'ouvrir tout un nouveau monde de la physiologie que je ne connaissais pas. De plus, je dois remercier Pierre Corriveau et Pierre Fortier. Sans leur dévouement, leur aide précieuse et leur bonne humeur, toutes ces heures de travail auraient sûrement été plus difficiles.

Également, je voudrais remercier mes parents et mon copain, Jean-Charles Laurent, pour tous leurs supports, dans tous les sens possibles, et pour toujours avoir cru que je pouvais accomplir ce que je voulais faire. Sans eux, les durs moments de la recherche et de la vie auraient été beaucoup plus difficiles à franchir.

Finalement, je voudrais remercier tous mes amis pour m'avoir encourager dans le déroulement de mes études et pour avoir bien voulu prendre des moments pour venir prendre une pause avec moi quand j'avais besoin de ne plus penser à mes études...

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Introduction

Le système sympathique est largement distribué dans l'organisme où il contrôle les différentes fonctions involontaires. Lorsque le système sympathique est stimulé, la dépolarisation de ses fibres provoque une libération de noradrénaline (NA) des terminaisons nerveuses situées dans les organes ou tissus cibles. Contrairement à ce qui a longtemps été cru, ce système ne fonctionne pas selon une loi du tout ou rien, i.e. il peut y avoir stimulation sympathique au niveau de régions spécifiques (Esler et al. 1988).

La libération de NA ne dépend pas uniquement de l'activité électrique des fibres sympathiques; elle peut être modulée par plusieurs facteurs. Ainsi, il existe une panoplie de récepteurs pré-synaptiques qui influencent cette libération (pour une revue voir Fuder et Muscholl 1995). Les récepteurs α_2 -adrénergiques et peut-être α_1 , de même que les récepteurs au neuropeptide Y (NPY), dopaminergiques, opioïdes, muscariniques, aux prostaglandines (plus particulièrement à celles de la série E), à l'adénosine (A_1), purinergiques, histaminergiques, à la somatostatine, à la sérotonine, GABA_B (acide γ -amino-butérique), imidazolines, cannabinoïdes, et à l'ANF (facteur natriurétique auriculaire) sont par exemple tous des inhibiteurs de la libération de NA

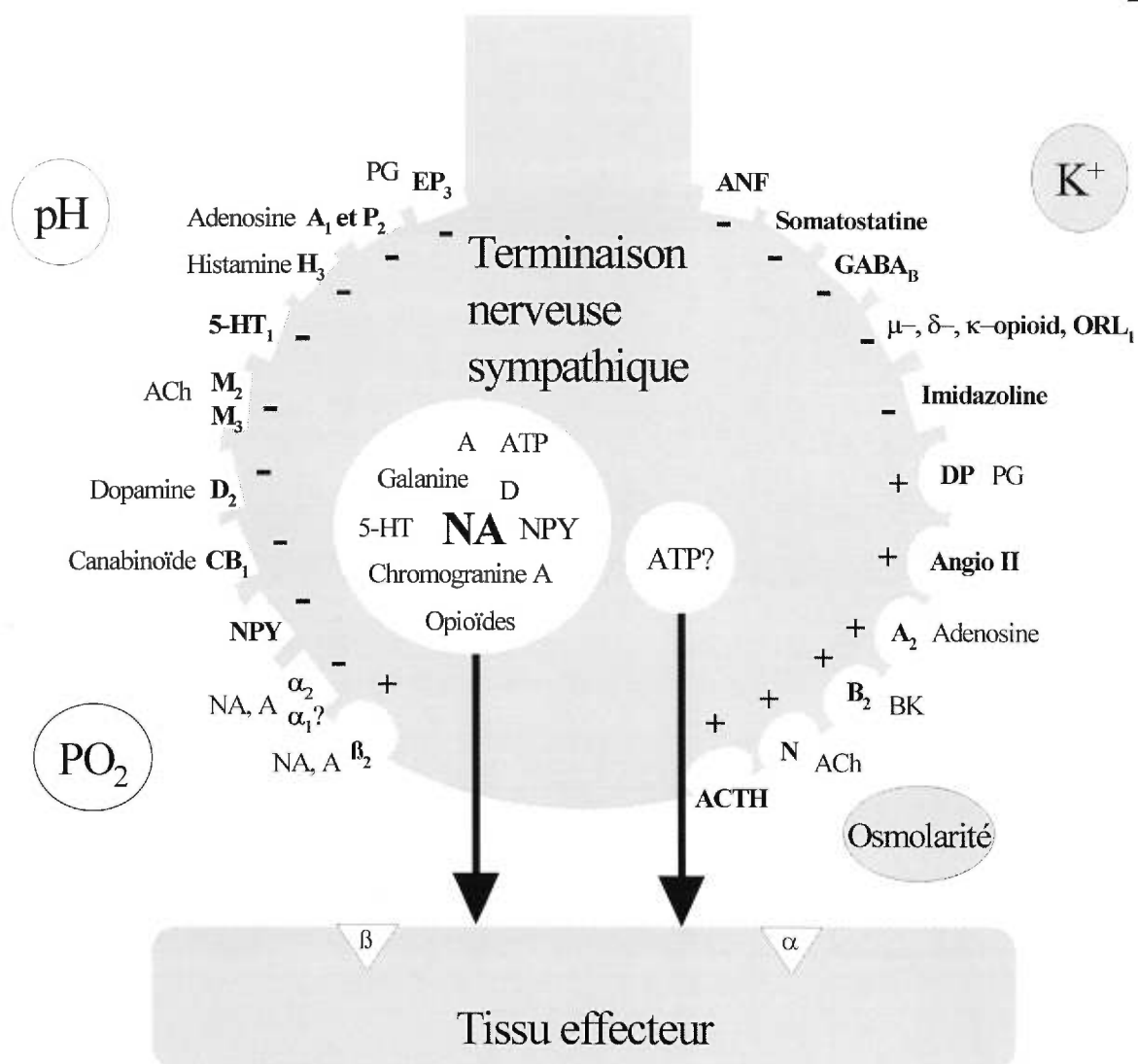


Figure 1. Représentation schématique des effets modulateurs pré-synaptiques sur la libération de NA et de ses co-transmetteurs. Les effets inhibiteurs (- ou cercle gris) et les effets facilitateurs (+ ou cercle blanc) sont représentés. Les récepteurs sont en caractères gras et leurs ligands en caractères standards. PG, prostaglandine ; 5-HT, 5-hydroxytryptamine ; ACh, Acétylcholine ; M, muscarinique ; NPY, neuropeptide Y ; NA, noradrénaline ; A, adrénaline; ACTH, hormone corticotrope hypophysaire; N, nicotinique; BK, bradykinine; Angio II, angiotensine II; GABA, acide gamma-amino-butyrique; ORL, opioid receptor like; ANF, facteur natriurétique auriculaire; D, dopamine. Pour plus d'explication, voir texte.

(Figure 1). Les récepteurs β_2 -adrénergiques, à la bradykinine, à l'angiotensine II, à l'ACTH (hormone corticotrope hypophysaire), à l'adénosine (A_2) et nicotiniques, quant à eux, ont un effet facilitateur (Figure 1). De plus, plusieurs facteurs métaboliques présents à proximité des terminaisons sympathiques peuvent influencer la libération de NA. Entre autres, des changements dans la concentration de potassium (Burcher et Garlick 1975; Du et Riemersma 1991; Kirpekar et al. 1972; Lorenz et Vanhoutte 1975; Miyazaki et Zipes 1990; Seyfarth et al. 1993), ainsi que des variations d'oxygénation tissulaire (Hirche et al. 1980; Leuenberger et al. 1991; Seyfarth et al. 1993; Wollenberger et Shahab 1965), de pH (Miyazaki et Zipes 1990 ; Seyfarth et al. 1993 ; Verbeuren et al. 1978) et d'osmolarité (McGrath et Sheperd 1976 ; Burcher et Garlick 1975), pourraient modifier la libération de NA. Ainsi, une augmentation de la concentration de potassium inhiberait la libération de NA (Kirpekar et al. 1972 ; Lorenz et Vanhoutte 1975 ; Burcher et Garlick 1975 ; Beaty et Donald 1977). L'acidose et l'hyperosmolarité auraient un effet inhibiteur sur la libération de NA (McGrath et Sheperd 1976; Burcher et Garlick 1975) alors que l'anoxie aurait l'effet contraire (Hirche et al. 1980; Leuenberger et al. 1991; Seyfarth et al. 1993; Wollenberger et Shahab 1965).

Une fois libérée, la NA peut être captée par des mécanismes pré-jonctionnels (uptake-1) ou post-jonctionnels (uptake-2). L'uptake-1 a lieu dans les terminaisons nerveuses sympathiques alors que l'uptake-2 se fait dans les tissus effecteurs. La NA peut aussi entrer dans la circulation (spillover). Finalement, elle peut s'attacher aux

récepteurs pré- et post-synaptiques présents localement ou, par le biais de la circulation, situés dans d'autres tissus pour exercer ses effets. Le spillover de NA va dépendre des mécanismes de libération et de captation de la NA et de tout autre facteur qui pourrait moduler la quantité qui diffuse vers la circulation. Par exemple, le débit sanguin pourrait moduler le spillover (Zimmerman et Whitmore 1967; Esler et al. 1988).

A l'exercice, il est connu qu'il y a une augmentation de la concentration de NA plasmatique. Celle-ci serait due principalement à une hausse du spillover de NA dans les lits vasculaires des muscles squelettiques (Hasking et al. 1988; Péronnet et al. 1988). Cette augmentation pourrait être provoquée par: 1) une augmentation de l'activité électrique des fibres sympathiques, 2) l'ouverture de capillaires additionnels et donc une augmentation de la masse tissulaire perfusée qui peut contribuer au spillover, 3) la hausse du débit sanguin qui augmenterait le lavage de la NA du liquide interstitiel, et 4) des changements dans la composition de l'environnement des fibres sympathiques qui modifieraient la libération ou la captation de la NA. Les facteurs impliqués dans la modulation du spillover de NA pendant la contraction musculaire demeure à être déterminés.

Tel que mentionné précédemment, suite à sa libération ou à sa mise en circulation et à sa diffusion dans d'autres tissus, la NA peut aussi s'attacher à des récepteurs post- ou pré-jonctionnels (β - ou α -adrénergiques) afin d'exercer ses effets.

Elle peut ainsi inhiber ou faciliter sa propre libération via les récepteurs pré-jonctionnels (Fuder et Muscholl 1995). Les effets de la NA sur les récepteurs post-jonctionnels dépendent du type de récepteurs et du tissu dans lequel ils sont présents. Ses effets vont aussi varier dans un même tissu selon que la stimulation est aiguë ou chronique. Par exemple, le muscle squelettique comporte essentiellement des récepteurs β -adrénergiques, plus particulièrement les β_2 et β -atypiques (Kim et al. 1991; Sillence et al. 1993). Leur stimulation aiguë, entre autres, pourrait augmenter la force tétanique (Bowman et Raper 1964; Cairns et Dulhunty 1993a, 1993b, 1994; Cairns et al. 1993 ; Clausen et Flatman 1980 ; Gonzales-Serratos et al. 1981 ; Oota, et Nagai 1977 ; Rang et Dale 1993) et de la secousse (Cairns et Dulhunty 1993b). La stimulation chronique de ses récepteurs β_2 -adrénergiques pourrait causer, quant à elle, une hypertrophie musculaire (Kim et Sainz 1992 ; Yang et McElligott 1989) en concomitance avec une désensibilisation de ces récepteurs (Elfellah et al 1989 ; Kim et al. 1992 ; Rothwell et al. 1987). Les mécanismes d'action sous-jacents à ces effets demeurent à être étudiés.

Dans la revue de la littérature, nous expliquerons brièvement les mécanismes impliqués dans la modulation de la libération de NA, soit par des récepteurs pré-synaptiques inhibiteurs ou facilitateurs ou par d'autres facteurs. Ensuite, nous discuterons des mécanismes modulateurs du spillover de NA dans le lit vasculaire des muscles squelettiques au repos et à l'exercice. Puis, nous discuterons des sites d'action des catécholamines libérées ainsi que de leurs effets, aigus et chroniques, sur le muscle squelettique. Dans la section études expérimentales, nous présenterons et

discuterons les résultats de trois études que nous avons réalisées sur la modulation du spillover de NA pendant la contraction et sur ses effets potentiels dans le muscle squelettique. Ainsi, nous avons fait l'étude des mécanismes, plus particulièrement du débit sanguin et de la bradykinine, qui modulent le spillover de NA lors de la contraction musculaire. Nous avons aussi étudié un des effets possibles de cette NA, plus particulièrement les mécanismes impliqués dans la régulation négative des récepteurs β_2 -adrénergiques lors de leur stimulation chronique. Finalement, nous présenterons une conclusion générale.

Modulateurs de la libération de noradrénaline

Plusieurs facteurs peuvent influencer la libération de NA dans le liquide interstitiel. Premièrement, une augmentation de l'activité électrique des fibres sympathiques provoque une augmentation de la libération de NA dans les organes ou tissus cibles (Oliver et al. 1980; Yamaguchi et al. 1975). Cependant, la libération de NA peut être modifiée par plusieurs facteurs pour une stimulation donnée. Par exemple, il existe une panoplie de récepteurs pré-synaptiques qui inhibent ou facilitent la libération de la NA des terminaisons sympathiques. Ainsi, la NA peut modifier sa propre libération en stimulant ses récepteurs pré-synaptiques. Toutefois, les vésicules des terminaisons sympathiques ne contiennent pas uniquement de la NA et certains de ces autres composés peuvent être impliqués dans la modulation de la

libération de NA. Également, des changements dans l'environnement des terminaisons sympathiques peuvent avoir des effets sur cette libération.

Qu'est-ce qui est libéré lors de la stimulation des terminaisons sympathiques ?

Il existerait différents types de vésicules dans les terminaisons sympathiques. La NA est contenue dans des petites et grosses vésicules, ces dernières étant plutôt libérées lors de forte stimulation. Il a été démontré que d'autres composés que la NA qui sont synthétisés sur place ou captés, par exemple la dopamine β -hydroxylase (De Potter et al. 1969), la somatostatine (Costa et al. 1986) et la sécrétoneurine (Liang et al. 1999), pouvaient être libérés en concomitance avec la NA par les terminaisons sympathiques dans certains lits vasculaires. Ces composés peuvent être contenus avec la NA dans les grosses et/ou les petites vésicules des terminaisons sympathiques et leur libération varient selon le tissu et le type de stimulation. Ainsi, la chromogranine A serait co-libérée avec la NA (De Potter et al. 1969; Takiyuddin et al. 1990, 1994), plus particulièrement lors de forte stimulation sympathique (Takiyuddin et al. 1990, 1994) puisqu'elle serait surtout mise en réserve dans les grosses vésicules (O'Connor et al. 1991). Comme la chromogranine A, la dopamine pourrait être libérée lors de la stimulation des nerfs sympathiques et serait contenue principalement dans les grosses vésicules (Bell 1987). Comme il est suggéré que les grosses vésicules sont libérées avant les petites (Dahlstrom 1973), la libération de

dopamine ou de chromogranine A pourrait servir d'indice quant aux types de vésicules d'où provienne la NA. Les composés opioïdes sont mis en réserve (De Potter et al. 1987; Douglas et al. 1986; Krukoff 1987; Lang et al. 1983; Morris et Gibbins 1989) et peuvent être libérés avec la NA par les terminaisons nerveuses sympathiques dans différents tissus et espèces (Klein 1982; De Potter et al. 1987; Lang et al. 1983; Xiang et al. 1984). Il y aurait aussi une libération de NPY simultanément avec celle de la NA (Allen et al. 1984; Kaijser et al. 1994; Kasakov et al. 1988; Kupfermann 1991; Lundberg et al. 1984, 1985a, 1986; Lundberg et Hokfelt 1986; Rand et al. 1990; Torres et al. 1992). Le NPY, comme la dopamine et la chromogranine A, serait mis en réserve principalement dans les grosses vésicules (Everitt et al. 1984; Fried et al. 1985; Lundberg et Hokfelt 1986) et serait préférentiellement libéré lors de stimulation de haute fréquence (Allen et al. 1984; Lundberg et al. 1986; Morris et al. 1986; Pernow et al. 1986; Takahashi et al. 1988; Takkiyyuddin et al. 1994). Il est aussi possible que l'A et la NA soient libérées simultanément par les terminaisons sympathiques. Ceci a été démontré dans le cœur chez l'Homme (Esler et al. 1995; Johansson et al. 1997), chez le Rat (Tsuda et al. 1990) et chez le Chien (Péronnet et al. 1988), ainsi que dans le muscle gracilis (Rosell et al. 1964) et la veine saphène (Guimaraes et al. 1978) chez le Chien. Il a été suggéré que l'A libérée par ces tissus ne serait pas synthétisée dans les terminaisons sympathiques puisque l'enzyme nécessaire n'y est pas présente, mais serait plutôt captée de la circulation puis entreposée dans des vésicules avec la NA. L'ATP (adénosine triphosphate) semble être co-libéré avec la NA (pour revues voir

Stjarne 1989; Burnstock 1990). Toutefois, une controverse existe quant à la provenance de l'ATP. Il pourrait être mis en réserve avec la NA dans les mêmes vésicules et être libéré en parallèle (Kasakov et al. 1988; Msghina et al. 1999; Stjarne 1989; von Kugelgen et al. 1994) et/ou provenir de vésicules différentes (Msghina et al. 1999; Todorov et al. 1994, 1996, 1999; Yang et Chiba 1999). Dans le dernier cas, il a été suggéré que l'ATP serait mis en réserve dans les terminaisons sympathiques mais localisé dans d'autres vésicules que celles de la NA et libéré par un mécanisme indépendant (Todorov et al. 1996; Westfall et al. 1996). De plus, des nucléotidases solubles seraient libérées avec l'ATP afin de dégrader celui-ci en adénosine (Todorov et al. 1997). Dans le pancréas, on a observé une co-libération de galanine avec la NA chez le Chien (Dunning et Taborsky 1988; Havel et al. 1992; Scheurink et al. 1992). Il a aussi été suggéré que la 5-HT était libérée avec la NA. Celle-ci serait prise de la circulation, où elle est libérée par les plaquettes sanguines, puis mise en réserve dans les terminaisons sympathiques avec la NA (Fozard et Mwaluko 1973; Cohen 1987).

La NA peut donc être co-libérée avec plusieurs composés lors de la stimulation des terminaisons sympathiques. Ces composés sont mis en réserve dans des vésicules avec la NA dans les terminaisons sympathiques et peuvent même être un indice de la provenance de la NA selon leurs emplacements dans des petites ou grosses vésicules. Toutefois, il est possible que toutes ces substances ne soient pas toujours co-libérées avec la NA puisque ceci semble varier selon le tissu et le type de stimulation étudiés.

Récepteurs inhibiteurs

Tout d'abord, il doit être mentionné que la NA exerce une autorégulation de sa propre libération à travers la stimulation de récepteurs α_2 -adrénergiques (pour revue voir Rand et al. 1990). Certains auteurs ont aussi suggéré l'existence de récepteurs α_1 -adrénergiques dans les lits vasculaires du rein (Rump et Majewski 1987) et de l'oreillette (Story et al. 1985) chez le Rat et des muscles squelettiques chez le Chien (Kahan et Hjemdahl 1987a) qui inhiberaient, comme les récepteurs α_2 , la libération de NA. De plus, certains auteurs ont démontré que l'A, à de grandes concentrations, pourrait stimuler les récepteurs α -adrénergiques dans l'artère de l'oreille (Abrahamsen et Nedergaard 1991) et dans l'aorte (Abrahamsen et Nedergaard 1989) chez le Lapin et dans la pulpe dentaire (Parker et al. 1999) et le muscle squelettique (Chang et al. 1994) chez l'Homme. Ainsi, l'inhibition par les récepteurs α_2 -adrénergiques, et peut-être les α_1 , pourrait non seulement être exercée par la NA libérée par les terminaisons sympathiques mais aussi par l'A co-libérée ou provenant de la circulation.

La régulation de la libération de NA par les récepteurs α -adrénergiques serait très dépendante de la fréquence de stimulation. Il semblerait que l'inhibition par les récepteurs α_2 -adrénergiques serait plus efficace lors de stimulations à basses et moyennes fréquences (pour revue voir Langer 1997). De plus, certains auteurs ont suggéré que l'effet des récepteurs α_2 -adrénergiques serait plus prononcé chez la femme que chez l'homme. Du et al. (1991) ont démontré que lors du blocage des

récepteurs α_2 -adrénergiques, l'augmentation de la libération de NA était plus grande dans les cœurs isolés de rats femelles par rapport aux mâles. Cet effet était aboli par l'ovariectomie chez les femelles. Toutefois, cet effet n'a pas été observé dans l'artère de la queue chez le rat (Garcia-Villalon et al. 1997). Ainsi, l'effet des hormones sexuelles femelles sur l'activité des récepteurs α_2 -adrénergiques est controversé.

D'autres systèmes d'autorégulation négative de la libération de NA sont présents puisque plusieurs des substances qui sont co-libérées avec la NA - le NPY, la dopamine, les composés opioïdes, l'ATP et la somatostatine- peuvent exercer un effet sur la libération. Certains auteurs ont ainsi rapporté un effet inhibiteur du NPY sur la libération de NA (pour revue voir Fuder et Muscholl 1995; Rand et al. 1990). Le NPY stimulerait un sous-type de récepteur différent de ceux qui sont présentement connus, c'est-à-dire autres que les récepteurs NPY- Y_1 et NPY- Y_2 (Bitran et al. 1996). L'inhibition par le NPY serait exercée en diminuant l'entrée du calcium dans les terminaisons sympathiques par l'inhibition sélective des canaux calciques de type N (Toth et al. 1993).

Plusieurs auteurs ont démontré la présence de récepteurs pré-synaptiques dopaminergiques, du type D_2 , qui inhibaient la libération de NA des terminaisons nerveuses sympathiques (pour revue voir Willems et al. 1985). L'inhibition dopaminergique peut être observée dans plusieurs tissus, par exemple le cœur, les vaisseaux sanguins, le rein et la rate (Willems et al. 1985). Toutefois, peu

d'évidences suggèrent un effet de la dopamine endogène sur la libération de NA dans des conditions physiologiques puisque les concentrations atteintes dans l'espace synaptique ne seraient pas suffisamment élevées pour stimuler les récepteurs pré-synaptiques (Bell 1987). De plus, la dopamine, comme agoniste physiologique, stimule les récepteurs dopaminergiques de façon prédominante dans des espèces comme le Chat, le Chien et le Lapin et ainsi inhibe la libération de NA alors que chez le Rat et le Cochon d'Inde, la stimulation des récepteurs α_2 -adrénergiques est l'effet dominant (Fuder et Muscholl 1995). Ainsi, même si la dopamine pouvait exercer un effet inhibiteur dans des conditions physiologiques, selon l'espèce étudiée, son effet pourrait être par la stimulation des récepteurs α_2 -adrénergiques plutôt que par ses propres récepteurs.

Plusieurs auteurs ont observé une modulation de la neurotransmission sympathique par les récepteurs opioïdes (pour revues voir Fuder 1988 ; Illes 1989). Il existe toutefois peu d'évidences pour un rôle physiologique des composés opioïdes endogènes, même si plusieurs composés opioïdes exogènes semblent inhiber la libération de NA dans différents tissus *in vitro* et *in vivo* (Fuder et Muscholl 1995). Ces effets peuvent être médiés par les trois types de récepteurs opioïdes classiques, μ , κ et δ (Illes 1989), et par le récepteur ORL₁ récemment identifié (Berzetei-Gurske et al. 1996; Burcher 1998; Calo et al. 1996; Trendelenburg et al. 2000). L'inhibition par ces récepteurs semble être inversement proportionnelle à l'intensité de la stimulation (Duckles et Budai 1990). Ainsi, plus la fréquence ou le train de stimulation est élevé, plus l'inhibition par les récepteurs opioïdes est faible.

L'inhibition de la libération de NA par les purines endogènes, par exemple l'adénosine, via les récepteurs A₁ est bien caractérisée (Fuder et Muscholl 1995). Il a été suggéré que ces récepteurs seraient d'importance mineure dans des conditions normoxiques et lors de stimulation de courte durée (Wennmalm et al. 1988). Toutefois, ils contribueraient largement lors d'hypoxie et de stimulation nerveuse de durée prolongée (Fredholm et Dunwiddie 1988). L'ATP qui est co-libéré avec la NA, ainsi que d'autres nucléotides, peuvent aussi stimuler ces récepteurs (Kurz et al. 1993). Toutefois, il est maintenant suggéré que l'ATP agirait par l'activation d'un récepteur différent, le récepteur P₂ (Koch et al. 1998 ; Olsson et Pearson 1990). On peut observer, lors de l'utilisation d'un antagoniste P₂, une inhibition de l'effet des agonistes aux récepteur P₂ mais non aux agonistes des récepteurs à l'adénosine (Fuder et Muth 1993, Kurz et al. 1993). De plus, les antagonistes aux récepteurs P₂ causent une augmentation de la libération de NA qui indiquerait une auto-inhibition par les nucléotides endogènes (Fuder et Muscholl 1995).

La sérotonine ou 5-HT peut inhiber la libération de la NA par la stimulation des récepteurs pré-synaptiques 5-HT₁ (pour revue voir Fuder et Muscholl 1995). Toutefois, il existe peu d'information dans la littérature concernant leur contribution physiologique et les sources de cette 5-HT. Comme mentionné précédemment, la 5-HT pourrait être co-libérée avec la NA mais elle pourrait aussi provenir des mastocytes. En effet, il a été observé que lors de la dégranulation des mastocytes dans le cœur chez le Rat, il y avait non seulement libération d'histamine mais aussi de 5-HT (Fuder et al. 1994). De plus, le spillover de NA lors de la dégranulation

était inhibé par un mécanisme sensible au methiotepin, un antagoniste des récepteurs 5-HT₁, suggérant un effet pré-jonctionnel de la 5-HT provenant des mastocytes. Ainsi, la 5-HT pourrait moduler la libération de NA de façon plus importante lors de conditions pathophysiologiques impliquant la dégranulation des mastocytes.

Certains auteurs ont observé une inhibition de la libération de NA par la somatostatine dans l'hypothalamus (Gothert 1980) et l'artère mésentérique (Calhau et al. 2000) chez le Rat, dans les neurones sympathiques chez le Poussin (Boehm et Huck 1996) ainsi que dans l'artère de l'oreille chez le Lapin (Maynard et al. 1991). Il a été suggéré que cet effet serait médié par les récepteurs sst₂, -3 ou -5 (Boehm et Huck 1996; Calhau et al. 2000). Également, certains auteurs ont suggéré que la chromogranine A serait un antagoniste des récepteurs nicotiques et ainsi causerait une inhibition de la libération de NA (Mahata et al. 1997).

Plusieurs autres substances, comme l'acétylcholine (Ach), les prostaglandines, l'histamine, les substances cannabinoïdes, l'ANF, le GABA, l'imidazoline et la neurotensine (Tsuda et al. 1988), qui sont présentes dans l'interstitium peuvent également inhiber la libération de NA. Par exemple, la présence de récepteurs muscariniques sur les terminaisons sympathiques est bien connue (Rand et al. 1990 ; Vanhoutte et al. 1981). La majorité des récepteurs pré-synaptiques muscariniques sont de type M₂ (pour revue voir Fuder et Muscholl 1995). Il a aussi été rapporté à quelques reprises, par exemple dans la trachée chez le Cochon d'Inde (Pendry et Maclagan 1991), les artères chez le Chat (Fernandes et al. 1991) et les artères cérébrales bovines (Ferrer et al. 1992), que les récepteurs de type

M₃ pouvaient contribuer à l'inhibition de la libération de NA par les récepteurs muscariniques. L'inhibition muscarinique par les récepteurs M₂ semble être médiée par un mécanisme lié à une protéine G sensible à N-ethylmaleimide (Yokotani et Osumi 1993) et insensible à la toxine pertussique (Costa et Majewski 1990 ; Yokotani et Osumi 1993). Dans des conditions physiologiques, les nerfs sympathiques et parasympathiques sont stimulés selon des patrons et fréquences de stimulation distincts. Ainsi, on ne peut observer une stimulation simultanée des deux nerfs à des fréquences semblables comme il est le cas lors de stimulations nerveuses dans des tissus isolés. Il est donc difficile d'évaluer la contribution physiologique de l'ACh endogène par la stimulation des récepteurs muscariniques lors d'un protocole expérimental.

L'inhibition pré-synaptique de la libération de NA par les récepteurs EP prostanoïdes a été observée dans plusieurs tissus et espèces, incluant l'Homme (pour revue voir Malik et Sehic 1990). Ces récepteurs seraient du sous-type EP₃ dans l'aorte chez le Lapin (Jensen et Nedergaard 1999), l'oreillette et le vas deferens chez le Cochon (Coleman et al. 1987 ; Mantelli et al. 1991), dans la trachée, l'estomac et la veine cave chez le Rat (Racké et al. 1991 ; Mohlig et al. 1992 ; Molderings et al. 1992a) ainsi que dans la veine saphène, l'artère pulmonaire (Molderings et al. 1992b), le complexe iris-corps ciliaire (Ohia et Jumblatt 1991) et l'oreillette (Molderings et al. 1998) chez l'Homme. Les prostanoïdes endogènes qui stimuleraient ces récepteurs, proviendraient de leur synthèse locale. Celle-ci serait stimulée par la libération de NA (Fuder et Muscholl 1995). Ces auteurs ont aussi

suggéré que ces prostanoïdes pourraient être co-libérées avec la NA et ainsi ajouteraient à l'auto-inhibition de la NA.

L'histamine semble inhiber la libération de NA par la stimulation des récepteurs H₃ pré-synaptiques dans plusieurs tissus et espèces *in vivo* et *in vitro* (pour revue voir Fuder et Muscholl 1995). Certains auteurs ont suggéré que cette inhibition serait médiée par une protéine G sensible à la toxine pertussique (Endou et al. 1994 ; Nozaki et Sperelakis 1989) et par l'inhibition de canaux calciques de type N (Blandizzi et al. 2000; Endou et al. 1994 ; Levi et Smith 2000). Il a été suggéré que dans des conditions normales, ces récepteurs auraient peu d'implication due à la faible concentration d'histamine présente. Toutefois, dans des conditions d'ischémie, l'histamine endogène augmenterait suffisamment pour inhiber la libération de NA (Imamura et al. 1994). Les premières études faites sur l'inhibition de la libération de NA par l'histamine doivent être interprétées avec attention puisque les antagonistes utilisés à ce moment n'étaient pas aussi spécifiques aux récepteurs H₁ ou H₂ qu'il était cru. En effet, certains de ces antagonistes pouvaient également bloquer les récepteurs H₃ (pour revue voir Haaksma et al. 1990). Ainsi, les études antérieures démontrant un effet de l'histamine sensible au blocage des récepteurs H₁ ou H₂ pouvaient être dues, en fait, aux récepteurs H₃.

Récemment, plusieurs études ont démontré un effet inhibiteur des substances cannabinoïdes sur la libération de NA par la stimulation des récepteurs CB₁. Cet effet a été observé dans les vaisseaux sanguins chez le Lapin (Niederhoffer et Szabo 1999), dans le vas deferens chez la Souris (Trendelenburg et al. 2000), dans le rein

(Deutsch et al. 1997), l'artère de la queue (Malinowska et al. 1997), l'oreillette et le vas deferens (Ishac et al. 1996) chez le Rat et dans l'oreillette chez l'Homme (Molderings et al. 1999). Il a été suggéré que l'effet des récepteurs cannabinoïdes serait spécifique à l'espèce; par exemple ils inhibent la libération de NA dans l'oreillette chez le Rat (Ishac et al. 1996) mais pas chez la Souris (Trendelenburg et al. 2000). Certaines substances endogènes, comme par exemple, l'anandamide et la glycéride 2-archidonyl, peuvent stimuler ces récepteurs. Il a été suggéré que ces substances pourraient être libérées dans des conditions de choc cardio-vasculaire, par exemple lors d'une hémorragie, et seraient impliquées dans la réponse hypotensive en inhibant de la libération de NA (Wagner et al. 1998).

Il a été suggéré que l'ANF pouvait inhiber la libération de NA dans le vas deferens chez le Lapin (Drewett et al. 1989). Cet effet inhibiteur est bloqué par la toxine pertussique ce qui suggère l'implication de protéine G (Johnson et al. 1991). Toutefois, cet effet de l'ANF n'est pas observé dans tous les tissus et espèces. Par exemple, aucun effet n'a été observé dans l'oreillette chez le Cochon D'Inde et dans le rein chez le Rat (Schwartz et Eikenburg 1991) et chez le Chien (Tomura et al. 1991).

Plusieurs auteurs ont démontré une inhibition de la libération de NA par les récepteurs GABA_B *in vitro* (pour revue voir Fuder et Muscholl 1995). Par contre, aucune étude *in vivo* n'a encore démontré l'inhibition de la libération de la NA par ces récepteurs. Toutefois, certaines observations suggèrent leur implication (Kohlenbach et Schlicker 1990; Schlicker et al. 1993). Kohlenbach et Schlicker

(1990) ont observé une inhibition par le GABA et un agoniste GABA_B, le R-(--)-baclofen, de la réponse vasopressive induite par la stimulation électrique sans aucun effet sur la réponse à la NA. Cet effet était bloqué par un antagoniste GABA_B mais non GABA_A. Les auteurs ont donc suggéré que le GABA inhibait la libération de NA dans les vaisseaux à résistance par la stimulation des récepteurs GABA_B.

Il a été démontré que le dérivé de l'imidazoline, BDF 6143 (4-chloro-2[2-imidazolin-2-ylamino]-isoindoline hydrochloride), pouvait faciliter la libération de NA en présence de la yohimbine ou de la rauwolscine, des antagonistes α_2 -adrénergiques, mais pouvait aussi inhiber cette libération (Docherty et al. 1982). En effet, certains auteurs ont démontré que plusieurs dérivés de l'imidazoline et de la guanidine pouvaient inhiber la libération de neurotransmetteurs sympathiques par un mécanisme indépendant de l'activation des récepteurs α_2 -adrénergiques. Ils ont suggéré que cet effet était médié par des récepteurs pré-synaptiques à l'imidazoline/guanidine situés sur les terminaisons sympathiques (Gothert et Molderings 1991; Molderings et al. 1991). Ces récepteurs seraient différents des récepteurs imidazoline déjà connus, c'est-à-dire, les récepteurs I₁ et I₂ (Molderings et al. 1997). Il a été suggéré que ces récepteurs étaient présents dans les vaisseaux sanguins et le cœur chez l'Homme et chez l'animal (Fuder et Schwarz 1993 ; Gother et Molderings 1991 ; Linkungu et al. 1996 ; Molderings et al. 1991, 1997, 1999 ; Molderings et Gothert 1996, 1999). Toutefois, certaines études ne rapportent pas la présence de ces récepteurs à l'imidazoline distincts des récepteurs α_2 -adrénergiques (Gaiser et al. 1999). Il est possible que ces divergences soient dues au protocole de

stimulation employé. En effet, l'effet des récepteurs à l'imidazoline semble être plus présent lors de stimulation prolongée à fréquence modérée (Molderings et al. 1999). Il n'a pas encore été déterminé si un agoniste endogène existait pour ces récepteurs à l'imidazoline/guanidine ou s'ils sont impliqués dans les effets des dérivés de l'imidazoline ou de la guanidine *in vivo*. De plus, s'il y a implication de ces récepteurs à l'imidazoline ce serait seulement dans des conditions où il y aurait absence de l'auto-inhibition par les récepteurs α_2 -adrénergiques (Gothert et Molderings 1991).

Ainsi, la libération de NA peut non seulement être auto-inhiber par la stimulation des récepteurs α -adrénergiques mais elle peut aussi être inhibée par des substances co-libérées avec la NA- comme l'A, le NPY, la dopamine, les substances opioïdes, l'ATP et la somatostatine- ou des substances qui sont présentes dans l'interstitium- par exemple, l'Ach, les prostaglandines, l'histamine, les substances cannabinoïdes, l'ANF, le GABA et l'imidazoline. Les mécanismes impliqués ne sont pas tous bien déterminés. Comme mentionné précédemment, l'effet de ces différents récepteurs pourrait varier selon le tissu, l'espèce et le protocole de stimulation employé. De plus, l'implication physiologique de tous ces différents récepteurs n'est pas encore bien connue. En effet, alors que certains de ces composés, par exemple les purines, la sérotonine, les substances cannabinoïdes et l'histamine, semblent être impliqués dans différentes réactions physiologiques, l'implication de d'autres, par exemple la dopamine, les composés opioïdes et l'imidazoline semble douteuse.

Récepteurs facilitateurs

Comme mentionné précédemment, la NA peut exercer une autorégulation de sa propre libération. Toutefois, elle pourrait non seulement inhiber sa libération mais aussi la faciliter par la stimulation des récepteurs β -adrénergiques, plus particulièrement les récepteurs β_2 (pour revue voir Nedergaard et Abrahamsen 1990). Cependant, certains auteurs ont suggéré que dans le cœur on trouverait plutôt des récepteurs β_1 sur les terminaisons sympathiques (McCance et Forfar 1993). Toutefois, puisque la NA a une plus grande affinité pour les récepteurs α , l'effet prédominant de celle-ci semble être l'inhibition de sa propre libération (Lefkowitz et al. 1996). Néanmoins, l'A pourrait stimuler ces récepteurs facilitateurs puisqu'elle a une plus grande affinité que la NA pour les récepteurs β -adrénergiques (Dahlof et al. 1978). En effet, certains auteurs ont observé une facilitation de la libération de NA par l'A avec (Chang et al. 1994; Péronnet et al. 1988) et sans (Chang et al. 1989; Stein et al. 1993) blocage des récepteurs α_2 -adrénergiques. Par contre, dans une étude réalisée dans des conditions physiologiques, même en bloquant les récepteurs α , on n'observe pas de facilitation de la libération de NA dans le cœur chez l'Homme (Thompson et al. 1998). Toutefois, certains auteurs ont observé une facilitation de la libération de NA par une infusion d'A chez le rat surrénalectomisé éveillé au repos et lors de l'exercice (Coppes et al. 1993, 1995). Compte tenu de ces résultats controversés, il est difficile d'évaluer la contribution des récepteurs β -adrénergiques dans des conditions physiologiques.

Comme l'A, l'adénosine qui est elle aussi co-libérée avec la NA, pourrait faciliter la libération de NA par la stimulation des récepteurs A₂. Ceci a été observé dans l'iris et le vas deferens chez le Rat (Fuder et al. 1992 ; Goncalves et Queiroz 1993). Toutefois, il existe peu d'informations concernant la pertinence fonctionnelle ou physiologique de ces récepteurs.

Plusieurs substances présentes dans l'interstitium peuvent aussi faciliter la libération de NA, par exemple, l'Ach, les prostaglandines, l'angiotensine II, la bradykinine, l'ACTH et le VIP (polypeptide intestinal vasoactif). Comme mentionné dans la section précédente, l'Ach peut inhiber la libération de NA par la stimulation des récepteurs muscariniques mais elle peut également causer une facilitation via les récepteurs nicotiniques (pour revue voir Fuder et Muscholl 1995). Cette facilitation peut être observée dans les vaisseaux sanguins périphériques (pour revue voir Nedergaard 1988), dans l'ileum (Plenz 1990) et le vas deferens (Todorov et al. 1991) chez le Cochon d'Inde. Par contre, certains n'ont observé aucun effet des récepteurs nicotiniques dans le cœur chez le Rat (Fuder et al. 1982 ; Elfellah et Khan 1986). De plus, l'activation simultanée des récepteurs muscariniques inhibiteurs contrait l'effet des récepteurs nicotiniques (Todorov et al 1991). Il existe peu d'évidences pour un effet physiologique des récepteurs nicotiniques sur la modulation de la libération de NA puisqu'il est peu probable que les concentrations d'Ach soient suffisantes pour stimuler ces récepteurs. En effet, l'Ach stimule les récepteurs muscariniques à des

concentrations plus basses et donc, il a été suggéré que l'effet dominant de l'Ach serait une inhibition par les récepteurs muscariniques (Fuder et Muscholl 1995).

Comme l'Ach, les prostaglandines possèdent des récepteurs inhibiteurs et facilitateurs. Toutefois, ce sont plus particulièrement les prostaglandines D₂ qui causent une facilitation alors que les E₂ inhibent la libération de NA. Ce sont donc deux types de prostaglandines différentes qui, par des récepteurs distincts, module la libération de NA. Une facilitation par la stimulation des récepteurs DP aux prostaglandines peut être observée dans le corpus cavernosum (Molderings et al. 1992b), la veine saphène (Molderings et al. 1994) et l'oreillette (Molderings et al. 1998) chez l'Homme et dans l'artère mésentérique chez le Chien (Nakajima et Toda 1984). Cependant, aucune étude *in vivo* n'a été faite sur ces récepteurs et donc, il est difficile de déterminer leur implication physiologique.

Plusieurs auteurs ont observé une facilitation de la libération de NA par l'angiotensine II *in vitro* (pour revues voir Fuder et Muscholl 1995; Rand et al. 1990). Cet effet a aussi été observé *in vivo* dans le muscle squelettique chez le Chien (Schwieler et al. 1991, 1992, 1993, 1994), chez le Lapin (Noshiro et al. 1994; Shimizu et al. 1993) et chez l'Homme (Clemson et al. 1994) et dans le rein chez le Chien (Hayashi et al. 1991; Suzuki et al. 1992). Toutefois, certains auteurs n'ont observé aucun effet de l'angiotensine II dans le cœur (Rundqvist et al. 1997) et le muscle squelettique (Chang et al. 1995) chez l'Homme. Son implication est donc encore controversée chez l'Homme. La majorité des études suggèrent que l'effet facilitateur de l'angiotensine II serait médié par les récepteurs AT₁ (Boicos et al.

1998; Brasch et al. 1993; Cox et al. 1999; Gironacci et al. 1994; Ohia et Jumblatt 1993; Rump et al. 1995; Suzuki et al. 1992; Wong et al. 1991). Toutefois, certains auteurs ont observé un effet médié par les récepteurs AT₁ et AT₂ (Cox et al. 1995, 1996a, 1996b) alors que d'autres suggéraient l'implication d'aucun de ces récepteurs (Guimaraes et al. 1998; Moura et al. 1997). Il a été suggéré que la facilitation de la libération de NA par l'angiotensine II serait due à un dérèglement de l'auto-inhibition α_2 -adrénergique médiée par une protéine G_{i/o} (Cox et al. 2000).

L'effet facilitateur de la bradykinine par ses récepteurs B₂ a été démontré par plusieurs auteurs. Ainsi, il a été observé dans le gracilis chez le Chien (Schwieler et al. 1994), dans le rein chez l'Homme (Rump et al. 1995), dans le cœur chez l'Homme, le Cochon d'Inde, la Souris et le Rat (Chulak et al. 1998; Cox et al. 2000; Hatta et al. 1999; Kurz et al. 1997; Minshall et al. 1994; Rump et al. 1997; Seyedi et al. 1997; Trendelburg et al. 2000; Vaz-da-Silva et al. 1996), dans le vas deferens chez le Rat et la Souris (Llona et al. 1991 ; Trendelburg et al. 2000), dans la rate chez la Souris (Trendelburg et al. 2000) et dans l'hypothalamus chez le Rat (Tsuda et al. 1993). Il a été suggéré que cette facilitation de la libération de NA était due, comme celle de l'angiotensine II, à un dérèglement de l'auto-inhibition α_2 -adrénergique médiée par une protéine G_{i/o} (Cox et al. 2000). Contrairement à ces observations, Starke et al. (1977) ont observé une inhibition de la libération de NA dans le cœur chez le Lapin. Il est possible que dans ce tissu la stimulation de la synthèse des prostaglandines par la bradykinine soit plus grande. Ainsi, l'inhibition de la

libération de NA causée par les prostaglandines masquerait la facilitation par la bradykinine.

Certains auteurs ont aussi observé une facilitation de la libération de NA par d'autres polypeptides, par exemple l'ACTH et le VIP. La facilitation par l'ACTH de la libération de NA a été observée dans l'artère pulmonaire (Costa et Majewski 1988; Gothert 1981, 1984), l'aorte (Gothert 1984), l'oreillette (Costa et Majewski 1988) et le cœur perfusé (Szabo et al. 1988) chez le Lapin. Toutefois, aucun effet n'a été observé dans l'oreillette et l'artère pulmonaire chez le Rat et dans l'artère pulmonaire chez le Cochon d'Inde (Costa et Majewski 1988) suggérant une différence entre les espèces. Certains auteurs ont suggéré l'implication de l'AMPC (adénosine monophosphate cyclique) dans l'effet de l'ACTH (Gothert et Hentrich 1984).

L'effet du VIP est toutefois controversé. Aucun effet pré-jonctionnel n'a été observé dans la trachée chez le Cochon d'Inde (Pendry et Maclagan 1991) et dans le muscle gracilis chez le Chien (Kahan et al. 1985) alors qu'une facilitation de la libération de NA a été observée dans le plexus choroïdien chez le Cochon (Nilsson et al. 1990) et dans les neurones sympathiques en culture chez le Poussin (Przywara et al. 1991).

Ainsi, la libération de NA peut non seulement être auto-facilitée par la stimulation des récepteurs β -adrénergiques mais elle peut aussi être facilitée par des substances co-libérées avec la NA- comme l'A et l'adénosine- ou présentes dans l'interstitium- par exemple, l'Ach, les prostaglandines, l'angiotensine II, la bradykinine, l'ACTH et le VIP. Toutefois, l'effet des différents récepteurs peut

varier selon le tissu et l'espèce ainsi que selon les conditions expérimentales. De plus, comme les récepteurs inhibiteurs, les effets physiologiques de tous ces différents récepteurs facilitateurs n'a pas encore été étudiés.

Autres modulateurs de la libération de noradrénaline

D'autres facteurs peuvent moduler la libération de NA dont, entre autres, la concentration de certains ions à proximité des terminaisons sympathiques. Par exemple, il semble que le potassium ait un effet inhibiteur (Burcher et Garlick 1975; Du et Riemersma 1991; Kirpekar et al. 1972; Lorenz et Vanhoutte 1975; Miyazaki et Zipes 1990; Seyfarth et al. 1993). Dans des expériences réalisées *in vitro* dans la rate chez le Chat (Kirpekar et al. 1972), dans la veine saphène chez le Chien (Lorenz et Vanhoutte 1975) et dans le cœur chez l'Homme (Seyfarth et al. 1993), le Rat (Du et Riemersma 1991; Seyfarth et al. 1993) et le Cochon d'Inde (Seyfarth et al. 1993) et *in situ* dans le cœur chez le Chien (Miyazaki et Zipes 1990), il a été observé qu'une augmentation de la concentration de potassium inhibait la libération de NA. Dans des expériences *in situ* dans le muscle gracilis chez le Chien, une vasoconstriction induite par l'infusion de NA a été observée alors qu'aucune vasoconstriction était observée lors de la stimulation sympathique dans des conditions où la concentration de potassium était élevée (Burcher et Garlick 1975). Il a donc été suggéré que le potassium avait un effet pré-synaptique inhibiteur. Celui-ci pourrait être causé par une inhibition de la neurotransmission sympathique due à la dépolarisation des

terminaisons nerveuses sympathiques. Par contre, certains auteurs n'ont pas observé de vasoconstriction lors d'infusion de NA dans un protocole similaire (Beaty et Donald 1977). Toutefois, l'ensemble des travaux étudiant l'effet du potassium sur la libération de NE semble pointer vers un effet inhibiteur.

Il a aussi été suggéré que l'oxygénation tissulaire pourrait inhiber la libération de NA. En effet, il a été observé que dans des conditions d'hypoxie le spillover de NA était augmenté (Hirche et al. 1980; Leuenberger et al. 1991; Seyfarth et al. 1993; Wollenberger et Shahab 1965). Il semblerait que, dans ces conditions, l'inhibition de la libération de NA par les récepteurs α_2 et à l'adénosine n'était pas présente alors que la facilitation par les récepteurs β_2 - et à l'angiotensine était maximale (Munch et al. 1996). Toutefois, le mécanisme d'action par lequel cet effet est exercé n'a pas encore été déterminé. Compte tenu que des changements dans l'oxygénation tissulaire peut engendrer plusieurs modifications locales, il est difficile de déterminer les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la libération de NA.

Il a été démontré qu'une hyperosmolarité pouvait inhiber la libération de NA dans la veine saphène de Chien *in vitro* (McGrath et Shepherd 1976). Par contre, dans des expériences *in situ*, certains auteurs n'ont pas observé d'effet pré-synaptique de l'hyperosmolalité (Burcher et Garlick 1975). Il est à noter que l'osmolarité et l'osmolalité sont considérées comme étant semblables dans le plasma. Il est possible que les différences observées entre ces modèles soient dues à des facteurs additionnels qui serait impliqués uniquement *in situ*.

Il a aussi été démontré dans le cœur chez le Chien *in situ* (Miyazaki et Zipes 1990) et dans la veine saphène de Chien (Verbeuren et al. 1978) et dans le cœur chez l'Homme et le Rat (Seyfarth et al. 1993) *in vitro* que l'acidose avait un effet inhibiteur sur la libération de NA. Il a été suggéré que cette inhibition serait médiée par une inhibition de l'entrée de calcium.

Ainsi, la composition ionique du liquide interstitiel peut affecter la libération de NA. Sa libération serait inhibée lors de l'élévation de la concentration de potassium et d'hydrogène ainsi que de l'osmolarité alors qu'elle serait facilitée par l'anoxie.

Mécanismes modulateurs du spillover de noradrénaline dans les muscles squelettiques au repos et à l'exercice

Tel que mentionné précédemment, plusieurs facteurs peuvent moduler le spillover de NA. Parmi ces facteurs notons: 1) des changements dans la libération de NA dans le liquide interstitiel, 2) des variations dans la captation de NA, 3) des variations du débit sanguin, et 4) des changements dans la masse tissulaire perfusée.

Lors de l'exercice, il est bien connu que les concentrations de NA plasmatique augmentent (Béliveau 1989; Béliveau et al. 1990; Péronnet et al. 1988). Cette augmentation serait due principalement à une augmentation du spillover de NA dans les lits vasculaires des muscles squelettiques (Péronnet et al. 1988; Hasking et al. 1988). En effet, l'activité sympathique vers les muscles squelettiques actifs est

augmentée lors de l'exercice. En effet, Thompson et al. (1998) ont enregistré une augmentation dans le MSA (muscle sympathetic nerve activity) lors d'une contraction isométrique. Cette augmentation de l'activité sympathique devrait causer une augmentation de la libération de NA dans le liquide interstitiel dans ces tissus. Toutefois, plusieurs des facteurs mentionnés précédemment pourraient être impliqués dans la modulation du spillover de NA dans le muscle squelettique lors de l'exercice.

Modulation de la libération de noradrénaline

Tel que mentionné dans l'introduction, le spillover, c'est-à-dire la quantité de NA qui diffuse du liquide interstitiel à la circulation, dépend directement de la quantité de NA qui est présente dans l'interstitium puisque cela se fait par diffusion simple. Ainsi, la libération de NA par les terminaisons sympathiques va avoir un effet sur le spillover en modifiant les concentrations interstitielles. Les mécanismes modulateurs de la libération de NA ont été expliqués dans la section précédente. Dans le muscle squelettique plus particulièrement, il a été observé que la libération de NA pouvait être inhibée par certains récepteurs pré-synaptiques : α_1 - (Kahan et Hjemdahl 1987a) et α_2 -adrénergiques (Chang et al. 1994; Kahan et Hjemdahl 1987a, 1987b, 1988), au NPY (Lundberg et al. 1985b ; Pernow et al. 1988), à l'adénosine (Rongen et al. 1998), aux prostaglandines (Schwieler et al. 1994) et muscariniques (Kahan et al. 1985). Il a aussi été démontré que certains récepteurs pré-synaptiques

pouvaient faciliter la libération de NA dans le muscle squelettique, par exemple les récepteurs β_2 -adrénergiques (Chang et al. 1989; Coppes et al. 1993, 1995; Dahlof et al. 1987; Kahan et al. 1987, 1988; Stein et al. 1993), à l'angiotensine II (Chang et al. 1995; Clemson et al. 1994; Noshiro et al. 1994 ; Schwieler et al. 1991,1992 ; Shimizu et al. 1993) et à la bradykinine (Schwieler et al. 1994). De plus, plusieurs composés ioniques dans le liquide interstitiel pourraient être impliqués dans la modulation de la libération de NA dans le muscle. Par exemple, des augmentations dans la concentration de potassium (Burcher et Garlick 1975) pourraient inhiber la libération de NA alors que l'anoxie (Leuenberger et al. 1991 ; Munch et al. 1996) pourrait la faciliter.

À l'exercice, plusieurs de ces récepteurs et substances pourraient être impliqués dans la modulation de la libération de NA. Tel que mentionné auparavant, la NA inhiberait sa propre libération via les récepteurs α -adrénergiques (Chang et al. 1994 ; Kahan et Hjendahl 1987a, 1987b ; Kahan et al. 1988). Or, puisqu'une augmentation de l'activité sympathique peut être observée lors de l'exercice (Thompson et al. 1998), celle-ci pourrait causer une augmentation de la libération de NA et ainsi une stimulation des auto-récepteurs. De plus, plusieurs des substances qui sont co-libérées avec la NA peuvent aussi en inhiber la libération. Par exemple, le NPY (Lundberg et al. 1985b ; Pernow et al. 1988) et l'ATP (Koch et al. 1998 ; Kurz et al. 1993 ; Olsson et Peason 1990) pourraient inhiber la libération de NA. L'A, quant à elle, pourrait faciliter la libération de NA en stimulant les récepteurs β_2 -

adrénergiques (Chang et al. 1989 ; Coppes et al. 1993, 1995; Dahlof et al. 1987; Kahan et al. 1987, 1988 ; Stein et al. 1993). Or, celle-ci peut être co-libérée avec la NA. De plus, il est bien connu que les concentrations plasmatiques d'A augmentent lors de l'exercice dues à la libération provenant des médullo-surrénales (Christensen et Galbo 1983). Celle-ci pourrait donc contribuer à augmenter les concentrations d'A dans le liquide interstitiel et ainsi faciliter la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques.

Aussi, plusieurs substances qui sont produites dans le muscle pendant la contraction pourraient affecter la libération de NA. Par exemple, il y aurait production de bradykinine dans les muscles squelettiques lors de la contraction (Blais et al. 1999 ; Pan et al. 1993 ; Stebbins et al. 1990). De plus, il a été suggéré qu'il pourrait y avoir co-libération de bradykinine avec la NA lors de la stimulation sympathique (Seyedi et al. 1997). Donc, l'augmentation des concentrations de bradykinine dans le liquide interstitiel pourrait faciliter la libération de NA lors de l'exercice par la stimulation des récepteurs pré-synaptiques B_2 à la bradykinine, comme mentionné précédemment (Schwieler et al. 1994). De plus, il a été suggéré que la production de prostaglandines augmentait lors de la contraction (Rotto et al. 1989 ; Symons et al. 1991 ; Wilson et Kapoor 1993 ; Young et Sparks 1980). Contrairement à la bradykinine, celles-ci pourraient inhiber la libération de NA (Schwieler et al. 1994). Par ailleurs, certains auteurs ont suggéré qu'il y avait production d'histamine dans le muscle squelettique pendant l'exercice (Endo et al. 1998). Celle-ci pourrait également contribuer à la modulation de la libération de NA

comme mentionné précédemment (Fuder et Muscholl 1995). Lors d'activation du système nerveux sympathique, certains auteurs ont observé une formation d'angiotensine I (Kahan et al. 1997 ; Li et Zimmerman 1991) et d'angiotensine II (Li et Zimmerman 1991 ; Schwieler et al. 1991, 1994) dans le muscle squelettique. Étant donné que l'angiotensine I peut stimuler les mêmes récepteurs que l'angiotensine II (Storgaard et Nedergaard 1997), l'angiotensine, I et II, formée lors de la contraction, pourrait faciliter la libération de NA (Chang et al. 1995; Clemson et al. 1994 ; Noshiro et al. 1994 ; Schwieler et al. 1991,1992 ; Shimizu et al. 1993). Ainsi, plusieurs substances co-libérées ou produites lors de la contraction musculaire peuvent inhiber ou faciliter la libération de NA. Toutefois, la contribution physiologique de chacune de ces substances n'a pas encore été étudiée lors de l'exercice.

La composition ionique du liquide interstitiel est modifiée lors de l'exercice (pour revue voir Lash 1996) ce qui pourrait affecter la libération de NA. Par exemple, la libération de NA pourrait être inhibée par le potassium (Lorenz et Vanhoutte 1975) libéré par les fibres musculaires lors de leur dépolarisation. De façon générale, les concentrations de potassium dans le muscle augmentent lors de l'exercice (Bystrom et Sjogaard 1991; Juel et al. 1990, 1999; Lindinger et Sjogaard 1991; Sahlin et Broberg 1989; Sjogaard et al. 1985). Étant donné que les concentrations de potassium varient selon l'intensité de l'exercice, l'inhibition de la libération de NA dépendrait probablement aussi de l'intensité (Lindinger et Sjogaard 1991). Les concentrations d'hydrogène pourraient aussi affecter la libération de NA

pendant la contraction musculaire. En effet, les concentrations d'hydrogène augmentent dans le muscle lors de la contraction (Scott et al. 1970; Radawski et al. 1975; Tominaga et al. 1973) probablement dues à une augmentation du métabolisme anaérobie. L'acidose produite pourrait ainsi inhiber la libération de NA (Seyfarth et al. 1993; Verbeuren et al. 1978). Par contre, comme l'acidose inhibe aussi la captation de NA (Verbeuren et al. 1978), il est possible que le spillover ne soit pas modifié par ce facteur.

Compte tenu de l'augmentation des concentrations de plusieurs ions et de sous-produits métaboliques lors de la contraction musculaire, l'osmolarité dans le liquide interstitiel augmente (Scott et al. 1970; Skinner et Costin 1971; Radawski et al. 1975; Tominaga et al. 1973). Cette hyperosmolarité pourrait inhiber la libération de NA (McGrath et Shepherd 1976).

L'état d'oxygénation du tissu pourrait aussi affecter la libération de NA. En effet, il semblerait que dans des conditions d'anoxie, la libération de NA serait facilitée (Leuenberger et al. 1991; Munch et al. 1996; Seyfarth et al. 1993). Une baisse de la PO_2 (pression partielle d'oxygène) veineuse est souvent observée lors de l'exercice (Scott et al. 1970; Skinner et Costin 1971; Tominaga et al. 1973; Young et Sparks 1980). Toutefois, la PO_2 tissulaire serait ramenée aux valeurs de repos après deux à trois minutes de contraction musculaire (Boegehold et Bohlen 1988; Lash et Bohlen 1987; Proctor et Bohlen 1981). Ceci suggère que si la PO_2 est impliquée dans la modulation de la libération de NA lors de la contraction musculaire son effet serait transitoire.

Donc, lors de l'exercice, la libération de NA pour être inhibée par la NA, le NPY, l'ATP, l'adénosine, les prostaglandines, l'histamine, le potassium, l'hyperosmolarité et l'acidose, alors qu'elle pourrait être facilitée par l'A, la bradykinine, l'angiotensine et l'anoxie. Ainsi, plusieurs substances peuvent contribuer à la modulation de la libération de NA lors de la contraction musculaire. Toutefois, étant donné qu'une augmentation du spillover de NA et de l'activité sympathique est observée lors de l'exercice, il est possible d'assumer que la libération de NA serait également augmentée. Donc, les facteurs facilitateurs auraient probablement un effet plus important sur la libération de NA que les facteurs inhibiteurs.

Variation dans la captation de noradrénaline

Étant donné que la captation de NA par les terminaisons sympathiques, l'uptake-1, et les tissus effecteurs, l'uptake-2, diminue la concentration de NA dans le liquide interstitiel, elle pourrait causer une baisse du spillover de NA. Le premier mécanisme consiste en une captation par les terminaisons sympathiques, par le biais d'un transporteur actif lié au sodium ainsi qu'à la pompe sodique-potassique (Chang et al. 1987). L'uptake-1 dépendrait peu du métabolisme énergétique et ainsi, ne serait pas affecté par l'anoxie ou par une inhibition du métabolisme glycolytique ou aérobie. Toutefois à long terme ou si la glycolyse et le métabolisme aérobie sont inhibés simultanément ces conditions peuvent inhiber l'uptake-1 (Iversen 1975). Il a

aussi été suggéré que l'uptake-1 serait sensible à la température; par exemple à 0°C ce mécanisme ne fonctionne approximativement qu'à 7% du taux à 37°C (Iversen 1975). De plus, certains auteurs ont suggéré que l'uptake-1 pourrait être inhibé par les composés nitrés (Kaye et al. 1997). Lors de la contraction musculaire, il y aurait production de NO (oxyde nitrique) et de ses dérivés (Duffy et al. 1999). Ceux-ci pourraient donc inhiber l'uptake-1 de la NA (Kaye et al. 1997) et ainsi contribuer à l'augmentation du spillover de NA dans les régions vasculaires du muscle squelettique lors de l'exercice.

Quant au deuxième mécanisme, il consiste en la captation extraneuronale, c'est-à-dire par les tissus effecteurs, de la NA. L'uptake-2, contrairement à l'uptake-1, semble varier selon le tissu et l'espèce (Osswald et Guimaraes 1983). Ceci serait dû au fait que l'accumulation de catécholamines dépend du nombre de sites à uptake-2 et de la capacité des mécanismes de catabolisme de la NA dans les différents tissus (Iversen 1975). Comme l'uptake-1, l'uptake-2 semble dépendre de la température ainsi que de la concentration de sodium (Gillespie et Towart 1973). L'existence d'un troisième mécanisme de captation, l'uptake-3, a été suggérée. Ce serait un processus non-spécifique de captation dans le liquide interstitiel (Chang et al. 1991).

Dans des conditions *in vivo*, il est difficile de mesurer les variations de la captation de NA. Ainsi, il est estimé que le pourcentage d'extraction de NA, c'est-à-dire la quantité de NA qui est prise de la circulation, dépend de la captation de NA par les terminaisons sympathiques et les tissus effecteurs. Il est à noter que le pourcentage d'extraction de NA est semblable à celui de l'A dans le muscle

squelettique (Brown et al. 1981; Kahan et al. 1984). Il a été démontré que l'extraction de NA serait inhibée par l'acidose (Verbeuren et al. 1978). Lors de l'exercice, une augmentation des concentrations d'hydrogène peut être observée dans le muscle (Scott et al. 1970; Radawski et al. 1975; Tominaga et al. 1973). Celle-ci est probablement due à une augmentation du métabolisme anaérobie qui stimule la production d'acide lactique. L'acidose observée dans le muscle squelettique lors de l'exercice pourrait donc inhiber l'extraction de NA et ainsi faciliter son spillover.

De plus, il semble exister une relation inversement proportionnelle entre l'extraction de NA et le débit sanguin (Grossman et al. 1991). Il a été suggéré que lorsque le débit sanguin augmente, le temps de transit de la NA dans les capillaires est diminué et ainsi, moins de NA peut diffuser vers les tissus adjacents (Chang et al. 1991; Grossman et al. 1991). Lors d'un exercice, on peut observer une baisse du pourcentage d'extraction d'A dans le muscle squelettique (Péronnet et al. 1988; Savard et al. 1987). Il a été suggéré que cette baisse pourrait être attribuée à la hausse du débit sanguin qui est observée lors de l'exercice (Péronnet et al. 1988).

Ainsi, l'extraction de la NA pourrait être inhibée par l'acidose et le débit sanguin. De plus, vu leurs effets sur la captation de NA, l'extraction pourrait aussi être inhibée par une baisse de la concentration de sodium, de la température et du métabolisme local du tissu et une hausse du NO et de ses dérivés. Lors de l'exercice, l'acidose et la hausse du débit sanguin observées dans le muscle pourraient donc causer une baisse du pourcentage d'extraction et ainsi contribuer à augmenter le

spillover de NA. De plus, l'augmentation de la production de NO et de ses dérivés pourrait également contribuer à ce phénomène.

Variations de débit sanguin

Une facilitation du spillover de NA par le débit sanguin peut être observée dans le muscle squelettique chez l'Homme (Chang et al. 1991, 1994; Grossman et al. 1991) et chez le Chien (Zimmerman et Whitmore 1967). Chang et al. (1991) ont observé une hausse du spillover de NA de 18 à 35 pmol/min en augmentant le débit sanguin dans l'avant-bras de 86%, soit de 3,7 à 6,9 ml/dl/min, chez l'Homme. Grossman et al. (1991) ont observé une augmentation similaire, c'est-à-dire un spillover passant de 4,4 à 7,6 ng/min, en augmentant le débit sanguin dans l'avant-bras de 112% (de 6,01 à 12,76 ml/dl/min) chez l'Homme. Également, Chang et al. (1994) ont observé une augmentation de 67% du spillover de NA avec une augmentation de 112% du débit sanguin dans l'avant-bras chez l'Homme. Zimmerman et Whitmore (1967) ont aussi observé une hausse du spillover lors d'une augmentation de 100% (de 8,57 à 17,14 ml/min) du débit sanguin dans le muscle gracilis chez le Chien. Ces auteurs ont suggéré que l'augmentation du spillover de NA observée serait causée par un plus grand lavage de NA du liquide interstitiel résultant en un taux de captation diminué. Par contre, Kahan et al. (1985) ont démontré qu'une réduction du débit sanguin de 26% (de 4,7 à 3,5 ml/min/100g) n'avait pas d'effet sur la libération de [³H]-NA chez le Chien dans le muscle gracilis.

Il est possible que cette variation du débit ne soit pas suffisante pour induire les différences qui ont été observées par les autres auteurs. En effet, il est possible qu'afin d'affecter le spillover de NA par des variations du débit sanguin, ce dernier doive dépasser un seuil de changement. Malgré ces divergences de la littérature, le débit semblerait avoir un effet sur le spillover de NA au-dessus d'un certain seuil.

Il est possible que, lors de l'activité physique, l'accroissement du débit sanguin vers les muscles actifs (Achike et Ballard 1993) cause une augmentation du spillover de NA (Chang et al. 1991, 1994; Grossman et al. 1991; Zimmerman et Whitmore 1967). Toutefois, Savard et al. (1989) ont observé une augmentation du spillover de NA alors qu'il n'y avait aucun changement dans le débit sanguin dans les extenseurs du genou chez l'Homme à l'exercice. Ainsi, si le débit sanguin est impliqué dans l'augmentation du spillover lors de l'exercice, il ne serait pas l'unique facteur.

Variations de la masse tissulaire perfusée

Afin de perfuser les muscles squelettiques au repos, il y a ouverture périodique de seulement 25% des capillaires (Guyton 1991). Il existe des variations dans la quantité de tissus perfusés dépendamment des conditions. Par exemple, à l'exercice, en plus d'une hausse du débit sanguin, il y a dilatation de capillaires additionnelles. Il a été suggéré que ceci pourrait être causé par une augmentation de l'activité des fibres motrices (Segal et Kurjiaka 1995). En effet, l'Ach libérée par les

terminaisons nerveuses de la plaque motrice causerait une vasodilatation des capillaires à proximité. Ceci augmenterait la masse tissulaire perfusée et donc, une plus grande surface qui pourrait participer au spillover de NA.

Sommaire des mécanismes modulateurs du spillover de noradrénaline à l'exercice

Ainsi, lors de la contraction musculaire, plusieurs facteurs peuvent inhiber- la NA, le NPY, l'ATP, l'adénosine, les prostaglandines, l'histamine, le potassium, l'hyperosmolarité- et faciliter- la masse tissulaire perfusée, le débit sanguin, l'A, la bradykinine, l'angiotensine, le NO et ses dérivés et l'anoxie- la libération de NA (Figure 2). Toutefois, malgré la grande quantité de facteurs inhibiteurs, l'effet observé lors d'un exercice est une augmentation du spillover de NA. De plus, il est possible que certains des mécanismes suggérés n'aient pas d'implication physiologique importante dans la modulation du spillover de NA. Par exemple, quoi que l'acidose puisse inhiber la libération de NA, elle peut également faciliter sa captation. Il est donc possible que l'acidose ne contribue pas significativement à la modulation du spillover de NA. De plus, il a été suggéré que la facilitation par la bradykinine et l'angiotensine serait due à un dérèglement de l'auto-inhibition α_2 -adrénergique médiée par une protéine $G_{i/o}$ (Cox et al. 2000). Ainsi, il est probable que ces facteurs enfreignent l'auto-inhibition de la NA sur sa libération.

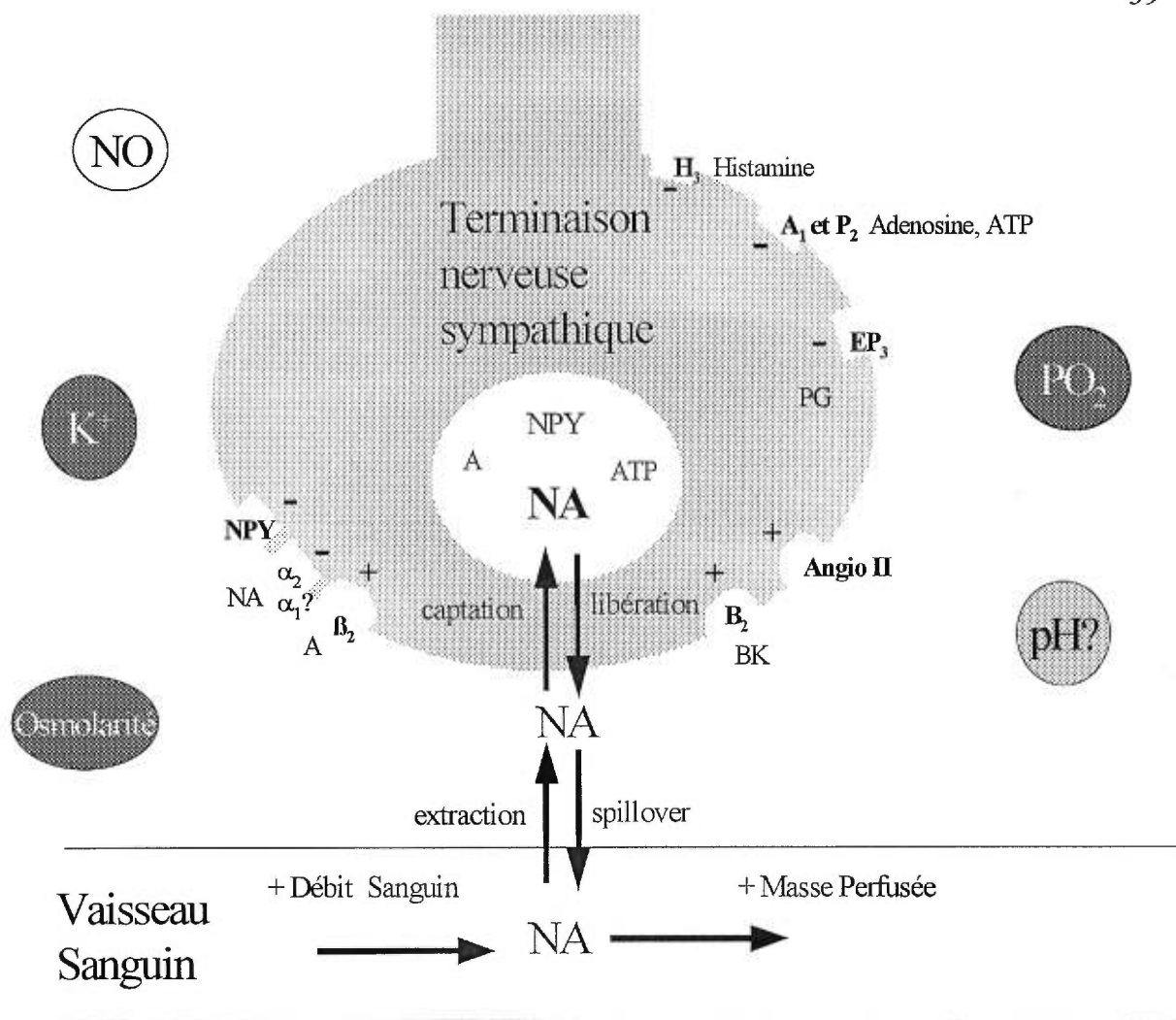


Figure 2. Représentation schématique des effets modulateurs possibles du spillover de NA lors de la contraction musculaire. Les effets inhibiteurs (- ou cercle gris foncé) et les effets facilitateurs (+ ou cercle blanc) sont représentés. Le pH est en gris pâle parce qu'il pourrait avoir des effets facilitateurs et inhibiteurs sur le spillover. Les récepteurs sont en caractères gras et leurs ligands en caractères standards. PG, prostaglandine; NPY, neuropeptide Y; NA, noradrénaline; A, adrénaline; BK, bradykinine; Angio II, angiotensine II; NO, oxyde nitrique et ses dérivés. Pour plus d'explication, voir texte.

Sites d'action des catécholamines libérées par les terminaisons sympathiques

Comme mentionné dans l'introduction, suite à sa libération ou à sa mise en circulation et à sa diffusion dans d'autres tissus, la NA peut s'attacher à des récepteurs post-jonctionnels afin d'exercer ses effets. Ces récepteurs peuvent être de type β - et α -adrénergiques. Les différents récepteurs adrénergiques modulent des processus physiologiques différents en contrôlant la synthèse ou la libération d'une variété de seconds messagers.

Récepteurs α -adrénergiques

Les récepteurs α -adrénergiques sont séparés en deux familles : les α_1 et les α_2 . Initialement, les récepteurs α -adrénergiques avaient été identifiés comme étant des récepteurs situés sur le muscle lisse, c'est-à-dire post-jonctionnels (Ahlquist 1948). Toutefois, une distinction parmi les sous-types de ces récepteurs a été faite lorsque certains ont observé une inhibition de la libération de NA par la NA elle-même et par d'autres agonistes α -adrénergiques (Starke 1987). En effet, lors de la stimulation des terminaisons sympathiques, la présence d'un antagoniste α -adrénergique facilite la libération de NA. Cet effet inhibiteur de la NA sur sa propre libération est médié par des récepteurs α distincts des récepteurs α -adrénergiques post-synaptiques classiques. Ces récepteurs pré-synaptiques ont été désignés α_2 par

opposition aux récepteurs post-synaptiques α_1 (Langer et Lehmann 1988). Alors qu'il existe peu d'évidences pour un effet pré-synaptique des récepteurs α_1 , il est maintenant clair que les récepteurs α_2 sont aussi présents post-jonctionnellement dans plusieurs tissus (Lefkowitz et al. 1996). Ainsi, le concept anatomique des récepteurs pré-synaptiques α_2 et des récepteurs post-synaptiques α_1 a été abandonné pour une classification plus fonctionnelle et pharmacologique (Tableau 1). Il existe une certaine hétérogénéité parmi les deux classes de récepteurs α -adrénergiques (pour revue voir Docherty 1998). En effet, on retrouve trois sous-types des récepteurs α_1 , les α_{1A} , α_{1B} , et α_{1D} , et trois sous-types des α_2 , les α_{2A} , α_{2B} et α_{2C} . Un quatrième sous-type du récepteur α_1 , le α_{1L} , a été suggéré mais n'est pas encore bien caractérisé (Docherty 1998). Il a été suggéré que le sous-type α_{2A} serait le principal auto-récepteur pré-synaptique quoi qu'on peut retrouver l' α_{2C} aussi (Docherty 1998).

Récepteurs β -adrénergiques

Initialement, les récepteurs β -adrénergiques avaient été subdivisés en deux sous-types : les β_1 , ceux situés dans le cœur, et les β_2 , situés dans le muscle lisse et la plupart des autres sites (Lands et al. 1967). Les récepteurs avaient été séparés ainsi parce que l'A et la NA avaient une efficacité équivalente sur les récepteurs situés dans le cœur alors que l'A stimulait de 10 à 50 fois plus que la NA les récepteurs situés dans les autres tissus (Lands et al. 1967). Plus tard, un gène humain encodant

un troisième récepteur β -adrénergique, le β_3 , a été isolé (Emorine et al. 1989; Granneman et al. 1993). Étant donné que ce récepteur β est approximativement 10 fois plus sensible à la NA qu'à l'A et qu'il est relativement résistant au blocage par des antagonistes comme le propranolol, il a été suggéré qu'il pourrait médier la réponse des catécholamines à des sites avec des caractéristiques pharmacologiques «atypiques» (Lefkowitz et al. 1996). Les effets des différents récepteurs β -adrénergiques varient selon leur distribution tissulaire (Tableau 1). Par exemple, les récepteurs β_1 -adrénergiques sont prédominants dans le cœur alors les β_2 le sont dans le muscle lisse des voies respiratoires et les β_3 dans le tissu adipeux brun et blanc (Strosberg 1997). Il a aussi été suggéré que les récepteurs β_3 -adrénergiques sont présents dans les vaisseaux sanguins de la peau (Berlan et al. 1994; Shen et al. 1994), des poumons (Dumas et al. 1998; Tagaya et al. 1999) et du tissu adipeux (Shen et al. 1994; Takahashi et al. 1992) où ils causeraient une vasodilatation, dans les muqueuses gastro-intestinales où ils inhiberaient la sécrétion gastrique (Canfield et Abdul-Ghaffar 1992; Canfield et Paskeva 1992; Coruzzi et al. 1997) et dans le cœur où ils auraient un effet inotrope négatif (pour revue Kaumann et Molenaar 1997).

Aussi, l'existence d'un quatrième récepteur β -adrénergique, le β_4 , a été suggérée. Celui-ci aurait des effets inotropes et chronotropes positifs sur le cœur (pour revues voir Kaumann et Molenaar 1997; Molenaar et al. 1997) et stimulerait la lipolyse dans le tissu adipeux brun et blanc (Deng et al. 1996; Galitzky et al. 1997; Preitner et al. 1998). Toutefois, certains auteurs ont récemment suggéré que l'effet

Tableau I. Caractéristiques des sous-types des récepteurs adrénergiques

Récepteur	Agonistes	Antagonistes	Tissus	Réponses
α_1	A \geq NA \gg Iso Phenylephrine	Prazosin	Muscle lisse vasculaire	Contraction
			Muscle lisse génito-urinaire Foie Muscle lisse intestinal Cœur	Contraction Glycogénolyse, gluconéogénèse Hyperpolarisation et relaxation \uparrow Inotropie, arythmies
α_2	A \geq NA \gg Iso Clonidine	Yohimbine	Îlots pancréatiques (cellule β) Plaquettes Terminaisons nerveuses Muscle lisse vasculaire	\downarrow de la sécrétion d'insuline Agrégation \downarrow de la libération de NA Contraction
			Cœur	\uparrow Chronotropie et inotropie, \uparrow vitesse de conduction du nœud AV
β_1	Iso $>$ A = NA Dobutamine	Metoprolol CGP 20712A	Cellules juxta-Glomérulaires	\uparrow sécrétion de rénine
			Muscle lisse (vasculaire, bronchial, gastro-intestinal et génito-urinaire) Muscle squelettique Foie	Relaxation Glycogénolyse, captation de K^+ Glycogénolyse, gluconéogénèse
β_2	Iso $>$ A \gg NA Terbutaline	ICI 118551	Muscle lisse (vasculaire, bronchial, gastro-intestinal et génito-urinaire) Muscle squelettique Foie	Relaxation Glycogénolyse, captation de K^+ Glycogénolyse, gluconéogénèse
			Tissu adipeux blanc et brun Muscle lisse gastro-intestinal	Lipolyse Relaxation

Modifié de Lefkowitz et al. (1996). Les agonistes sont non-spécifiques (A, adrénaline ; NA, noradrénaline ; Iso, isoprotérénol) en ordre d'affinité décroissante et spécifiques. AV, auriculo-ventriculaire.

lipolytique du récepteur β_4 serait plutôt dû à une interaction atypique avec le récepteur β_1 dans le tissu adipeux brun (Konkar et al. 2000). Ces auteurs ont suggéré que les effets dans le cœur attribués aux récepteurs β_4 pourraient aussi être dus à la même interaction atypique avec les récepteurs β_1 . Toutefois, ceci demeure à être déterminé.

De plus, le sous-type de certains récepteurs β -adrénergiques n'a pas encore été identifié et ces récepteurs sont classifiés atypiques. Ces récepteurs pourraient être des récepteurs adrénérgiques β_3 ou β_4 qui n'ont pas encore été identifiés ou faire partie d'une nouvelle famille de récepteurs β -adrénergiques. On a observé ces récepteurs dans différents vaisseaux sanguins, par exemple l'aorte (Brawley, et al. 2000; Oriowo 1994, 1995 ; Shafiei et Mahmoudian 1999) et la carotide (Oriowo 1994, 1995), où ils causeraient une vasodilatation, dans le duodénum (Horinouchi et Koike 1999) où ils causent une relaxation des muscles lisses et dans le muscle squelettique où ils auraient des effets métaboliques (Abe et al. 1993; Chaliss et al. 1988 ; Liu et al. 1996; Liu et Stock 1995 ; Tanishita et al. 1997).

Effets des récepteurs adrénérgiques dans le muscle squelettique

La stimulation des récepteurs adrénérgiques dans le muscle squelettique peut avoir plusieurs effets dépendamment du type et de la densité des récepteurs présents, ainsi que de la durée de stimulation. Les récepteurs adrénérgiques dans le muscle

squelettique sont du type β . La densité de ces récepteurs ainsi que la proportion des différents sous-types semblent varier selon le type de muscle.

Plusieurs auteurs ont observé qu'il y avait une plus grande densité de récepteurs β -adrénergiques dans les muscles squelettiques lents (contenant surtout des fibres lentes oxydatives) par rapport aux muscles rapides (contenant surtout des fibres rapides glycolytiques) (Buckenmeyer et al. 1990; Fell et al. 1985; Jensen et al. 1995; Kim et al. 1991; Martin et al. 1989a; Plourde et al. 1993; Williams et al. 1984). Également, dans un même muscle, la densité des récepteurs β -adrénergiques serait plus grande dans les fibres lentes par rapport aux fibres rapides chez l'Homme (Martin et al. 1989b). De plus, l'état du muscle peut avoir un effet sur la densité des récepteurs β -adrénergiques. Par exemple, avec l'entraînement (Buckenmeyer et al. 1990; Plourde et al. 1993 ; Svedenhag et al. 1984) ou la stimulation électrique (Kraus et al. 1989; Young et al. 2000), il semble y avoir une augmentation de la densité des récepteurs β -adrénergiques dans le muscle squelettique, cet effet étant aussi plus important dans le muscle lent par rapport au muscle rapide.

Dans le muscle squelettique on retrouve surtout les récepteurs adrénergiques β_2 et β -atypiques. Alors qu'on peut retrouver les récepteurs β_2 -adrénergiques dans tous les types de muscles (Elfellah et Reid 1989; Ijzerman et al. 1984; Kim et al. 1991; Liggett et al. 1988; Minneman et al. 1979; Rothwell et al. 1987; Sillence et al. 1991; Sillence et Matthews 1994; Thomas et Liggett 1993; Thurlby et Ellis 1986; Williams et al. 1984) les récepteurs β -atypiques seraient surtout présents dans les muscles lents (Abe et al. 1993; Chaliss et al. 1988; Kim et al. 1991; Liggett et al.

1988; Liu et al. 1996; Liu et Stock 1995; Martin et al. 1989a; Molenaar et al. 1991; Moore et al. 1990, 1991; Roberts et al. 1993 ; Sillence et Matthews 1994). La présence de récepteurs β_1 a aussi été observée en faible quantité dans certains muscles lents (Jensen et al. 1995; Kim et al. 1991; McNeel et Mersmann 1999; Rothwell et al. 1987; Sillence et Matthews 1994) alors que d'autres n'en ont pas observé (Sillence et al. 1991, 1993). La présence de récepteurs β_3 a aussi été suggérée (Emorine et al. 1989; McNeel et Mersmann 1999; Sillence et al. 1993; Summers et al. 1995). Toutefois, dans l'étude de Sillence et al. (1993) les valeurs de pK peu élevées lors de la liaison avec l'agoniste β -adrénergique ne correspondaient pas à ce qui est normalement retrouvé pour les récepteurs β_3 -adrénergiques. Ainsi, l'identité des récepteurs atypiques dans le muscle squelettique observés par ces auteurs n'est peut être pas β_3 -adrénergique. Aussi, certains auteurs ont suggéré que le récepteur atypique dans le muscle squelettique n'était pas de sous-type β_3 (Boss et al. 1999; Sillence et Matthews 1994). De plus, aucun ARNm (acide ribonucléique messenger) pour les récepteurs β_3 -adrénergiques n'a été détecté dans le muscle squelettique chez l'Homme (Krief et al. 1993; Thomas et Liggett 1993), chez la Souris (Boss et al. 1999) et chez le Rat (Granneman et al. 1991; Liu et al. 1998). Lorsque détecté chez le Rat, il semblerait relié à la présence de tissus adipeux dans le muscle plutôt qu'à leur présence sur les fibres musculaires (Evans et al. 1996). Les récepteurs β_1 - et β_3 -adrénergiques qui ont été mesurés dans le muscle squelettique pourraient être présents sur les terminaisons nerveuses, les vaisseaux sanguins ou d'autres types de cellules plutôt que sur les fibres musculaires puisque la densité est

mesurée dans un homogénat du muscle. Toutefois, il est également possible que, dû à la faible quantité de ces récepteurs dans le muscle squelettique, les effets ou la présence de ces récepteurs ne soient pas toujours détectés.

Effets aigus de la stimulation β -adrénergique

Les agonistes β -adrénergiques peuvent avoir des effets sur le métabolisme, les propriétés contractiles et le transport ionique dans le muscle squelettique. Par exemple, il a été observé que la stimulation des récepteurs β -adrénergiques pouvait augmenter la formation de lactate (Chaliss et al. 1988; MacLennan et Edwards 1989; Niklasson et al. 1998; Richter et al. 1982; Stainsby et al. 1987) et diminuer la synthèse du glycogène (Bowman 1981; Chaliss et al. 1984, 1988; MacLennan et Edwards 1989, 1992; Richter et al. 1982; Williams et Barnes 1989). Cette stimulation de la glycolyse semble plus élevée dans les muscles rapides à de basse fréquence de stimulation alors que les muscles lents semblent plus stimulés lorsqu'on augmente la fréquence (pour revue voir Kim et Sainz 1992). Ainsi, la stimulation de la glycolyse par les agonistes β -adrénergiques varierait selon type de muscle et la fréquence de stimulation. La régulation du métabolisme du glucose dans le muscle squelettique par les différents récepteurs β -adrénergiques s'oppose : alors que les agonistes β_2 inhibent l'utilisation (Liu et Stock 1995) et la captation de glucose (Boss et al. 1999; Chiasson, et al. 1981; Deibert et DeFronzo 1980; Niklasson et al. 1998), les agonistes β -atypiques (β_3 ?) les facilitent (Abe et al. 1993 ;

Liu et al. 1996; Liu et Stock 1995 ; Tanishita et al. 1997). Il n'a pas encore été déterminé si ces effets sur l'utilisation du glucose sont dus à des variations dans la mise en réserve sous forme de glycogène ou dans l'oxydation du glucose, par exemple lors de la thermogénèse. Les récepteurs β_2 -adrénergiques peuvent aussi stimuler la lipolyse (Gorski 1992; Hagstrom-Toft et al. 1997,1998 ; Stankiewicz-Choroszuca et Gorski 1978). Les récepteurs β -adrénergiques pourraient aussi inhiber la protéolyse (Kadowaki et al. 1996; Li et Jefferson 1977; Miles et al. 1984 ; Nie et al. 1989). Toutefois, il a aussi été observé que la stimulation des récepteurs β -adrénergiques pouvait diminuer la synthèse et la libération des acides aminés (Garber et al. 1976). Ainsi, l'effet sur le métabolisme des protéines est controversé. Donc, les récepteurs β -adrénergiques stimuleraient la dégradation des substrats énergétiques, plus particulièrement le glycogène et les lipides alors qu'il inhiberait la dégradation des protéines.

La stimulation des récepteurs β -adrénergiques du muscle squelettique pourrait augmenter la thermogénèse (Astrup et al. 1985; Granata et al. 1970; Grubb et Folk, 1976, 1977; Jansky et Hart 1963; Lundholm et Svedmyr 1965; Mejsnar et al. 1980 ; Mejsnar et Pacha 1983; Schmitt et al. 1973; Thurlby et Ellis 1986). Puisque des agonistes β -atypiques pouvaient stimuler cette thermogénèse, il a été suggéré que les récepteurs β -atypiques étaient impliqués dans cet effet. Certains auteurs ont suggéré que la stimulation de la thermogénèse par les récepteurs β -adrénergiques pourrait être due à une augmentation de l'expression de la protéine découplante (uncoupling protein) dans le muscle squelettique (Boss et al. 1999; Emilsson et al. 1998).

La stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques du muscle squelettique pourrait avoir des effets sur les propriétés contractiles. Par exemple, ils pourraient augmenter la force tétanique (Bowman et Raper 1964; Cairns et Dulhunty 1993a, 1993b, 1994; Cairns et al. 1993; Clausen et Flatman 1980; Gonzales-Serratos et Valle-Aguilera 1981; Oota, et Nagai 1977; Rang et Dale 1993) et de la secousse (Cairns et Dulhunty 1993b). Toutefois, certains auteurs ont suggéré que ces réponses seraient spécifiques à certains types de muscles. Ainsi, la stimulation aiguë des récepteurs β_2 -adrénergiques causerait une augmentation de la force contractile de la secousse ainsi que de la force des contractions évoquées par des trains de stimulation sous-tétaniques du muscle squelettique rapide alors qu'elle ne changerait pas ou diminuerait les forces contractiles dans le muscle lent (pour revue voir Bowman 1981). Il a été suggéré que ces différences pourraient être dues à l'utilisation de différentes concentrations d'agonistes β -adrénergiques. En effet, Cairns et Dulhunty (1993b) ont observé dans le soléaire, un muscle lent, une baisse initiale de la force suivie d'une augmentation avec l'utilisation de faibles concentrations de terbutaline (0.1 μM), un agoniste β_2 -adrénergique, alors que cette baisse initiale était absente à une plus forte concentration (10 μM). Ces auteurs ont suggéré que la réponse aux agonistes β_2 -adrénergiques serait biphasique qui causerait une baisse suivi d'une augmentation de la force. Cette baisse de la force pourrait être stimulée par des faibles concentrations d'AMPc causées par une faible stimulation β_2 -adrénergiques. Une diminution de la fatigue musculaire pourrait aussi être observée lors de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques (Cairns et

Dulhunty 1994 ; Juel 1988). Il a été suggéré que ces effets sur la force et la fatigue seraient dus à une facilitation du couplage excitation-contraction qui ne serait pas médiée par un changement du potentiel d'action via la pompe sodique potassique (Cairns et Dulhunty 1993a, 1994 ; Cairns et al. 1993). Les résultats de Cairns et collègues (1993a, 1994, 1993) suggèrent plutôt que la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques pourrait augmenter la libération de calcium provenant du réticulum sarcoplasmique (Prakash et al. 1999). Une augmentation du temps contractile et du demi-temps de relaxation pourrait être observée dans le muscle rapide alors que dans le muscle lent ceux-ci sont diminués (pour revue voir Bowman 1981). La diminution des temps dans le muscle lent pourrait être due à une accélération de la captation du calcium par le réticulum sarcoplasmique. Ceci pourrait être causé par la phosphorylation du phospholamban (Jorgensen et Jones 1986 ; Tada et al. 1988), par une kinase reliée à l'AMPc (Kirchberger et Tada 1976 ; Salviati et al. 1982). Dans le muscle rapide, l'accumulation de métabolites due à la stimulation de la glycolyse pourrait contribuer à l'augmentation des temps contractiles observée. Les agonistes β_2 -adrénergiques pourraient également causer un tremblement au niveau des extrémités (pour revue voir Bowman 1981). Il est bien connu que l'activité musculaire normale cause des tremblements (Thiringer et Svedmyr 1975). Les agonistes β_2 -adrénergiques augmenteraient l'amplitude de ceux-ci (Kendall et Haffner 1993). Ces auteurs ont suggéré que l'augmentation de la sensibilité des fuseaux musculaire pourrait contribuer à cet effet. Il est possible que les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la force et de la secousse par la

stimulation β -adrénergique contribueraient aux tremblements observés. Ainsi, l'augmentation de la libération de calcium provenant du réticulum sarcoplasmique lors de la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques (Prakash et al. 1999) pourrait augmenter la force des tremblements. Les agonistes β_2 -adrénergiques pourraient aussi causer des spasmes musculaires (pour revue voir Kendall et Haffner 1993).

La stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques peut amener une hyperpolarisation du potentiel membranaire. Ceci semble être dû à la stimulation de la pompe sodique-potassique par l'AMPc (Atrakchi et al. 1989 ; Clausen 1986 ; Clausen et Flatman 1977, 1980 ; Everts et al. 1988 ; Juel 1988 ; Li et Sperelakis 1993 ; Pflieger et al. 1983). De plus, il a été suggéré que la stimulation de la pompe sodique-potassique par les récepteurs β_2 -adrénergiques pourrait être due à une augmentation de la sensibilité de la pompe au sodium (Clausen et Flatman 1977, 1980 ; Ellingsene et al. 1987, 1989). Toutefois, cet effet des récepteurs β -adrénergiques semble être perdu dans les muscles actifs probablement dû à une activation déjà maximale de la pompe sodique-potassique (Everts et al. 1988 ; Rolett et al. 1990). Certains auteurs ont aussi suggéré que cette hyperpolarisation pourrait être due à une augmentation de la perméabilité au potassium (van Mil et al. 1995) et à une augmentation de la captation du potassium par le muscle squelettique (pour revue voir Bowman 1981). L'hyperpolarisation de la membrane empêche l'augmentation du potentiel membranaire et ainsi l'excitation.

Effets Chroniques de la stimulation β -adrénergique

Il est bien connu que l'administration chronique d'agonistes β_2 -adrénergiques cause une hypertrophie musculaire qui est plus prononcée dans les muscles rapides que dans les muscles lents (pour revue voir Kim et Sainz 1992). Ainsi, on peut observer une augmentation du diamètre des fibres rapides glycolytiques et oxydatives alors que les résultats obtenus pour les fibres lentes sont controversés. En effet, alors que certaines études n'ont rapporté aucun effet des agonistes β_2 -adrénergiques sur la grosseur des fibres lentes (Kim et al. 1987 ; Maltin et al. 1990 ; Miller et al. 1988 ; Zeman et al. 1988), d'autres ont observé une hypertrophie équivalente (Beermann et al. 1987; Maltin et al. 1986) ou plus petite (Kim et al. 1988 ; Vestergaard et al. 1994) des fibres lentes par rapport aux fibres rapides. Il a été suggéré que l'hypertrophie musculaire observée suite à l'administration chronique d'agonistes β_2 -adrénergiques serait due à une augmentation de la synthèse et/ou à une baisse de la dégradation des protéines (pour revue voir Mersmann 1998). Toutefois, l'administration d'antagonistes ne cause pas toujours une atrophie musculaire (Benbachir-Lamrini et al. 1993 ; Murphy et al. 1997 ; Sillence et al. 1991, 1995). Ceci suggère que même si la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques cause une hypertrophie musculaire, elle ne joue pas nécessairement un rôle important dans le maintien de la masse musculaire. Le(s) mécanisme(s) d'action impliqué(s) dans l'hypertrophie musculaire associée à la stimulation chronique β -adrénergique n'ont pas encore été déterminés.

Toutefois, plusieurs études suggèrent qu'elle ne serait pas médiée par la libération de prostaglandines (Palmer et al. 1990), par des effets sur les concentrations des hormones plasmatiques, par exemple sur l'insuline, (Emery et al. 1984 ; McElligott et al. 1987), les hormones gonadiques (Rothwell et Stock 1988), l'hormone de croissance (Bates et Pell 1991 ; Bruckmaier et Blum 1992 ; Buyse et al. 1991 ; Claeys et al. 1989 ; Emery et al. 1984) et la tri-iodothyronine (Buyse et al. 1991 ; Emery et al. 1984), ni par l'entrée de calcium par les canaux calciques de type L (Murphy et al. 1999). Cette hypertrophie semble bien médiée par une stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques puisque plusieurs études ont démontré que le blocage de ces récepteurs inhibe cette réponse (Choo et al. 1992 ; MacLennan et Edwards 1989 ; Maltin et al. 1987 ; Sillence et al. 1991, 1995). Toutefois, ceci est encore controversé puisque dans les études de cellules en culture, l'AMPc, qui est un second messager des récepteurs β_2 -adrénergiques, ne stimule pas la croissance des cellules (Hordijk et al. 1994). De plus, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques ne cause pas toujours une hypertrophie des cellules (Klasing et al. 1985 ; Roeder et al. 1987).

Une transformation des fibres lentes vers les fibres rapides peut aussi être observée avec l'administration chronique d'agonistes β_2 -adrénergiques (Criswell et al. 1996 ; Fiems et al. 1993 ; Hayes et Williams 1994 ; Lynch et al. 1996 ; Maltin et al. 1986 ; Mozdziak et al. 1998 ; Vestergaard et al. 1994 ; Zeman et al. 1988). Ainsi, certains auteurs ont observé une augmentation de la synthèse et de l'accumulation des chaînes de myosine légère rapide (Zeman et al. 1988).

Également, plusieurs études ont observé un changement vers un métabolisme plus glycolytique et moins oxydatif dans le muscle squelettique avec le traitement chronique aux agonistes β -adrénergiques (Eisemann et al. 1988 ; Suzuki et al. 1997 ; Vestergaard et al. 1994). Ainsi, une augmentation de l'activité de différentes enzymes glycolytiques, par exemple le lactate déhydrogénase, et une baisse des enzymes oxydatives, comme l'hydroxyacyl-CoA déhydrogénase, le succinate déhydrogénase et le citrate synthase, ont été observées. De plus, une baisse du glycogène musculaire a aussi été observée (Maltin et al. 1990 ; Vestergaard et al. 1994). Ceci pourrait être causé par une diminution de la densité des capillaires dans le muscle qui causerait une diminution de l'apport en oxygène pour certaines fibres musculaires (Oksbjerg et al. 1994 ; Suzuki et al. 1997 ; Vestergaard et al. 1994). En effet, le nombre de capillaires dans le muscle n'est pas affecté par le traitement chronique aux agonistes β -adrénergiques et donc, l'hypertrophie musculaire amène une baisse de la densité capillaire. Il a été suggéré que la transformation des fibres lentes vers des fibres rapides pourrait contribuer à la diminution des enzymes oxydatives (Suzuki et al. 1997).

L'administration chronique d'agonistes β -adrénergiques cause une régulation négative des récepteurs β -adrénergiques (Elfellah et al. 1989 ; Hedberg et al. 1984 ; Kim et al. 1992 ; Rothwell et al. 1987 ; Sillence et al. 1991 ; Summers et al. 1995 ; Torgan et al. 1993a,1993b ; Vallieres et al. 1979) alors que les antagonistes causent une régulation positive des récepteurs (Murphy et al. 1997 ; Sillence et al. 1995). Toutefois, il semblerait que les récepteurs β -atypiques présents dans le muscle

squelettique ne se désensibiliseraient pas (Summers et al. 1995). Lorsque les récepteurs sont stimulés par un agoniste β -adrénergique il y a une phase rapide de désensibilisation (Figure 3). La désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques pourrait être causée par une phosphorylation du récepteur induite par l'agoniste. Suite à la phosphorylation du récepteur, la protéine β -arrestine s'y attacherait et ainsi empêcherait complètement l'interaction entre le récepteur et la protéine G (Chuang et al. 1996 ; Freedman et Lefkowitz 1996 ; Sterne-Marr et Benovic 1995 ; Zhang et al. 1999). De plus, l'arrestine faciliterait l'attachement du récepteur aux vésicules recouvertes de clathrin (Ferguson et al. 1996 ; Goodman et al. 1996). Ce complexe serait séquestré dans les endosomes pour permettre le retour du récepteur à la membrane lorsque l'agoniste est retiré (Ferguson et al. 1996 ; Zhang et al. 1999). En effet, il a été suggéré que l'internalisation du récepteur était nécessaire à sa resensibilisation. Dans les endosomes, une phosphatase spécifique causerait la déphosphorylation du récepteur (Krueger et al. 1997 ; Pitcher et al. 1995). Suite à la déphosphorylation, le récepteur resensibilisé est retourné à la membrane plasmique par un mécanisme inconnu. Toutefois, si la présence de l'agoniste est maintenue pour plus d'une heure, il peut y avoir translocation des récepteurs β -adrénergiques dans les lysosomes afin qu'ils soient dégradés, c'est-à-dire, la régulation négative (Lohse 1993). Quoique les mécanismes sous-jacents à cette régulation négative ne sont pas connus, il a été suggéré que la séquestration des récepteurs serait nécessaire à cet effet (Barak et al. 1995 ; Gagnon et al. 1998).

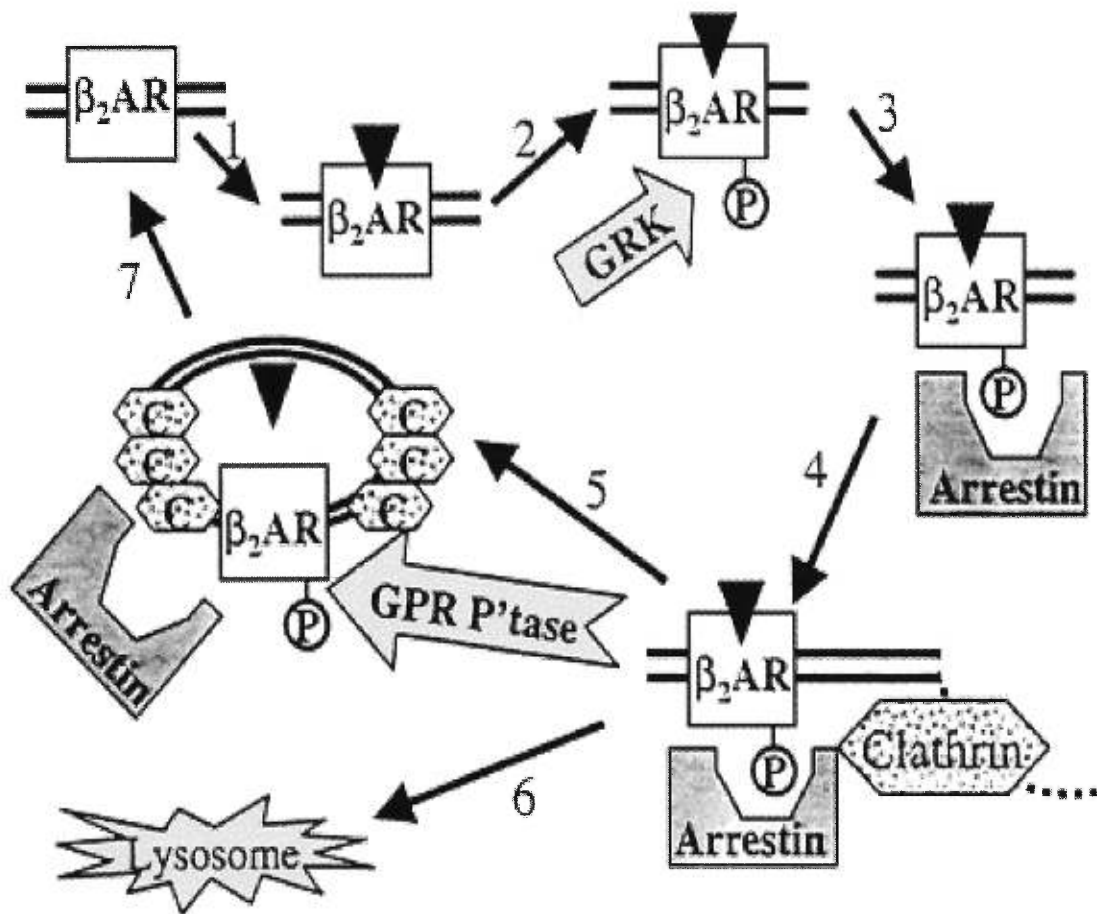


Figure 3. Modèle pour la régulation des récepteurs β_2 -adrénergiques (tirer de Bunemann et al. 1999). L'attachement de l'agoniste au récepteur (1) amène la phosphorylation du récepteur par des kinases spécifiques (GRK) (2). L'arrestine s'attache au récepteur β_2 -adrénergique phosphorylé (3) et amène le découplage de la protéine G. De plus, l'arrestine agit comme un adaptateur et amène le récepteur β_2 dans des vésicules recouvertes de clathrin (4) pour l'endocytose par les endosomes (5) ou les lysosomes (6). Dans les endosomes, l'arrestine se dissocie du récepteur et la phosphatase du récepteur couplé à une protéine G (GPR) déphosphoryle le récepteur. Ceci resensibilise le récepteur β_2 -adrénergique qui retourne alors à la membrane plasmique (7). Le ciblage du récepteur vers les lysosomes amène sa dégradation.

Objectifs et hypothèses de la thèse

Lors de l'exercice physique, une augmentation du spillover de NA total est observée. Celle-ci semble due à l'augmentation du spillover provenant des régions vasculaires du muscle squelettique. Les facteurs qui modulent le spillover de NA lors de l'exercice ne sont pas encore bien connus. Parmi ceux qui pourraient contribuer à la modulation du spillover de NA dans le muscle deux nous paraissaient particulièrement intéressants lors de la contraction : le débit sanguin et la bradykinine. Dans nos deux premières études nous nous sommes donc intéressés à leur effet sur le spillover de NA dans un modèle de muscle *in situ* lors de la contraction chez le Chien. Dans la première étude, nous avons évalué l'effet du débit sanguin, en contrôlant ce dernier à l'aide d'un circuit extra-corporel, sur le spillover de NA mesuré à l'aide de NA marquée au tritium (Chapitre 2). Il a été suggéré dans la littérature que, lors de l'exercice, l'augmentation du débit sanguin contribuerait à l'augmentation du spillover dans le muscle squelettique. Ainsi, nous avons voulu vérifier cette hypothèse de façon spécifique. Dans la deuxième étude, nous avons voulu vérifier, dans le même modèle expérimental, l'effet de la bradykinine endogène sur le spillover de NA en bloquant les récepteurs B₂ à la bradykinine avec du HOE 140 lors de la contraction (Chapitre 3). En effet, certaines études ont démontré qu'il y avait production de bradykinine dans le muscle squelettique lors de la contraction. Comme la libération de NA est facilitée par la bradykinine, nous avons voulu vérifier si celle-ci était impliquée dans la modulation de la libération de

NA lors de la contraction musculaire. De plus, il est bien connu que l'élévation chronique des concentrations de catécholamines peut causer une régulation négative des récepteurs β -adrénergiques. Toutefois, les mécanismes impliqués dans cet effet ne sont pas encore bien compris. Certaines études ont suggéré que des modifications lipidiques de certaines protéines étaient impliquées dans la localisation des récepteurs couplés aux protéines G. Donc, dans notre dernière étude, nous avons évalué l'effet d'un inhibiteur de la farnésyltransférase, le BMS 191563, sur la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques dans le muscle squelettique causée par l'administration chronique du clenbuterol, un agoniste β_2 -adrénergique, chez le Rat (Chapitre 4). L'objectif général de cette thèse est donc d'étudier la modulation du spillover de NA ainsi que certains effets potentiels de l'augmentation de cette NA sur le muscle squelettique.

Chapitre 2 : Étude 1.

Effect of blood flow and muscle contraction on noradrenaline spillover in the
canine gracilis muscle.

Julie L Lavoie, François Trudeau and Louise Béliveau.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 78: 75-80, 2000.

Résumé

Plusieurs auteurs ont rapporté une augmentation du spillover de noradrénaline et une diminution de son pourcentage d'extraction à l'exercice. Il a été suggéré que l'augmentation du débit sanguin vers les muscles actifs contribuerait à ces effets. La contraction musculaire engendre aussi plusieurs modifications qui pourraient influencer le spillover de noradrénaline et son pourcentage d'extraction. Nous avons voulu étudier l'effet de la contraction musculaire et du débit sanguin sur le spillover et le pourcentage d'extraction de noradrénaline et d'adrénaline dans le muscle gracilis *in situ* chez le Chien. L'utilisation d'un protocole de stimulation de basse intensité a permis d'obtenir des contractions musculaires sans modifications des concentrations locales de noradrénaline, telle que mesurées par microdialyse, et sans augmentation du spillover de noradrénaline. La contraction musculaire a causé une augmentation significative du pourcentage d'extraction de la noradrénaline et une augmentation non-significative du pourcentage d'extraction de l'adrénaline. Une augmentation de trois et quatre fois la valeur au repos du débit sanguin n'a eu aucun effet sur le pourcentage d'extraction de la noradrénaline et de l'adrénaline. Le spillover de noradrénaline a augmenté suite à l'augmentation du débit sanguin, de 188 à 452 $\text{pg}\cdot\text{min}^{-1}$ au repos et de 246 à 880 $\text{pg}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant la stimulation. De plus, un spillover d'adrénaline a été observé dans certains cas. Ces résultats suggèrent que le débit sanguin ne soit pas le facteur principal qui contribue à la diminution du pourcentage d'extraction pendant l'exercice. Toutefois, le débit sanguin contribuerait à

l'augmentation du spillover de noradrénaline observée dans les régions vasculaires des muscles actifs pendant l'exercice.

Mots clés : muscle squelettique, spillover, pourcentage d'extraction, stimulation, adrénaline

Abstract

Many authors have reported that, during exercise, noradrenaline spillover increases and fractional extraction decreases. It has been suggested that the increase in blood flow to active muscles may contribute to these effects. Muscle contraction also causes changes in many factors that may affect noradrenaline spillover and fractional extraction. In this experiment, we studied the effect of muscle contraction and blood flow on noradrenaline and adrenaline spillover and fractional extraction in the *in situ* canine gracilis muscle. The low intensity stimulation protocol enabled us to have muscle contractions without any effect on the local concentrations of noradrenaline, as measured by microdialysis, and noradrenaline spillover. Fractional extraction of both noradrenaline and adrenaline were unaffected by increasing blood flow three and four times its resting value. Also, noradrenaline spillover was increased by the higher blood flow, from 188 to 452 $\text{pg}\cdot\text{min}^{-1}$ at rest and from 246 to 880 $\text{pg}\cdot\text{min}^{-1}$ during stimulation. Stimulation of muscle contraction caused a significant increase in fractional extraction of noradrenaline and a non-significant increase in adrenaline extraction. In addition, an adrenaline spillover was observed in certain conditions. In light of our results, it seems that blood flow may not be the main factor decreasing fractional extraction of noradrenaline during exercise. However, blood flow could contribute to the increase in noradrenaline spillover observed in the active muscles during exercise.

Key words: skeletal muscle, spillover, fractional extraction, stimulation, adrenaline

Introduction

It is well established that plasma concentration of noradrenaline increases during exercise (Béliveau et al. 1990; Péronnet et al. 1988a). Noradrenaline is released into the interstitial fluid by the sympathetic nerve terminals located in various tissues throughout the body. Part of this noradrenaline then spills over into circulation. At rest, most of the circulating noradrenaline arises from the hepatosplanchnic vascular bed (Peronnet et al. 1988a). During exercise, several authors have reported that the enhanced noradrenaline spillover into circulation comes mainly from the vascular region of the skeletal muscles (Hasking et al. 1988; Péronnet et al. 1988a). Indeed, sympathetic nerve activity to the skeletal muscle areas is increased during exercise (Thompson et al. 1998) which should lead to an increased release of noradrenaline in the interstitial fluid. Furthermore, many substances associated with muscle contraction, such as bradykinin and neurokinin A (Persson et al. 1991; Stebbins et al, 1990), may facilitate the release of noradrenaline from nerve terminals into the interstitial fluid. This noradrenaline can then undergo uptake back into nerve terminals, attach to receptors or spillover into circulation. The variables which may influence spillover include norepinephrine concentration in the interstitial fluid and in the blood, as well as blood flow. Many factors, aside from sympathetic nerve activity, could thus contribute to the increased spillover during exercise.

At rest, it has been reported that increased blood flow facilitates noradrenaline spillover (Chang et al. 1991; Grossman et al. 1991; Zimmerman and

Whitmore 1967). Blood flow may also have an inhibitory effect on noradrenaline uptake from the circulation (Grossman et al. 1991) which could contribute to the increase in spillover. Indeed, it has been proposed that, when regional blood flow is increased, the transit time of the noradrenaline in the capillaries is shorter and therefore less noradrenaline can diffuse into the adjacent tissue (Chang et al. 1991; Grossman et al. 1991). Since blood flow increases (Achike and Ballard 1993) and it has been observed that noradrenaline uptake decreases (Péronnet et al. 1988a; Savard et al. 1987) during exercise, we hypothesized that a higher blood flow may contribute to the increase in the noradrenaline spillover in this condition.

The objective of this study was to evaluate the contributions of blood flow and muscle contraction to noradrenaline spillover using an *in situ* gracilis muscle model in the anesthetized dog. Since release increases with intensity of stimulation (Yamaguchi et al. 1975; Kahan et al. 1984), a low intensity stimulation protocol was chosen in order to have no significant effect on noradrenaline release from nerve terminals and thus to examine the effects of blood flow and muscle contraction. A microdialysis technique (Gronlund et al. 1991) was used to verify the effect of the stimulation protocol on local noradrenaline release in the interstitial fluid. A radiotracer technique (Medvedev et al. 1990) with ^3H -noradrenaline was used for determination of noradrenaline muscle spillover. The effect on adrenaline release was also examined using ^3H -adrenaline. Indeed, some authors have observed a co-release of adrenaline with noradrenaline from the heart (Péronnet et al. 1988b;

Thompson et al. 1998; Tsuda et al. 1990), the gracilis muscle (Kahan et al. 1987; Rosell et al. 1964) and the saphenous vein (Guimaraes et al. 1978).

Materials and Methods

Preparation of animals

Nine mongrel dogs, 7 males and 2 females, weighing 17 ± 2 kg were used. The study was conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (1993) after approval by the animal care committee of the Sacré-Coeur Hospital where the experiments were performed.

Animals were initially anaesthetized with thiopental ($25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and alpha-chloralose ($80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Anaesthesia was maintained throughout each experiment by alpha-chloralose ($500 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$). Animals were intubated and artificially ventilated with room air using an animal respirator (Harvard apparatus model 607, Millis, MA).

Skin electrodes were inserted in the animal in order to measure the ECG. The gracilis muscle was prepared as described by Kahan et al. (1984). Briefly, the muscle was isolated from the surrounding tissues except the supplying artery, vein and nerve. After heparinization ($300 \text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v. followed by $200 \text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ i.v.), femoral arterial blood was delivered to the gracilis muscle artery at constant flow via a silicone tubing using a peristaltic pump (Masterflex model n° 7520-35, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL.). The venous effluent was returned to the femoral vein via a catheter connected to a three-way stop-cock for venous blood sampling. The muscle blood flow was adjusted to maintain a flow of $6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100$

g^{-1} of muscle at rest. Muscle weight was estimated using dog body partition data (Vaissaire 1972). The validity of this method was verified by weighing the gracilis muscle in a subgroup of 7 animals once the experiment was finished. On average, the muscles weighed 71 g while the estimated weight was 68 g.

Systemic arterial blood pressure was monitored and arterial blood samples were obtained via a catheter in the carotid artery. The gracilis muscle perfusion pressure was measured via a side arm in the arterial loop. Blood pressures were measured by pressor transducers (model CDX3042-982, Cobe, Lakewood, CO.) and recorded on a Nihon Koden polygraph (Tokyo, Japan). Throughout the experiment, the muscle preparation was covered with warm saline compresses and a thin plastic film.

Experimental protocol

A microdialysis probe with a spectrum membrane (4 mm x 0.45 mm tip rigid loop type; Harvard Apparatus, St-Laurent, Quebec, Canada) was used in these experiments. These regenerated cellulose membranes are well characterized, with a permeability limit of 6000 daltons and absolute cutoff of 13000 daltons. The probe was inserted longitudinally in the belly of the gracilis muscle. The inlet of the microdialysis probe was connected to a microperfusion pump (Harvard Apparatus, model 940) and the dialysate was collected from the outlet of the probe into a microtube. After collection the dialysate was kept at -80°C for later analysis. A 0,9% saline solution was used as the perfusion medium and administered at a rate of $6 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, and the dialysate was collected in 10 min. fraction to allow for

catecholamine assay (Gronlund et al. 1991). The dialysate was collected at rest and then blood flow was increased to $18 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ of muscle (flow 1). The dialysate was then collected again at rest and during stimulation of muscle contraction.

After the microdialysis protocol was completed, levo N-methyl- ^3H -adrenaline ($66.8 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) and levo ^3H -2,5,6-noradrenaline ($42.1 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) (NEN Life Science products, Boston, Mass., USA) were infused into a foreleg vein using an infusion/withdrawal pump (Harvard Apparatus, model 940), as described by Esler et al. (1984). Immediately before the infusion, the infusate was prepared by diluting an aliquot of each ^3H -catecholamine (adrenaline and noradrenaline) together in 0.9% saline containing $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sodium ascorbate and $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ acetic acid. The final concentration of ^3H -labeled catecholamines in the infusate was adjusted to give an infusion rate of $90 \text{ nCi}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ for ^3H -noradrenaline and $33 \text{ nCi}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ for ^3H -adrenaline, at a fixed flow rate of $0.318 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Blood samples (6 ml) were taken simultaneously from the carotid artery and gracilis vein 60 min after the start of the radiotracer infusion. Samples were placed in tubes containing $80 \mu\text{l}$ of catecholamine preservative (EGTA, $95 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ and Glutathione, $60 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). The plasma was separated from blood cells by centrifugation and stored at -80°C for assay of catecholamines. All subsequently collected samples were treated similarly. Arterial blood was also taken for determination of hematocrit. PO_2 , PCO_2 and pH were measured in a subgroup of animals.

After baseline blood samples were taken, blood flow was increased randomly to either $18 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (flow 1) or $24 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ of muscle (flow 2). The gracilis nerve was stimulated using a model S8 stimulator (Grass Medical instruments, Quincy, Mass.) during 12 minutes (0.1 Hz, 6 V, 2 ms). Blood samples were taken before stimulation and after 11 minutes of stimulation. After a resting period of 30 minutes, this procedure was repeated with the second blood flow. The sequence in which the different steps of this experiment were done are illustrated on a time line in figure 1.

Analytical methods

For the microdialysis, noradrenaline and adrenaline concentrations in the dialysate were measured by a sensitive commercial radioenzymatic assay (Biotrax Amersham Pharmacia, Piscataway, NS; Peuler and Johnson 1977). For plasma noradrenaline and adrenaline assay, endogenous and ^3H -labeled catecholamines were extracted from plasma using alumina adsorption and separated by high performance liquid chromatography according to a method described by Medvedev et al. (1990). Briefly, the plasma catecholamines and internal standard (dihydroxybenzylamine) were adsorbed onto activated alumina, carefully rinsed, and desorbed into 200 μl of a solution of 0.04 M H_3PO_4 -0.2 M acetic acid. Timed collections of the eluant leaving the electrochemical cell allowed fractionation of ^3H -labeled catecholamines into scintillation vials for counting by liquid scintillation spectroscopy.

Data analysis and statistical methods

The fractional extraction (F_x) of ^3H -labeled noradrenaline or adrenaline across the gracilis muscle was calculated according to the formula:

$$[1] \quad F_x = (T_a - T_v) / T_a$$

where T_a is the concentration of tritiated noradrenaline or adrenaline in arterial plasma and T_v is that in gracilis vein plasma.

The gracilis spillover of noradrenaline or adrenaline into plasma ($\text{pg} \cdot \text{min}^{-1}$) was estimated according to the formula described by Esler et al. (1984):

$$[2] \quad Sp = [(F_x \cdot C_a) + (C_v - C_a)] \cdot [BF \cdot (1 - \text{Hct})]$$

where F_x is fractional extraction, C_a is the noradrenaline or adrenaline concentration in arterial plasma and C_v is that in gracilis vein plasma ($\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$), BF is the muscle blood flow ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) and Hct is the hematocrit.

All data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed by ANOVA for repeated measures. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

Results

Baseline arterial and venous concentrations of catecholamines (Table 1) and hemodynamic values (Table 2) were unaffected by the infusion of tritiated catecholamines. Stimulation and blood flow had no significant effect on dialysate, arterial and venous concentrations of catecholamines (Table 1). Dialysate

concentrations of catecholamines were not corrected for probe recovery. Hematocrit, heart rate, systemic blood pressure (BP) and gracilis perfusion pressure (GPP) remained in a normal range throughout the experiment (Table 2).

Fractional extraction of ^3H -adrenaline was unaffected by blood flow (Figure 2). However, there was a significant increase from rest to stimulation. Also, fractional extraction of ^3H -noradrenaline increased following electrical stimulation but only significantly at the highest blood flow (Figure 2).

An adrenaline spillover of $80 \pm 58 \text{ pg}\cdot\text{min}^{-1}$ with a range of $3 \text{ pg}\cdot\text{min}^{-1}$ to $232 \text{ pg}\cdot\text{min}^{-1}$ was measured. The only condition in which none of the animals showed an adrenaline spillover was at rest during flow 1. However, because of the large variations between animals it was not possible to study the effect of blood flow or muscle contraction on adrenaline spillover.

Higher blood flow increased noradrenaline spillover both at rest, from 188 to $452 \text{ pg}\cdot\text{min}^{-1}$, and during stimulation, from 244 to $880 \text{ pg}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figure 3). Electrical stimulation had no significant effect on noradrenaline spillover (Figure 3).

Discussion

The main findings in this experiment were that fractional extraction of ^3H -noradrenaline and ^3H -adrenaline were enhanced by stimulation while higher blood flow caused an increase in ^3H -noradrenaline spillover. ^3H -adrenaline spillover was also observed during stimulation and increased blood flow.

Fractional extraction of ^3H -noradrenaline and adrenaline increased from rest to stimulation. Eisenhofer et al. (1991) also observed this effect of stimulation on ^3H -noradrenaline in the canine heart. These authors suggested that the parallel increases in spillover and reuptake during sympathetic activation indicated that increased noradrenaline release by cardiac sympathetic nerves did not saturate neuronal reuptake. If reuptake increases during stimulation, this could cause an increase in the gradient between the interstitial fluid and the blood, hence, increasing fractional extraction. However, during exercise in humans, a decrease in fractional extraction of noradrenaline across skeletal muscle vascular beds is usually observed (Péronnet et al. 1988a; Savard et al. 1987). In these experiments, the authors suggested that the decrease was caused by the increase in blood flow that is observed in the active muscles during exercise. Indeed, it has been proposed that, when regional blood flow is increased, the transit time of the noradrenaline in the capillaries is shorter and therefore less noradrenaline can diffuse into the adjacent tissue (Chang et al. 1991; Grossman et al. 1991). An increase in noradrenaline release into interstitial fluid during exercise could also explain the lower diffusion of noradrenaline from the blood. In our experiments, although blood flow to the working muscle was increased, fractional extraction was not decreased. One of the possible explanations is that, since the stimulation protocol that we chose did not increase the noradrenaline concentrations in the interstitial fluid, it presumably allowed for a larger differential concentration. Another possibility would be the effect of pH on noradrenaline uptake. Indeed, Verbeuren et al. (1978) found that

acidosis inhibited uptake of noradrenaline. In our study, because of the low intensity of the chosen stimulation protocol, there was no decrease in the blood pH.

There was no significant effect of the stimulation on noradrenaline spillover. It has been reported that noradrenaline spillover is dependent of the intensity and the duration of exercise (Leuenberger et al. 1993). The intensity of the stimulation protocol in this experiment was chosen to cause no significant increase in the noradrenaline spillover associated with contraction. Also, it is possible that due to the low intensity of the stimulation certain substances, that may facilitate release of noradrenaline from nerve endings, are not liberated. For instance, it has been reported that bradykinin is not formed during low intensity contractions (Stebbins et al. 1990).

We found an increase in noradrenaline spillover caused by an increased blood flow. Several authors have observed this effect of blood flow on noradrenaline spillover at rest (Chang et al. 1991; Grossman et al. 1991; Zimmerman and Whitmore 1967). The flow dependency of the spillover can be explained as follows. The noradrenaline concentration gradient between the blood and the interstitial fluid depends on diffusion or transport equilibrium between the two compartments. If blood flow increases, the transit time of noradrenaline in the capillaries is shorter and less noradrenaline diffuses into the tissue. In addition, there is a high concentration at the sites of release in the tissue favoring diffusion into the blood. Hence, more of the noradrenaline originating from the tissue as well as entering the organ with the blood will be washed out of the organ. However, Kahan et al. (1985) found no

significant effect of a decrease in blood flow, from 4.7 ± 0.6 to 3.5 ± 0.4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ of muscle, on noradrenaline spillover. It has been suggested that in order to get an effect of blood flow on noradrenaline spillover a certain threshold has to be attained (Zimmerman and Whitmore, 1967). Indeed, it was suggested that moderate changes in capillary dynamics have no important effect on the noradrenaline spillover into the venous effluent.

We observed an adrenaline spillover in some instances. Such an adrenaline spillover from other tissues than the adrenal medullary gland during stimulation has been reported previously (Kahan et al. 1987; Péronnet et al. 1988b; Rosell et al. 1964; Thompson et al. 1988; Tsuda et al. 1990). It has been suggested that the adrenaline released from these tissues is not synthesized locally since they do not express the necessary enzymes. Instead, it would be taken up from the circulation, stored in vesicles in the sympathetic nerve terminals and then re-released with NA.

In summary, these results support the concept that an increase in blood flow to working muscles during exercise could contribute to the increase in regional spillover of NA. However, our results do not support the hypothesis that the increase in blood flow is the only cause for the decrease in noradrenaline fractional extraction observed during exercise. Indeed, we found no effect of blood flow, at rest and during stimulation, on the noradrenaline fractional extraction.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds pour la formation de chercheurs et d'aide à la recherche du Québec. The technical assistance of Pierre Fortier of Sacré-Coeur Hospital and of Pierre Corriveau of the Department of Kinesiology, Université de Montréal, are gratefully acknowledged.

References

- Achike, F.I., and Ballard, H.J. 1993. Influence of stimulation parameters on the release of adenosine, lactate and CO₂ from contracting dog gracilis muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 463: 107-121.
- Béliveau, L., Péronnet, F., Trudeau, F., Brisson, G., and Nadeau, R. 1990. Plasma catecholamines in the aorta and the phrenicoabdominal vein in exercising dogs. *J. Appl. Physiol.* 69: 604-608.
- Chang, P.C., Kriek, E., van der Krogt, J.A., and van Brummelen, P. 1991. Does regional norepinephrine spillover represent local sympathetic activity? *Hypertension* 18: 56-66.
- Canadian Council on Animal Care. 1993. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Vol. 1, Ottawa.
- Eisenhofer, G., Smolich, J.J., Cox, H.S. and Esler, M.D. 1991. Neuronal reuptake of norepinephrine and production of dihydroxyphenylglycol by cardiac sympathetic nerves in the anesthetized dog. *Circ.* 84: 1354-1363.
- Esler, M., Jennings, G., Korner, P., Blombery, P., Sacharias, N., and Leonard, P. 1984. Measurement of total and organ-specific norepinephrine kinetics in humans. *Am. J. Physiol.* 247: E21-E28.
- Gronlund, B., Astrup, A., Bie, P., and Christensen, N.J. 1991. Noradrenaline release in skeletal muscle and in adipose tissue studied by microdialysis. *Clin. Sci.* 80: 595-598.

- Grossman, E., Chang, P.C., Hoffman, A., Tamrat, M., Kopin, I.J., and Goldstein, D.S. 1991. Tracer norepinephrine kinetics: dependence on regional blood flow and the site of infusion. *Am. J. Physiol.* 260: R946-R952.
- Guimaraes, S., Brandao, F., and Paiva, M.Q. 1978. A study of the adrenoceptor-mediated feedback mechanism by using adrenaline as a false transmitter. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 305: 185-188.
- Hasking, G.J., Esler, M.D., Jennings, G.L., Dewar, E., and Lambert, G. 1988. Norepinephrine spillover to plasma during steady-state supine bicycle exercise. Comparison of patients with congestive heart failure and normal subjects. *Circ.* 78: 516-521.
- Kahan, T., Hjemdahl, P., and Dahlof, C. 1984. Relationship between the overflow of endogenous and radiolabelled noradrenaline from canine blood perfused gracilis muscle. *Acta Physiol. Scand.* 122: 571-582.
- Kahan, T., Dahlof, C., and Hjemdahl, P. 1985. Influence of acetylcholine, peptides, and other vasodilators on endogenous noradrenaline overflow and vasoconstriction in canine blood perfused gracilis muscle. *Acta Physiol. Scand.* 124: 457-465.
- Kahan, T., Dahlof, C., and Hjemdahl, P. 1987. Facilitation of nerve stimulation evoked noradrenaline overflow by isoprenaline but not by circulating adrenaline in the dog in vivo. *Life Sci.* 40: 1811-1818.

- Leuenberger, U., Sinoway, L., Gubin, S., Gaul, L., Davis, D., and Zelis, R. 1993. Effects of exercise intensity and duration on norepinephrine spillover and clearance in humans. *J. Appl. Physiol.* 75: 668-674.
- Medvedev, O.S., Esler, M.D., Angus, J.A., Cox, H.S., and Eisenhofer, G. 1990. Simultaneous determination of plasma noradrenaline and adrenaline kinetics. Responses to nitroprusside-induced hypotension and 2-deoxyglucose-induced glucopenia in the rabbit. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 341: 192-199.
- Péronnet, F., Béliveau, L., Boudreau, G., Trudeau, F., Brisson, G., and Nadeau, R. 1988a. Regional plasma catecholamine removal and release at rest and exercise in dogs. *Am. J. Physiol.* 254: R663-R673.
- Péronnet, F., Nadeau, R., Boudreau, G., Cardinal, R., Lamontagne, D., Yamaguchi, N., and De Champlain, J. 1988b. Epinephrine release from the heart during left stellate ganglion stimulation in dogs. *Am. J. Physiol.* 254: R659-R662.
- Persson, M.G., Hedqvist, P., and Gustafsson, L.E. 1991. Nerve-induced tachykinin-mediated vasodilation in skeletal muscle is dependent on nitric oxide formation. *Eur. J. Pharmacol.* 205: 295-301.
- Peuler, J.D., and Johnson, G.A. 1977. Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine. *Life Sci.* 21: 625-636.

- Rosell, S., Axelrod, J., and Kopin, I.J. 1964. Release of tritiated epinephrine following sympathetic nerve stimulation. *Nature* 201: 301.
- Savard, G., Strange, S., Kiens, B., Richter, E.A., Christensen, N.J., and Saltin, B. 1987. Noradrenaline spillover during exercise in active versus resting skeletal muscle in man. *Acta. Physiol. Scand.* 131: 507-515.
- Stebbins, C.L., Carretero, O.A., Mindroiu, T., and Longhurst, J.C. 1990. Bradykinin release from contraction skeletal muscle of the cat. *J. Appl. Physiol.* 69: 1225-1230.
- Thompson, J.M., Wallin, G., Lambert, G.W., Jennings, G.L., and Esler, M.D. 1998. Human muscle sympathetic activity and cardiac catecholamine spillover: no support for augmented sympathetic noradrenaline release by adrenaline co-transmission. *Clin. Sci.* 94: 383-393.
- Tsuda, K., Tsuda, S., and Masuyama, Y. 1990. Enhanced endogenous epinephrine release from the vascular adrenergic neurons in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 3: 52-54.
- Vaissaire, J.P. 1972. *Le chien, animal de laboratoire.* Édition Vigot Frères, Paris.
- Verbeuren, T.J., Janssens, W.J., and Vanhoutte, P.M. 1978. Effects of moderate acidosis on adrenergic neurotransmission in canine saphenous veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206: 105-114.
- Yamaguchi, N., de Champlain, J., and Nadeau, R. 1975. Correlation between the response of the heart to sympathetic stimulation and the release of

endogenous catecholamines into the coronary sinus of the dog. *Circ. Res.* 36: 662-667.

Zimmerman, B.G., and Whitmore, L. 1967. Transmitter release in skin and muscle blood vessels during sympathetic stimulation. *Am. J. Physiol.* 212: 1043-1054.

Table. 1 Arterial, venous and dialysate concentrations of catecholamines (pg·ml⁻¹)

	Baseline		Flow 1		Flow 2	
			18 ml·min ⁻¹ •100g ⁻¹		24 ml·min ⁻¹ •100g ⁻¹	
	Rest	Stimulation	Rest	Stimulation	Rest	Stimulation
Adrenaline D	9 ± 6	14 ± 10	14 ± 10	12 ± 10	-----	-----
Adrenaline C _a	40 ± 34	50 ± 31	50 ± 31	52 ± 32	58 ± 41	63 ± 64
Adrenaline C _v	55 ± 30	41 ± 34	41 ± 34	46 ± 33	60 ± 38	65 ± 47
Noradrenaline D	19 ± 15	13 ± 9	13 ± 9	15 ± 11	-----	-----
Noradrenaline C _a	229 ± 121	233 ± 128	233 ± 128	267 ± 130	272 ± 161	328 ± 240
Noradrenaline C _v	245 ± 142	232 ± 148	232 ± 148	234 ± 124	284 ± 166	329 ± 237

Note: Values are means ± SEM. D: dialysate concentration (n = 9), C_a: arterial concentration and C_v: venous concentration of adrenaline (n = 5) and noradrenaline (n = 9).

Table. 2 Hemodynamic, hematocrit and blood pH values

	Baseline	Flow 1		Flow 2	
		Rest	Stimulation	Rest	Stimulation
		18 ml•min ⁻¹ •100g ⁻¹		24 ml•min ⁻¹ •100g ⁻¹	
Heart rate (bpm)	123 ± 22	131 ± 18	142 ± 12	140 ± 14	146 ± 14
BP (mm Hg)	141 ± 11	142 ± 12	141 ± 10	127 ± 11	128 ± 11
GPP (mm Hg)	104 ± 6	129 ± 7	131 ± 10	143 ± 11	140 ± 10
Hematocrit	0.44 ± 0.03	0.44 ± 0.05	0.44 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.45 ± 0.05
pH _{arterial}	7.43 ± 0.05	7.44 ± 0.04	7.43 ± 0.04	7.45 ± 0.03	7.45 ± 0.04
pH _{venous}	7.41 ± 0.05	7.42 ± 0.04	7.39 ± 0.05	7.43 ± 0.03	7.42 ± 0.05

Note: Values are means ± SEM. BP: blood pressure, GPP: gracilis perfusion pressure.

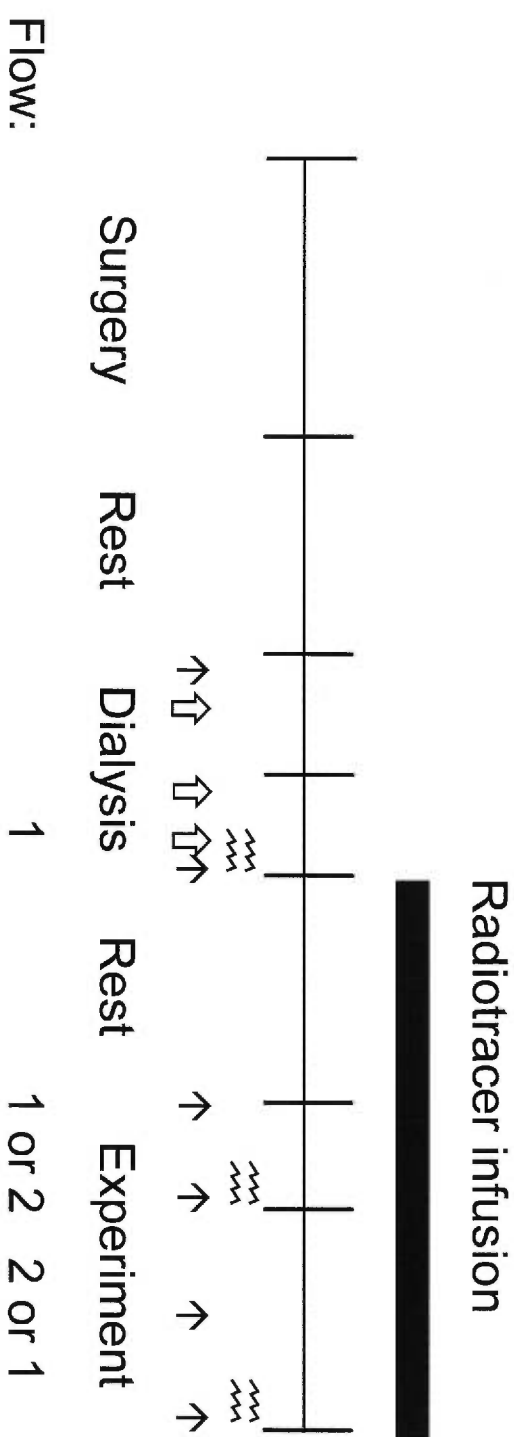


Figure 1. Time line illustrating the experimental protocol.

↑: Blood sampling, ⇅: Dialysate sampling, ⋈: electrical stimulation, 1: Flow 1, 2: Flow 2.

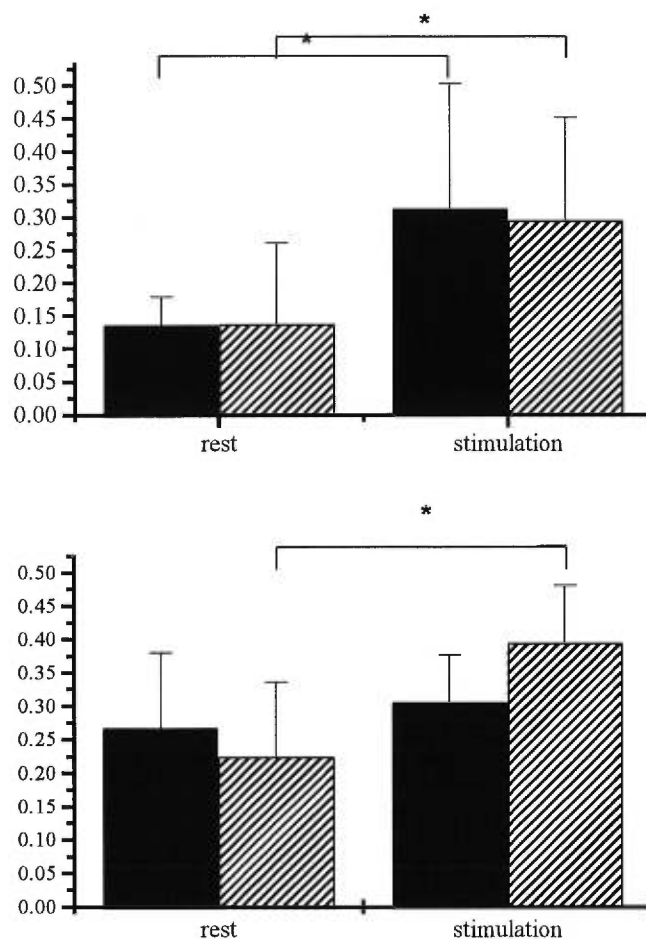


Figure 2. Fractional extractions of ³H-adrenaline (top) and ³H-noradrenaline (bottom) at flow 1 (18 ml min⁻¹•100 g⁻¹; solid bars) and flow 2 (24 ml min⁻¹•100 g⁻¹; hatched bars). Fractional extractions of both catecholamines were calculated, as described in the Materials and Methods, at rest and during stimulation at both flow rates. A main effect of the stimulation causing an increase in the noradrenaline fractional extraction was observed.

* Significant difference from rest condition.

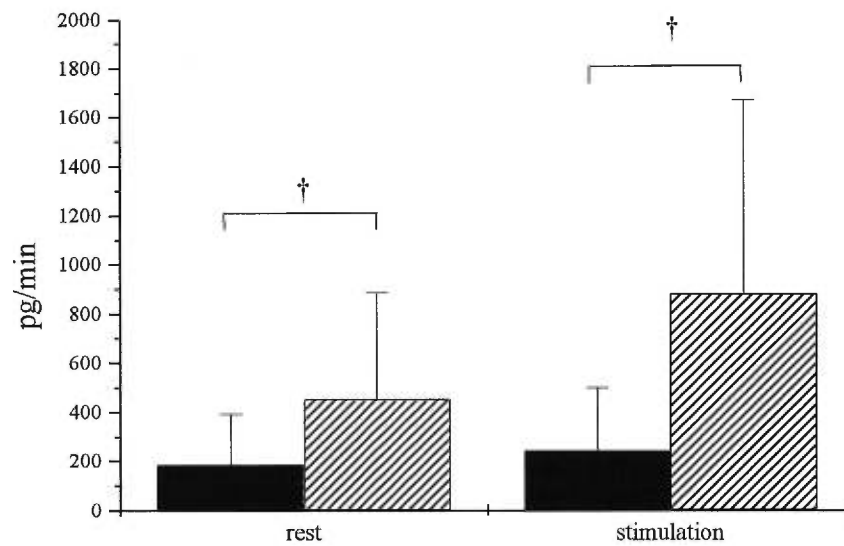


Figure 3. Noradrenaline spillover during flow 1 ($18 \text{ ml min}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; solid bars) and flow 2 ($24 \text{ ml min}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; hatched bars). Noradrenaline spillover was calculated, as described in the Materials and Methods, at rest and during stimulation at both flow rates. A main effect of the increase in blood flow causing an increase in the noradrenaline spillover was observed.

† Significant difference from flow 1.

Chapitre 3: Étude 2.

Bradykinin facilitates noradrenaline spillover during contraction in the canine gracilis muscle.

Julie L Lavoie and Louise Béliveau.

Soumis au Can. J. Physiol. Pharmacol. Août 2000

Résumé

Le spillover de noradrénaline dans les régions vasculaires des muscles squelettiques augmente à l'exercice. Les mécanismes causant cette augmentation ne sont pas encore bien connus. La contraction musculaire en soi provoque plusieurs modifications qui pourraient influencer le spillover de noradrénaline. Par exemple, il a été observé que de la bradykinine était formée lors de la contraction musculaire. Comme les récepteurs B₂ à la bradykinine facilitent le spillover de noradrénaline, celle-ci pourrait être impliquée dans l'augmentation du spillover de NA observée à l'exercice. Nous avons étudié l'effet de la bradykinine sur le spillover de noradrénaline lors de la contraction musculaire en utilisant un antagoniste spécifique des récepteurs B₂, le HOE 140 (HOE), dans le muscle gracilis *in situ* chez le Chien. Le HOE n'a eu aucun effet sur le spillover de noradrénaline au repos mais a causé une baisse significative lors de la contraction musculaire, de 558 à 181 pg·min⁻¹. En accord avec les données rapportées dans la littérature, une baisse du pourcentage d'extraction de la noradrénaline a été observée lors de la contraction musculaire. Celle-ci était indépendante du traitement au HOE. Nos observations suggèrent que la formation de bradykinine lors de la contraction musculaire pourrait jouer un rôle important dans l'augmentation du spillover de noradrénaline lors de l'exercice mais n'aurait pas d'effet sur l'extraction de noradrénaline.

Mots clés : muscle squelettique, pourcentage d'extraction, stimulation, HOE 140, récepteurs B₂

Abstract

Noradrenaline spillover from skeletal muscle vascular areas increases during exercise but the underlying mechanisms are not well understood. Muscle contraction itself causes changes in many factors that could affect noradrenaline spillover. For instance, it has been reported that bradykinin is synthesized in skeletal muscle areas during contraction. Since the B₂ bradykinin receptor facilitates noradrenaline spillover, it may be involved in the increase associated to contraction. In this experiment, we studied the effect of bradykinin on noradrenaline spillover in the *in situ* canine gracilis muscle, using the specific B₂ antagonist HOE 140. The drug did not modify noradrenaline spillover at rest but did cause a significant decrease during muscle contraction, from 558 to 181 pg·min⁻¹. As reported previously in the literature, fractional extraction of noradrenaline decreased during muscle contraction. This effect was independent of drug treatment. In light of our results, it seems that bradykinin formation during muscle contraction may play an important part in the observed increase in noradrenaline spillover but does not seem to affect fractional extraction.

Key words: skeletal muscle, fractional extraction, stimulation, HOE 140, B₂ receptors

Introduction

It is well known that plasma concentration of noradrenaline increases during exercise (Béliveau et al. 1990; Péronnet et al. 1988). Most of the plasma noradrenaline originates from sympathetic nerve terminals present throughout the organism. It is released from nerve terminals into the interstitial fluid and can then either be taken back into the nerve terminals, attach to pre- or post-synaptic receptors or spillover into circulation. At rest, most of the circulating noradrenaline arises from the hepatosplanchnic vascular bed (Péronnet et al. 1988). During exercise, the main contributors to the enhanced noradrenaline spillover appear to be the skeletal muscle vascular regions (Hasking et al. 1988; Péronnet et al. 1988). Indeed, sympathetic nervous activity to the skeletal muscle areas is increased during exercise (Thompson et al. 1998) which should lead to an increased release of noradrenaline into the interstitial fluid. Furthermore, muscle contraction stimulates the production of substances, such as bradykinin (Stebbins et al. 1990), which may facilitate the release of noradrenaline from nerve terminals. Other factors, such as changes in pH, metabolite concentrations or blood flow, could also contribute to the increased spillover during exercise. For instance, we have previously reported that a 33% increase in blood flow during muscle contraction increased noradrenaline spillover in the gracilis muscle from 246 to 880 pg·min⁻¹ (Lavoie et al. 2000). However, although blood flow appears to be an important modulator of noradrenaline spillover during muscle contraction, it is probably not the sole factor. Indeed, the increase observed by increasing blood flow is not large enough to explain that observed

during exercise. For instance, in a study by Péronnet et al. (1988), noradrenaline spillover in the active skeletal muscle vascular regions increased from 37 at rest to 400 ng/min exercise which is an increase about 4 fold greater than the one we observed. The implication of other factors in the modulation of noradrenaline spillover remains to be studied.

The involvement of bradykinin is an interesting possibility. It has been reported that bradykinin facilitates the release of noradrenaline in many tissues in different species through the stimulation of the B₂ receptors (Chulak et al. 1998; Hatta et al. 1999; Kurz et al. 1997; Rump et al. 1995; Schwieler et al. 1994; Vaz-da-Silva et al. 1996). The bradykinin B₂ receptor appears to be responsible for most of the biological actions of bradykinin while the B₁ receptor is usually induced by pathological conditions, such as tissue injury or stress (Burch and Kyle 1992). Furthermore, it has been reported that bradykinin is synthesized during muscle contraction (Blais et al. 1999; Pan et al. 1993; Stebbins et al. 1990). Indeed, many factors associated with muscle contraction, for instance a decrease in pH or an increase in lactate, could favor bradykinin synthesis and/or delay its degradation (Stebbins et al 1990). This bradykinin could be involved in different physiological processes such as, cardiovascular reflexes (Pan et al. 1993; Stebbins et al. 1990), translocation of GLUT4 (Kishi et al. 1998) or inflammatory processes (Blais et al. 1999) in skeletal muscles during exercise.

The objective of this study was to evaluate the contribution of bradykinin to noradrenaline spillover at rest and during contraction using an *in situ* gracilis muscle

model in the anesthetized dog. A radiotracer technique (Esler et al. 1984) with ^3H -noradrenaline was used for determination of muscle noradrenaline spillover with or without the presence of HOE 140 (HOE), a specific bradykinin receptor B_2 antagonist.

Materials and Methods

Preparation of animals

The study was conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (1993) after approval by the local animal care committee. Four male and four female mongrel dogs, weighing 14 ± 1 kg were used.

Anaesthesia was induced with thiopental ($25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and alpha-chloralose ($80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and maintained throughout each experiment by alpha-chloralose ($500 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$). Animals were intubated and artificially ventilated with room air using an animal respirator (Harvard apparatus model 607, Millis, MA). Skin electrodes were inserted into the four legs of the animal for ECG recording. The gracilis muscle was prepared as described previously (Lavoie et al. 2000). Briefly, the muscle was isolated from the surrounding tissues except for the supplying arteries, veins and nerve. After heparinization ($300 \text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v. followed by $150 \text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ i.v.), femoral arterial blood was delivered through silicone tubing to the gracilis muscle artery at constant flow using a peristaltic pump (Masterflex model n° 7520-35, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL.). Muscle blood flow was maintained at $18 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ of muscle. Muscle weight was estimated using dog body partition

data (Vaissaire 1972). The validity of this method has been verified in prior experiments (Lavoie et al. 2000). The venous effluent was returned to the femoral vein through a catheter connected to a three-way stop-cock for venous blood sampling.

A catheter was inserted in the carotid artery in order to monitor systemic arterial blood pressure and for blood sampling. The perfusion pressure in the gracilis muscle was measured through a side arm in the arterial loop. Blood pressures were measured using pressure transducers (Model CDX3042-982, Cobe, Lakewood, CO.) and recorded on a Nihon Koden polygraph (Tokyo, Japan). Throughout the experiment, the muscle preparation was covered with warm saline compresses and a thin plastic film.

Experimental protocol

As can be seen on the timeline (Figure 1), once the surgery was completed, levo ^3H -2,5,6-noradrenaline ($42.1 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) (NEN Life Science products, Boston, Mass., USA) was administered into a foreleg vein using an infusion/withdrawal pump (Harvard Apparatus, model 940), as described by Esler et al. (1984). The infusate was prepared immediately before the infusion by diluting an aliquot of ^3H -noradrenaline in 0.9% saline containing $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sodium ascorbate and $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ acetic acid. The final concentration of ^3H -labeled noradrenaline in the infusate was adjusted to give an infusion rate of $90 \text{ nCi}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ at a fixed flow rate of $0.318 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Blood samples (6 ml) were collected simultaneously from the carotid artery and gracilis vein 60 min after the start of the radiotracer infusion, in tubes containing 120 μl of catecholamine preservative (EGTA, 95 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ and Glutathione, 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). The plasma was separated from blood cells by centrifugation at 4 000 g for 15 min and stored at -80°C for subsequent catecholamine assay. All collected samples were treated similarly. Arterial blood was also used for determination of hematocrit.

After baseline blood sampling, the gracilis nerve was stimulated using a Model S8 stimulator (Grass Medical instruments, Quincy, Mass., USA) for 5 minutes (2 Hz, 15 V, 5 ms). Blood samples were taken after 4 minutes of stimulation. After sampling, 5 pmol of bradykinin (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ont., Canada) was injected as a local intra-arterial bolus, and the vasodilator response monitored. Thereafter, HOE 140 (Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, Ca., USA), a B_2 bradykinin receptor antagonist, was infused intra-arterially (15 $\text{pmol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ in a volume of 0.1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$), to yield a calculated arterial plasma concentration of 50 nM (Hock et al. 1991). The efficacy of the antagonist was tested by another injection of bradykinin. After 10 min, blood samples were again collected at rest and during stimulation. Since bradykinin has a very short half-life, approximately 13 s (D carie et al. 1996), it did not interfere with subsequent measurements.

Analytical methods

For plasma noradrenaline and adrenaline assay, endogenous catecholamines and ^3H -noradrenaline were extracted using alumina adsorption and separated by high

performance liquid chromatography (Medvedev et al. 1990). Briefly, the plasma catecholamines and internal standard (dihydroxybenzylamine) were adsorbed onto activated alumina, carefully rinsed, and desorbed into 200 μ l of a solution of 0.04 M H_3PO_4 -0.2 M acetic acid. Timed collections of the eluant leaving the electrochemical cell allowed fractionation of 3H -noradrenaline into scintillation vials for counting by liquid scintillation spectroscopy.

Data analysis and statistical methods

The fractional extraction (Fx) of 3H -noradrenaline across the gracilis muscle was calculated using the formula:

$$[1] \quad Fx = (T_a - T_v) / T_a$$

where T_a and T_v are the concentration of tritiated noradrenaline in arterial and in gracilis vein plasma respectively.

Spillover (Sp) of noradrenaline ($pg \cdot min^{-1}$) from the gracilis was estimated according to the formula described by Esler et al. (1984):

$$[2] \quad Sp = [(Fx \cdot C_a) + (C_v - C_a)] \cdot [BF \cdot (1 - Hct)]$$

where Fx is fractional extraction, C_a and C_v are the noradrenaline concentration in arterial and in gracilis vein plasma ($pg \cdot ml^{-1}$) respectively, BF is the muscle blood flow ($18 ml \cdot min^{-1}$) and Hct is the hematocrit.

All data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance ($p < 0.05$) was assessed using a two-way analysis of variance for repeated measures followed by a LSD post-hoc test when necessary.

Results

Baseline arterial and venous concentrations of noradrenaline, 270 ± 167 and 251 ± 153 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, and adrenaline, 39 ± 44 and 31 ± 37 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, were unaffected by drug treatment or stimulation. Heart rate, systemic blood pressure (BP) and hematocrit were unchanged throughout the experiment, but gracilis perfusion pressure decreased significantly with stimulation (Table 1).

Noradrenaline spillover was 356 and 558 $\text{pg}\cdot\text{min}^{-1}$ at rest and after stimulation respectively (Figure 2). HOE did not affect resting values of noradrenaline spillover but caused a significant decrease during stimulation. Fractional extraction of ^3H -noradrenaline was decreased by stimulation but unaffected by HOE treatment (Figure 3).

Discussion

The main finding in this experiment was that noradrenaline spillover during muscle contraction was decreased by HOE treatment. To our knowledge, this is the first report that bradykinin formed during muscle contraction may be implicated in the modulation of noradrenaline spillover. Also, as reported by many authors,

fractional extraction of noradrenaline was decreased by stimulation. This however was independent of HOE treatment.

Fractional extraction of ^3H -noradrenaline decreased from rest to stimulation. Indeed, during exercise in humans and dogs, a decrease in fractional extraction of noradrenaline across skeletal muscle vascular beds is usually observed (Péronnet et al. 1988; Savard et al. 1987). In these experiments, the authors suggested that the decrease was caused by the increase in blood flow in the active muscles during exercise. Indeed, it has been proposed that, when regional blood flow is increased, the transit time of the noradrenaline in the capillaries is shorter and therefore less noradrenaline can diffuse into the adjacent tissue (Grossman et al. 1991). However, it is unlikely that blood flow affected fractional extraction in this experiment since it was kept constant. This is consistent with previous results in our laboratory suggesting that an increase in blood flow is not the only contributor to the decrease in fractional extraction observed during exercise (Lavoie et al. 2000). In that study, noradrenaline fractional extraction was not affected by 3- and 4-fold increases in blood flow but was increased by muscle contraction. In the present study, there was a significant decrease in the GPP (Table 1) which can be expected considering the known decrease in resistance in active muscle during exercise. However, this was not correlated with the decrease in fractional extraction. It is possible that an increase in noradrenaline release into interstitial fluid during exercise could explain the lower diffusion of noradrenaline from the blood. Another possibility would be

the effect of pH on noradrenaline uptake. Indeed, Verbeuren et al. (1978) found that acidosis inhibited uptake of noradrenaline.

It has been reported that bradykinin facilitates noradrenaline release in the dog gracilis muscle (Schwieler et al. 1994), the human kidney (Rump et al. 1995) and the human, guinea pig, mouse and rat heart (Chulak et al. 1998; Hatta et al. 1999; Kurz et al. 1997; Vaz-da-Silva et al. 1996). These authors reported that this potentiating effect of bradykinin was exerted through the stimulation of B₂-receptors. It has been suggested that this facilitatory effect of bradykinin is due to the disruption of an ongoing α_2 autoreceptor-triggered G_{i/o} protein mediated inhibition (Cox et al. 2000).

During muscle contraction many factors, for instance a decrease in pH or an increase in lactate, could favor bradykinin synthesis and/or delay its degradation (Stebbins et al. 1990). Indeed, bradykinin synthesis has been observed in skeletal muscle during contraction (Blais et al. 1999; Pan et al. 1993; Stebbins et al. 1990). For example, during contractions producing muscle tensions of 50 and 100% of maximum in the cat, bradykinin in the venous effluent of the active muscle increased by 47% and 33% respectively (Stebbins et al. 1990). Therefore, it is possible that the bradykinin formed during muscle contraction may facilitate noradrenaline spillover. Hence, without this facilitating effect, the many inhibitory factors produced during muscle contraction, for instance acidosis (Verbeuren et al. 1978), hyperosmolarity (Mc Grath and Shepherd 1976) and opiates (Langer 1981) could prevail. This may explain the decrease in noradrenaline spillover from rest to stimulation observed

during the HOE treatment in the present study. Indeed, it is well known that noradrenaline spillover increases in active skeletal muscle (Péronnet et al. 1988; Hasking et al. 1988). In the control condition, noradrenaline spillover did tend to increase with stimulation although it did not reach statistical significance. It has been reported that noradrenaline spillover increases with intensity of stimulation (Yamaguchi et al. 1975; Kahan et al. 1984). Therefore, it is possible that the intensity chosen was not high enough to cause a statistically significant effect on noradrenaline spillover due to the large inter-individual variations present. This stimulation protocol was chosen in order to avoid the confounding effect of muscle fatigue.

In summary, these results suggest that the bradykinin formed during muscle contraction may facilitate noradrenaline spillover via pre-synaptic B₂-receptors. Taken together with those from our previous study, these results suggest that bradykinin and blood flow could account for a large portion of the increase in noradrenaline spillover from active skeletal muscle vascular beds. Indeed, Péronnet et al. (1988) observed that the increase in total noradrenaline spillover during exercise in dogs was mainly due to an increase in spillover from the skeletal muscle vascular beds. They estimated that skeletal muscles contributed 51% of total noradrenaline spillover during exercise. This represents an 11-fold increase in skeletal muscle noradrenaline spillover from rest to exercise. In our previous study, blood flow contributed to a 3-4 fold increase in noradrenaline spillover or approximately 30% of the estimated total increase in noradrenaline spillover in the

skeletal muscle vascular beds during exercise. In this study, bradykinin B₂ receptor inhibition caused a 3-4 fold decrease in noradrenaline spillover during contraction. Hence, endogenous bradykinin could also contribute to approximately 30% of the increase in spillover, leaving a 40% increase to other factors, for instance the increase in sympathetic nerve activity and adrenaline through the β_2 -adrenergic receptors. These other contributors remain to be studied. Of course, these are only crude estimations and the relative contribution of these different factors will most probably vary depending on the exercise. However, according to our studies, blood flow and bradykinin do seem to be very important contributors to the increased noradrenaline spillover in the skeletal muscle vascular beds that is observed during exercise.

Acknowledgements

The technical assistance of Pierre Fortier of Sacré-Coeur Hospital and of Pierre Corriveau of the Department of Kinesiology, Université de Montréal, are gratefully acknowledged.

References

- Béliveau, L., Péronnet, F., Trudeau, F., Brisson, G., and Nadeau, R. 1990. Plasma catecholamines in the aorta and the phrenicoabdominal vein in exercising dogs. *J. Appl. Physiol.* 69 : 604-608.
- Blais, C. Jr., Adam, A., Massicotte, D., and Péronnet, F. 1999. Increase in blood bradykinin concentration after eccentric weight-training exercise in men. *J. Appl. Physiol.* 87 : 1197-1201.
- Burch, R.M., and Kyle, D.J. 1992. Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci.* 50 : 829-838.
- Canadian Council on Animal Care. 1993. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Vol. 1, Ottawa, Ont.
- Chulak, C., Couture, R., and Foucart, S. 1998. Modulatory effect of bradykinin on noradrenaline release in isolated atria from normal and B₂ knockout transgenic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 346 : 167-174.
- Cox, S.L., Schelb, V., Trendelenburg, A.U., and Starke, K. 2000. Enhancement of noradrenaline release by angiotensin II and bradykinin in mouse atria: evidence for cross-talk between G_{q/11} protein- and G_{i/o} protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129 : 1095-1102.
- Décarie, A., Raymond, P., Gervais, N., Couture, R., and Adam, A. 1996. Serum interspecies in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am. J. Physiol.* 271: H1340-H1347.

- Esler, M., Jennings, G., Korner, P., Blombery, P., Sacharias, N., and Leonard, P. 1984. Measurement of total and organ-specific norepinephrine kinetics in humans. *Am. J. Physiol.* 247 : E21-E28.
- Grossman, E., Chang, P.C., Hoffman, A., Tamrat, M., Kopin, I.J., and Goldstein, D.S. 1991. Tracer norepinephrine kinetics: dependence on regional blood flow and the site of infusion. *Am. J. Physiol.* 260 : R946-R952.
- Hasking, G.J., Esler, M.D., Jennings, G.L., Dewar, E., and Lambert, G. 1988. Norepinephrine spillover to plasma during steady-state supine bicycle exercise. Comparison of patients with congestive heart failure and normal subjects. *Circ.* 78 : 516-521.
- Hatta, E., Maryama, R., Marshall, S.J., Imamura, M., and Levi, R. 1999. Bradykinin promotes ischemic norepinephrine release in guinea pig and human hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288 : 919-927.
- Hock, F.J., Wirth, K., Albus, U., Linz, W., Gerhards, H.J., Wiemer, G., Henke, S., Breipohl, G., Konig, W., Knolle, J., and Scholkens, B.A. 1991. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vitro* studies. *Br. J. Pharmacol.* 102 : 769-773.
- Kahan, T., Hjemdahl, P., and Dahlof, C. 1984. Relationship between the overflow of endogenous and radiolabelled noradrenaline from canine blood perfused gracilis muscle. *Acta Physiol. Scand.* 122 : 571-582.

- Kishi, K., Muromoto, N., Nakaya, Y., Miyata, I., Hagi, A., Hayashi, H., and Ebina, Y. 1998. Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *Diabetes* 47: 550-558.
- Kurz, T., Tolg, R., and Richardt, G. 1997. Bradykinin B₂-receptor-mediated stimulation of exocytotic noradrenaline release from cardiac sympathetic neurons. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29 : 2561-2569.
- Langer, S.Z. 1981. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol. Rev.* 32 : 337-362.
- Lavoie, J.L., Trudeau, F., and Béliveau, L. 2000. Effect of blood flow and muscle contraction on noradrenaline spillover in the canine gracilis muscle. *Can J Physiol. Pharmacol.* 78 :75-80.
- McGrath, M.A., and Shepherd, J.T. 1976. Hyperosmolarity: effects on nerves and smooth muscle of cutaneous veins. *Am. J. Physiol.* 231 : 141-147.
- Medvedev, O.S., Esler, M.D., Angus, J.A., Cox, H.S., and Eisenhofer, G. 1990. Simultaneous determination of plasma noradrenaline and adrenaline kinetics. Responses to nitroprusside-induced hypotension and 2-deoxyglucose-induced glucopenia in the rabbit. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 341 : 192-199.
- Pan, H. L., Stebbins, C.L., and Longhurst, J.C. 1993. Bradykinin contributes to the exercise pressor reflex: mechanism of action. *J. Appl. Physiol.* 75: 2061–2068.

- Péronnet, F., Béliveau, L., Boudreau, G., Trudeau, F., Brisson, G., and Nadeau, R. 1988. Regional plasma catecholamine removal and release at rest and exercise in dogs. *Am. J. Physiol.* 254 : R663-R673.
- Persson, M.G., Hedqvist, P., and Gustafsson, L.E. 1991. Nerve-induced tachykinin-mediated vasodilation in skeletal muscle is dependent on nitric oxide formation. *Eur. J. Pharmacol.* 205 : 295-301.
- Rump, L.C., Bohmann C., Schaible, U., Schultze-Seemann, W., and Schollmeyer, P.J. 1995. β -adrenergic, angiotensin II, and bradykinin receptors enhance neurotransmission in human kidney. *Hypertension* 26 : 445-451.
- Savard, G., Strange, S., Kiens, B., Richter, E.A., Christensen, N.J., and Saltin, B. 1987. Noradrenaline spillover during exercise in active versus resting skeletal muscle in man. *Acta. Physiol. Scand.* 131 : 507-515.
- Schwieler, J.H., Kahan, T., Nussberger, J., and Hjendahl, P. 1994. Participation of prostaglandins and bradykinin in the effects of angiotensin II and converting enzyme-inhibition on sympathetic neurotransmission *in vivo*. *Acta Physiol. Scand.* 152 : 83-91.
- Stebbins, C.L., Carretero, O.A., Mindrou, T., and Longhurst, J.C. 1990. Bradykinin release from contracting skeletal muscle of the cat. *J. Appl. Physiol.* 69 : 1225-1230.
- Thompson, J.M., Wallin, B.G., Lambert, G.W., Jennings, G.L., and Esler, M.D. 1998. Human muscle sympathetic activity and cardiac catecholamine

spillover: no support for augmented sympathetic noradrenaline release by adrenaline co-transmission. *Clin. Sci.* 94: 383-393.

Vaissaire, J.P. 1972. *Le chien, animal de laboratoire*. Édition Vigot Frères, Paris.

Vaz-da-Silva, M., Magina, S., Domingues-Costa, A., Moura, D., and Guimaraes, S. 1996. The role of the endocardium in the facilitatory effect of bradykinin on electrically-induced release of noradrenaline in rat cardiac ventricle. *Br. J. Pharmacol.* 118 : 364-368.

Verbeuren, T.J., Janssens, W.J., and Vanhoutte, P.M. 1978. Effects of moderate acidosis on adrenergic neurotransmission in canine saphenous veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206 : 105-114.

Yamaguchi, N., de Champlain, J., and Nadeau, R. 1975. Correlation between the response of the heart to sympathetic stimulation and the release of endogenous catecholamines into the coronary sinus of the dog. *Circ. Res.* 36 : 662-667.

Table. 1 Hemodynamic and hematocrit values

	Baseline		HOE 140	
	Rest	Stimulation	Rest	Stimulation
Heart rate (bpm)	153 ± 10	152 ± 10	141 ± 13	146 ± 14
BP (mm Hg)	128 ± 7	135 ± 8	125 ± 9	127 ± 8
GPP (mm Hg)	124 ± 15	100 ± 21 *	132 ± 16	106 ± 24 *
Hematocrit	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.03

Note: Values are means ± SEM. BP: blood pressure, GPP: gracilis perfusion pressure.

* significantly different ($p < 0.05$) from rest.

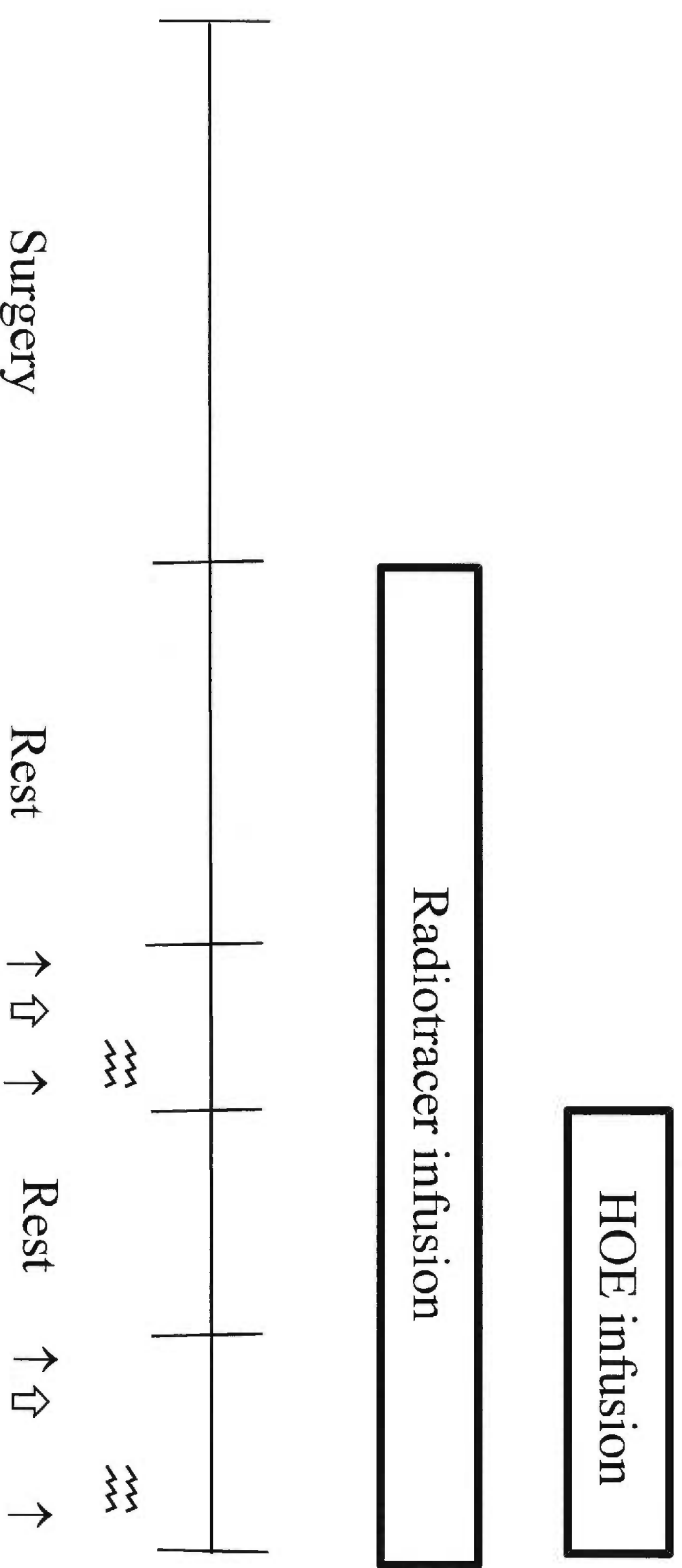


Figure 1. Time line illustrating the experimental protocol.

↑: Blood sampling, ⇄: bradykinin bolus injection, ⋈: electrical stimulation.

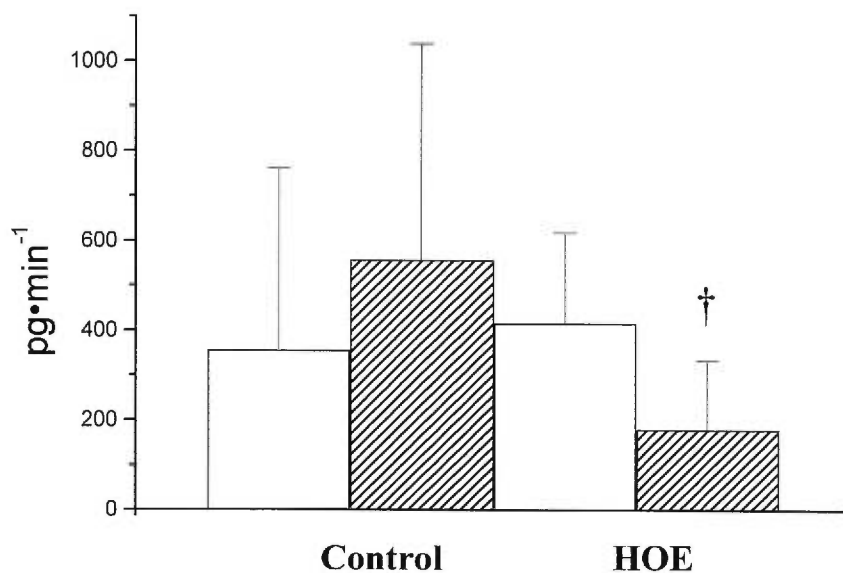


Figure 2. Noradrenaline spillover during control conditions and HOE treatment. Noradrenaline spillover was calculated, as described in the Materials and Methods, at rest (solid bars) and during stimulation (hatched bars) in both conditions. HOE treatment significantly decreased noradrenaline spillover during stimulation. † Significant difference from control.

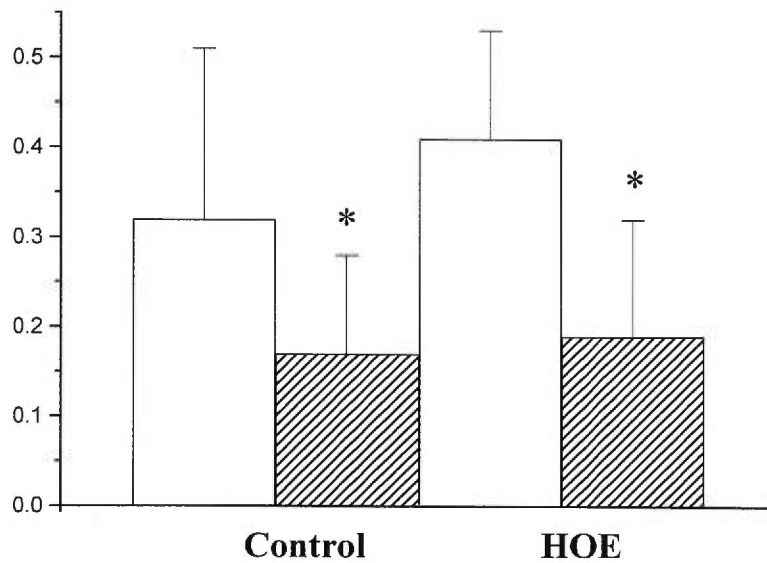


Figure 3. Fractional extraction of ^3H -noradrenaline during control conditions and HOE treatment. Fractional extraction of noradrenaline was calculated, as described in the Materials and Methods, at rest (solid bars) and during stimulation (hatched bars) in both conditions. A decrease in noradrenaline fractional extraction was observed from rest to stimulation. * Significant difference from rest.

Chapitre 4 : Étude 3

Agonist-mediated β -adrenergic receptor downregulation in rat skeletal muscle
is attenuated by the farnesyltransferase inhibitor BMS-191563.

Julie L Lavoie, Angelino Calderone and Louise Béliveau.

Soumis au Am. J. Physiol. Août 2000.

Abstract

Farnesylation represents an essential post-translational modification of several well-defined proteins implicated in the homologous desensitization of the β -adrenergic receptor (β -ADR). The following study examined the effect of a novel farnesyltransferase inhibitor, BMS-191563, on agonist-mediated β -ADR downregulation in skeletal muscle. Female Sprague-Dawley rats were treated for 12-days with the β_2 -adrenergic agonist clenbuterol (4 mg/kg), with or without the concurrent administration of BMS-191563 (2 mg/kg/day). Clenbuterol caused a significant increase in the gastrocnemius muscle weight, whereas the soleus muscle weight was unchanged. In addition, clenbuterol treatment decreased total β -ADR density by 45% and 40% in the soleus and medial gastrocnemius (MG), respectively. BMS-191563 treatment did not prevent clenbuterol stimulated MG hypertrophy, but attenuated β -ADR downregulation in both muscle types. Likewise, isoproterenol treatment of neonatal rat cardiac fibroblasts for 24 hr caused a 69% decrease of total β -ADR density. The agonist-mediated β -ADR downregulation was inhibited by the prior treatment with BMS-191563. Collectively, these data demonstrate that the mechanism(s) implicated in agonist-mediated β -ADR downregulation is sensitive to BMS-191563, thereby suggesting the involvement of farnesylated proteins.

Key words: sympathetic system, cardiac fibroblasts, homologous desensitization, clenbuterol, contractile properties

Introduction

Homologous desensitization of the β -ADR (β -adrenergic receptor) represents an adaptive response commonly observed in various disease states associated with a hyperactivity of the sympathetic system (27). The uncoupling of the β -ADR from its heterotrimeric G-protein characterizes the initial event of desensitization following acute exposure to agonist (9). This process involves the phosphorylation of the β -ADR by a unique family of G-protein coupled receptor kinases (GRK), and leads to the subsequent binding of the protein β -arrestin (28). The β -ADR/ β -arrestin complex is sequestered in endosomes, whereupon the receptor can then be recycled to the membrane following removal of the agonist (9, 28). However, the prolonged agonist exposure (>1 hr) will result in the translocation of the β -ADR to lysosomes, and thus targeted for degradation (17). This latter process of homologous desensitization is referred to as receptor downregulation (17). Although, the mechanism(s) implicated in receptor downregulation remain to be completely resolved, several studies have suggested receptor sequestration may represent a prerequisite event (2, 11).

The post-translational addition of isoprenoid lipids via a process termed prenylation represents a prerequisite event of numerous proteins to achieve proper cellular localization and full biological activity (16). The cytosolic enzyme farnesyltransferase attaches a 15-carbon farnesyl isoprenoid to the cysteine residue of the CAAX (C, cysteine; A, aliphatic amino acid; X, either serine, methionine, glutamine, or alanine) motif (8). The addition of the farnesyl group leads to the

proteolytic cleavage of the remaining three C-terminal amino acids, and subsequent methylation of the prenylated cysteine. A second cytosolic prenyltransferase termed geranylgeranyltransferase has been identified, and attaches a 20-carbon geranylgeranyl isoprenoid to the cysteine residue of the CAAX motif, if the X amino acid is a leucine residue (8). Interestingly, the GRK1 isoform of the GRK family contains a CAAX motif, whereas GRK2 and GRK3 are not prenylated but display two protein motifs implicated in the targeting of these proteins to the plasma membrane; a G β γ binding domain and a pleckstrin homology domain (6, 7, 23). Analogous to GRK1, the attachment of the G β γ subunit to the plasma membrane requires the post-translational prenylation of the γ subunit. The G γ 1, γ 8, and γ 11 isoforms are targets of farnesyltransferase, whereas the remaining G γ isoforms are geranylgeranylated (24). Based on these observations, the selective inhibition of prenylation may represent a mechanism modulating β -ADR desensitization and/or downregulation following the chronic exposure to agonist. In this regard, the following study utilized a pharmacological approach to better understand the relationship between farnesylation and agonist-mediated β -ADR downregulation in skeletal muscle.

Materials and Methods

Animal Protocol.

Experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council for the Protection of Animals and approved by the Ethics and

Research Committee of the University of Montreal. Thirty female Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, Canada) with an initial weight of 150-175 g were used. Rats were housed individually at a constant temperature of 21° C, and had free access to water and food. After a 2-day acclimatization period, the animals were randomly separated into 4 experimental groups: control, BMS-191563 (peptidomimetic farnesyltransferase inhibitor; Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), clenbuterol (selective β_2 -adrenergic agonist; Sigma, St-Louis, MO) and BMS-191563 and clenbuterol. BMS-191563 (2 mg/kg/day) was injected intra-peritoneally for 14 days, whereas control animals received an injection of the equivalent volume of saline 0.9%. Clenbuterol was mixed into a powdered form of standard laboratory rat diet (ProLab RMH 4018, Syracuse, NY) at a concentration of 4 mg/kg of food and administered for 12 days (20). In the BMS-19563 plus clenbuterol treated rats, clenbuterol was added to the diet 2 days following the start of the BMS-191563 treatment.

Contractile properties.

At the end of the treatment period, the animals were anesthetized with sodium pentobarbitate (45 mg/kg; Maple Leaf, Cambridge, Canada) for the measurement of *in situ* contractile properties of the medial gastrocnemius (MG) muscle, as previously described (21). Contractile properties were recorded on computer or FM tape, and following completion of the experiment, the soleus and gastrocnemius muscles were excised, weighted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C.

Cultured neonatal rat cardiac fibroblasts.

Cardiac fibroblasts were isolated from 1- to 3-day old Sprague-Dawley rat pups (Charles River, St-Constant, Canada), as previously described (5). Experiments were performed on second passage cells which were plated at a density of 100-200 cells/mm² for a period of 24-36 h in DMEM containing 7% FBS. Cells were subsequently washed and the media was changed to serum-free DMEM containing insulin 5 µg/ml and sodium selenite 5 ng/ml (Collaborative Biomedical, Bedford, MA) for 48 hr prior to the experimental protocol.

Measurement of total β-ADR density.

Previously frozen (-80°C) skeletal muscle tissue were prepared as previously described (21). For cardiac fibroblasts, 250 µl of lysis buffer (75 mM Tris, 12.5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 µg/ml leupeptin, 1µg/ml aprotinin and 100 µM PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride)) was added to each plate, cells were scraped, and homogenized with a 23-gauge needle. The skeletal muscle plasma membrane pellet and the total cardiac fibroblast lysate were used immediately for analysis. Protein content was measured with the Bradford method using bovine serum albumin as a standard.

β-ADR density was measured in triplicate using saturating concentrations of [¹²⁵I]-Iodocyanopindolol (New England Nuclear, Mandel, Guelph, Canada) with or without 10 µM alprenolol (Sigma, St-Louis, MO), as previously described (21). Radioactivity was measured using a gamma counter (LKB 1271, PerkinElmer Life

Sciences, Turku, Finland). Specific binding was calculated as the difference between total binding and non-specific binding. β -ADR density is expressed in femtomoles per milligram of protein.

Western blot analysis of Ras Distribution.

The cytosolic and particulate fractions of total soleus muscle lysate were prepared as previously described (4). One hundred μ g of particulate and cytosolic protein was loaded on a 10% SDS-polyacrylamine gel, and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond; Amersham, Baie d'Urfée, Canada). The membrane was blocked in a solution of TBS (Tris buffer saline) 1X, 0.1% tween and 3% powdered milk, followed by an overnight incubation at 4°C with a pan-Ras mouse antibody (1:250; recognizes H, N and K isoforms; Calbiochem, La Jolla, CA). The membrane was then washed 4 times for 10 minutes with the initial blocking solution, and subsequently treated for 1-2 hours with a goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (1:2500; Pierce, Rockford, IL), and the immunoreactive bands were visualized using chemiluminescence (ECL; Amersham, Baie D'Urfé, Canada).

Immunohistochemistry analysis of Ras in skeletal muscle.

Frozen sections of soleus muscle from fixed Sprague-Dawley rats were cut longitudinally to 16 μ m and mounted on 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma, St-

Louis, MO) treated slides (Fisher Scientific Co., Ottawa, Ont.) (1). Mouse monoclonal pan-Ras antibody (recognizes H-, N-, and K-Ras; Calbiochem, LaJolla, CA) was applied at a 1:100 dilution in a medium containing 1% goat serum and 25% PBS 4X and incubated for 24 hrs at 4°C. The slides were rinsed with a solution containing 5% goat serum, 25% PBS 4X and 4% Triton 25%. The second antibody, goat anti-mouse IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) was then applied at a 1:1000 dilution in the same medium as the first antibody and incubated for 2 hours. Slides were subsequently rinsed with distilled water, dried, and mounted with glycerin. To confirm signal specificity, the second antibody was added in the absence of the primary anti-ras antibody. In these latter experiments, an immunodetectable signal was not observed.

Statistical analysis.

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance ($p < 0.05$) was assessed using a two-way analysis of variance followed by a Neuman-Keuls multiple comparison test when necessary.

Results

Skeletal muscle hypertrophy and contractile function.

Chronic treatment with clenbuterol increased gastrocnemius muscle weight from 543 ± 27 to 603 ± 24 mg of muscle/ 100 g body weight ($p < 0.05$) which translates into an 11% hypertrophic response. By contrast, clenbuterol treatment had

no growth effect in the soleus muscle (Sham= 43 ± 3 versus Clenbuterol= 45 ± 3 mg of muscle/ 100 g of body weight). As for contractile properties, a significant effect of clenbuterol was observed in the contractile and half-relaxation times (Table 1), whereas force generation (data not shown) measure in the MG muscle was unaffected. Treatment with the farnesyltransferase inhibitor BMS-191563 alone did not significantly influence skeletal muscle mass (BMS-191563= 565 ± 21 mg of muscle/100 g) or contractile function of the MG muscle (Table 1). The pretreatment of rats with BMS-191563 prior to the administration of clenbuterol did not alter the subsequent MG hypertrophic response (Clenbuterol+BMS-191563= 601 ± 31 mg of muscle/100 g) or the associated contractile parameters (Table 1).

BMS-191563 modulation of β -ADR downregulation in skeletal muscle.

A significant decrease in total β -ADR density was observed with clenbuterol in both the soleus and the MG muscles (Figure 1A). The treatment with BMS-191563 alone had no significant effect on total β -ADR density. However, clenbuterol-mediated receptor downregulation was attenuated in the MG and completely prevented in the soleus muscle by BMS-191563 pretreatment (Figure 1A).

BMS-191563 effect on agonist-mediated β -ADR downregulation in cultured neonatal rat cardiac fibroblasts.

Analogous to the MG muscle, the β_2 -adrenergic receptor is the predominant isoform in cultured neonatal rat cardiac fibroblasts (16). A 24 hr exposure of cardiac fibroblasts to isoproterenol (1 μ M) caused a significant decrease in total β -ADR density (Figure 1B). As observed in skeletal muscle, pretreatment (4-6 hrs) with 50 μ M BMS-191563 inhibited isoproterenol-mediated β -ADR downregulation (Figure 1).

BMS-191563 effect on Ras distribution in the soleus muscle.

A putative target of farnesyltransferase is the small GTP-binding protein Ras. The function of both normal and oncogenic Ras has been shown to be absolutely dependent on the physical association to the plasma membrane (16). In the soleus muscle, immunofluorescence experiments revealed immunodetectable Ras predominantly at the plasma membrane (Figure 2A). These data were confirmed by Western blot analysis of total soleus lysate, as immunodetectable Ras was found exclusively in the particulate fraction (Figure 2B). Despite the inhibition of clenbuterol-mediated β -ADR downregulation by the pretreatment with BMS-191563, this effect was not associated with the redistribution of particulate Ras to the cytosolic fraction.

Discussion

Post-translational lipid modification by cytosolic prenyltransferases represents an essential feature of several proteins implicated in the homologous desensitization of the β -ADR (6). The farnesylation of G-protein coupled receptor kinases (GRK) and/or their subsequent recruitment to the membrane by the $\beta\gamma$ -dimer, of which the γ -subunit is either farnesylated or geranylgeranylated, have been implicated in the homologous desensitization of the β -ADR (6, 7, 24). The present study has demonstrated that the *in vivo* treatment of female rats with the farnesyltransferase inhibitor BMS-191563 attenuated the selective β_2 -adrenergic agonist-mediated downregulation of β -ADRs in both the soleus and MG muscles. Consistent with these results, the treatment of cultured neonatal rat cardiac fibroblasts with BMS-191563 prevented isoproterenol-mediated β -ADR downregulation. Thus, these data demonstrate the mechanism(s) implicated in agonist-mediated downregulation of the β -ADR is sensitive to BMS-191563 treatment, thereby suggesting the involvement of farnesylated proteins.

As reported previously, this study has demonstrated that the chronic administration of clenbuterol promotes MG muscle hypertrophy, and alters contractile and half relaxation times (20, 21). The action of clenbuterol in the gastrocnemius muscle occurs via activation of β_2 -adrenergic receptors (15). Although β_2 -adrenergic receptors have been detected in the soleus muscle, their density may be less than other β -ADR subtypes identified, such as the β_3 or the 'atypical' β -adrenergic subtype (25). This disparate distribution pattern of β -ADR subtypes may

in part explain the modest non-significant hypertrophic response of the soleus muscle to clenbuterol treatment, as compared to the MG muscle. In addition, the different fiber makeup of the soleus (slow fibers) and MG (fast fibers) may also contribute to the disparate hypertrophic response elicited by clenbuterol (14). Nonetheless, the chronic administration of clenbuterol resulted in a decrease of total β -ADR density in both muscle types. Based on previous studies regarding agonist-mediated β -ADR subtype regulation, the decrease in total receptor density in both muscle types most likely reflects the downregulation of the β_2 -adrenergic receptor (3). Treatment with BMS-191563 alone had no significant effect on total β -ADR density. In addition, BMS-191563 treatment did not modify contractile indices or the hypertrophic response of the MG muscle following clenbuterol treatment. However, in both muscle types, the pretreatment with BMS-191563 attenuated clenbuterol-mediated β -ADR downregulation. Analogous to the MG muscle, the β_2 -adrenergic receptor represents the predominant subtype in neonatal rat cardiac fibroblasts, whereas neither the 'atypical' nor β_3 -adrenergic subtypes were detected (18). Consistent with the presence of the β_2 -adrenergic receptor, the chronic exposure to isoproterenol decreased total β -ADR density. Moreover, as observed in the soleus and MG muscles, the pretreatment with BMS-191563 prevented isoproterenol-mediated β -ADR downregulation in the rat cardiac fibroblasts. Collectively, these data support the premise that agonist-mediated β -ADR downregulation requires the involvement of one or more farnesylated proteins.

Following a short time (<1 hr) exposure to agonist, desensitization of the β -ADR occurs via the phosphorylation of the receptor by GRKs (10). The GRK-mediated phosphorylation promotes the binding of the regulatory protein β -arrestin, which in turn uncouples the receptor from the stimulatory G-protein, G_s (28). In addition, β -arrestin binding to the phosphorylated receptor represents a prerequisite event for the subsequent sequestration of the receptor (11, 29). Following the long term (>1hr) exposure to agonist, the β -ADR is targeted for degradation, a process generally referred to as downregulation (17). In contrast to desensitization, and sequestration, the biochemical events linked to receptor downregulation remain to be fully elucidated. At least two studies have suggested a casual link between receptor sequestration and downregulation. Barak and colleagues demonstrated the mutation of arginine 322 of the β_2 -adrenergic receptor abolished both sequestration and downregulation (2). In support of these latter findings, Gagnon and colleagues recently demonstrated β -arrestin-mediated sequestration represents in part a prerequisite event coupled to the subsequent downregulation of the β_2 -adrenergic receptor in HEK293 cells (11). It has been established that GRK1 represents a putative target of farnesyltransferase, whereas GRK2 and GRK3 are targeted to the plasma membrane by the $\beta\gamma$ dimer of heterotrimeric G-proteins (7). Moreover, several γ -subunit isoforms of the $\beta\gamma$ dimer are also targets of farnesylation (24). In this regard, farnesyltransferase inhibition would prevent the initial prerequisite events involved in the homologous desensitization of the β -ADR. Indeed, it has been demonstrated that the biological activity of GRK1 and various $\beta\gamma$ dimer

combinations, are exclusively dependent on prenylation (13, 19, 22). Thus, these observations provide a potential mechanism to explain in part the attenuation of agonist-mediated β -ADR downregulation in both skeletal muscle and isolated cardiac fibroblasts by the farnesyltransferase inhibitor BMS-191563.

The small GTP-binding protein Ras is a putative target of farnesyltransferase, and in cultured neonatal rat cardiac myocytes, we have demonstrated the treatment with BMS-191563 resulted in a redistribution of plasma membrane-bound Ras to the cytoplasm (4, 16). To confirm the efficacy of BMS-191563 in skeletal muscle, the cellular localization of Ras was examined in the soleus muscle. Immunofluorescence and western blot analysis revealed Ras was predominantly located on the plasma membrane. However, the treatment with BMS-191563 did not result in a redistribution of particulate Ras to the cytosolic fraction, despite the attenuation of agonist-mediated β -ADR downregulation. A possible explanation for these data in skeletal muscle is the recent observation that both the N- and K-isoforms of Ras are substrates for both farnesyl and geranylgeranyl protein transferases (26, 29). Although the Ras isoform distribution in either the soleus or gastrocnemius muscles is presently unknown, it is possible the particulate Ras identified in the BMS-191563-treated rats is geranylgeranylated. Indeed, this alternative processing of Ras isoforms has been suggested to contribute in part to the resistance of some cancer cell lines to farnesyltransferase inhibitors (12). An alternative explanation may reside within the intrinsic turnover rate of individual farnesylated proteins, as the proteins implicated in β -ADR downregulation may have a faster turnover rate of farnesylation

as compared to Ras, and in this regard, would exhibit a greater sensitivity to the action of BMS-191563.

In conclusion, these data highlight a novel action of the farnesyltransferase inhibitor BMS-191563, as this drug attenuated agonist-mediated β -ADR downregulation in both skeletal muscle and cardiac fibroblasts. These data are consistent with the observation that several well-defined proteins implicated in the homologous desensitization of the β -ADR are targets of farnesyltransferase. Clinically, the desensitization/downregulation of the β -ADRs in the myocardium in the setting of hypertension, as well as congestive heart failure, has been suggested to contribute in part to diminished cardiac function (27). In this regard, countering the down-regulation of the β -ADR may represent a therapeutic approach to partially ameliorate cardiac dysfunction.

Acknowledgments

The contributions of René J.L. Murphy (School of Recreation and Management and Kinesiology, Acadia University, Nova Scotia), Jean-Luc Gauthier and Pierre Corriveau (Dept. of Kinesiology, University of Montreal) are gratefully acknowledged. We also want to thank Charles Laurent (Dept. of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal) for his assistance.

Références

1. **Bagasra, O. and Hansen, J.;** IN SITU PCR TECHNIQUES; New-York; Wiley J.J. and Sans; 1997; 30-31.
2. **Barak, L.S., L. Menard, S.S.G. Ferguson, A. Colapietro, M. Caron.** The conserved seven-transmembrane sequence NP(X)_{2,3}Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the β_2 -adrenergic receptor. *Biochemistry* 34:15407-15414, 1995.
3. **Bouvier, M., G. Rousseau.** Subtype-specific regulation of the β -adrenergic receptors. *Adv. Pharmacol.* 42:433-438, 1998
4. **Calderone, A., N. Abdelaziz, F. Colombo, K.L. Schrieber, H. Rindt.** A farnesyltransferase inhibitor attenuates cardiac myocyte hypertrophy and gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32:1127-1140, 2000.
5. **Calderone, A., C.M. Thaik, N. Takahashi, D.L.F. Chang, W.S. Colucci.** Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 101:812-818, 1998.
6. **Chuang, T.T., L. Iacovelli, M. Sallese, A. De Blasi.** G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 17 : 416-421, 1996.

7. **Daaka, Y., J.A. Pitcher, M. Richardson, R.H. Stoffel, J.D. Robishaw, et R.J. Lefkowitz.** Receptor and G $\beta\gamma$ isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2180-2185, 1997.
8. **Del Villar, K., D. Dorin, I. Sattler, J. Urano, P. Poulet, N. Robison, H. Mitsuzawa, F. Tamanoi.** C-terminal motifs found in Ras-superfamily G-proteins : CAAX and C-seven motifs. *Biochem. Soc. Transac.* 24: 709-713, 1996.
9. **Ferguson, S.S.G., J. Zhang, L.S. Barak, M.G. Caron.** G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: regulators of G-protein-coupled receptor sequestration. *Biochem. Soc. Trans.* 24:953-959, 1996.
10. **Freedman, N.J., S.B. Liggett, D.E. Drachman, G. Pei, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz.** Phosphorylation and desensitization of the human β -adrenergic receptor:involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270:17953-17961, 1995.
11. **Gagnon A.W., L. Kallal, J.L. Benovic.** Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-mediated downregulation of the β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 273:6976-6981, 1998.
12. **Gibbs, J.B., A. Oliff, N.E. Kohl.** Farnesyltransferase inhibitors:ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell* 77:175-178, 1994.
13. **Inglese, J., J.F. Glickman, W. Lorenz, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz.** Isoprenylation of a protein kinase : requirement of farnesylation/alpha-carboxyl methylation for full enzymatic activity of rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* 267: 1422-1425, 1992.

14. **Kim, Y.S. and Sainz, R.D.** β -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci.* 50: 397-407, 1992.
15. **Kim, Y.S., R.D. Sainz, P. Molenaar and R.J. Summers.** Characterization of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1783-1789, 1991.
16. **Koblan, K.S., N.E. Kohl, C.A. Omer, N.J. Anthony, M.W. Conner, S.J. deSolms, T.M. Williams, S.L. Graham, G.D. Hartman, A. Oliff and J.B. Gibbs.** Farnesyltransferase inhibitors: a new class of cancer chemotherapeutics. *Biochem. Soc. Transac.* 24: 688-692, 1996.
17. **Lohse, M.J.** Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1179:171-188, 1993.
18. **Long, C.S., W.E. Hartogensis, P.C. Simpson.** Beta-adrenergic stimulation of cardiac non-myocytes augments the growth-promoting activity of non-myocyte conditioned medium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25:915-925, 1993.
19. **Matsuda, T., Y. Hashimoto, H. Ueda, T. Asano, Y. Matsuura, T. Doi, T. Takao, Y. Shimonishi, Y. Fukada.** Specific Isoprenyl group linked to transducin γ -subunit is a determinant of its unique signaling properties among G-proteins. *Biochemistry* 37:9843-9850, 1998.
20. **Murphy, R.J.L., L. Béliveau, K.L. Seburn, P.F. Gardiner.** Clenbuterol has a greater effect on untrained than previously trained skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 73 : 304-310, 1996.

21. **Murphy, R.J.L., P.F. Gardiner, G. Rousseau, M. Bouvier, L. Béliveau.** Chronic β -blockade increases skeletal muscle β -adrenergic-receptor density and enhances contractile force. *J. Appl. Physiol.* 83 : 459-465, 1997.
22. **Myung, C.S., H. Yasuda, W.W. Liu, T.K. Harden, J.C. Garrison.** Role of isoprenoid lipids on the heterotrimeric G protein γ subunit in determining effector activation. *J. Biol. Chem.* 274:16595-16603, 1999.
23. **Pitcher, J.A., K. Touhara, E.S. Payne, R.J. Lefkowitz.** Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* 270: 11707-11710, 1995.
24. **Ray, K., C. Kunsch, L. Bonner, J.D. Robishaw.** Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *J. Biol. Chem.* 270:21765-21777.
25. **Roberts, S.J., P. Molenaar, R.J. Summers.** Characterization of propranolol-resistant (-)- ^{125}I -cyanopindolol binding sites in the rat soleus muscle. *Br. J. Pharmacol.* 109:344-352, 1993.
26. **Rowell, C.A., J.J. Kowalczyk, M.D. Lewis, A.M. Garcia.** Direct demonstration of geranylgeranylation and farnesylation of Ki-ras in vivo. *J. Biol. Chem.* 272:14093-14097, 1997.

27. **Schafers, M., D. Dutka, C.G. Rhodes, A.A. Lammerstsma, F. Hermansen, O. Schober, P.G. Camici.** Myocardial presynaptic and postsynaptic autonomic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res.* 82: 57-62, 1998.
28. **Zhang, J., L.S. Barak, P.H. Anborgh, S.A. Laporte, M.G. Caron, S.S.G. Ferguson.** Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/ β -arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem.* 274:10999-11006, 1999.
29. **Zhang, F.L., P. Kirshmeier, D. Carr, L. James, R.W. Bond, L. Wang, R. Patton, W.T. Windsor, R. Syto, R. Zhang, W.R. Bishop.** Characterization of Ha-ras, N-ras, Ki-ras4a, and Ki-ras4b as in vitro substrates for farnesyl protein transferase and geranylgeranyl protein transferase type 1. *J. Biol. Chem.* 272:10232-10239, 1997.

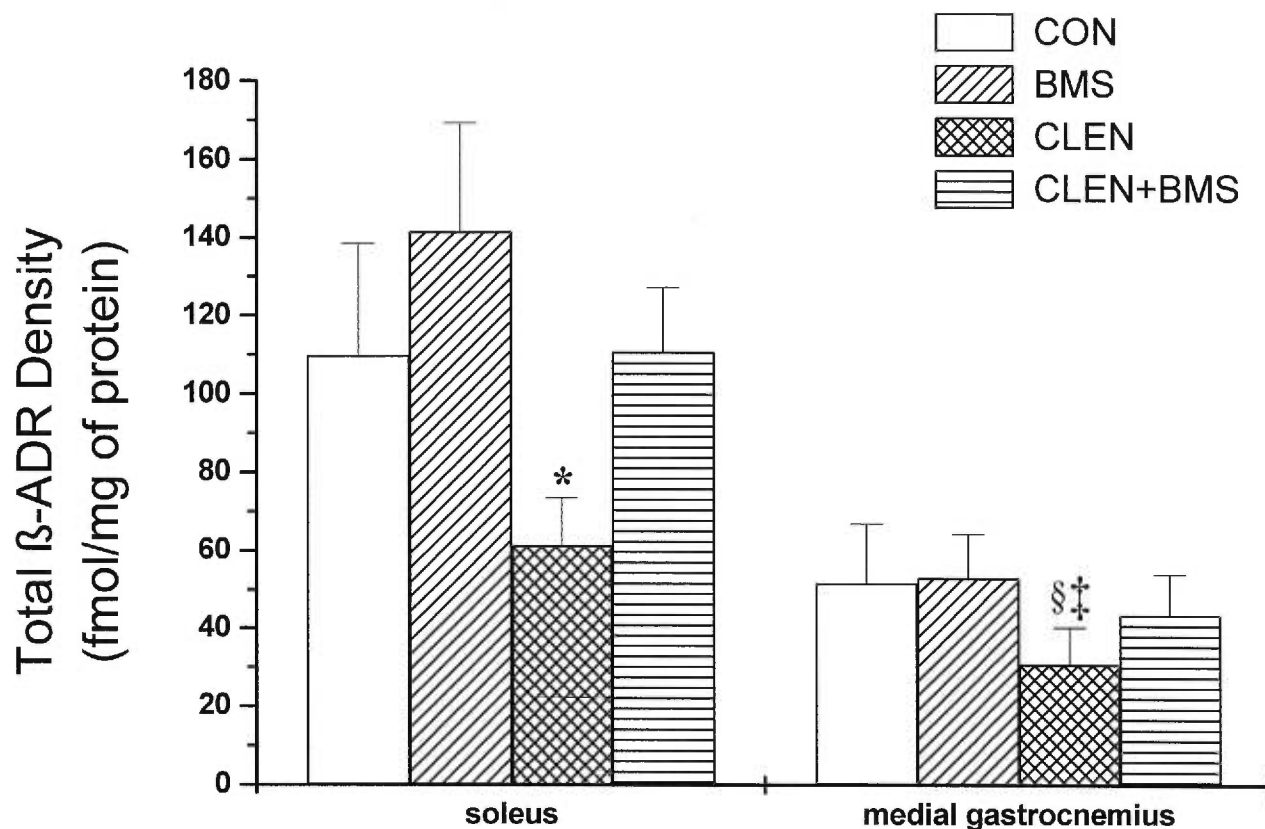


Figure 1A. β -adrenergic receptor regulation in skeletal muscle. The treatment with clenbuterol (CLEN) decreased total β -adrenergic receptor (β -ADR) density in the soleus, and MG muscles, as compared to untreated rats (CON). The treatment with BMS-191563 (BMS) had no significant effect on β -ADR density. However, the pretreatment with BMS attenuated the agonist-mediated decrease in total β -ADR density in skeletal muscle. * Significantly different from all values ($p < 0,05$). § Significantly different from the control value ($p < 0,05$). ‡ Significantly different from the BMS value ($p < 0,05$).

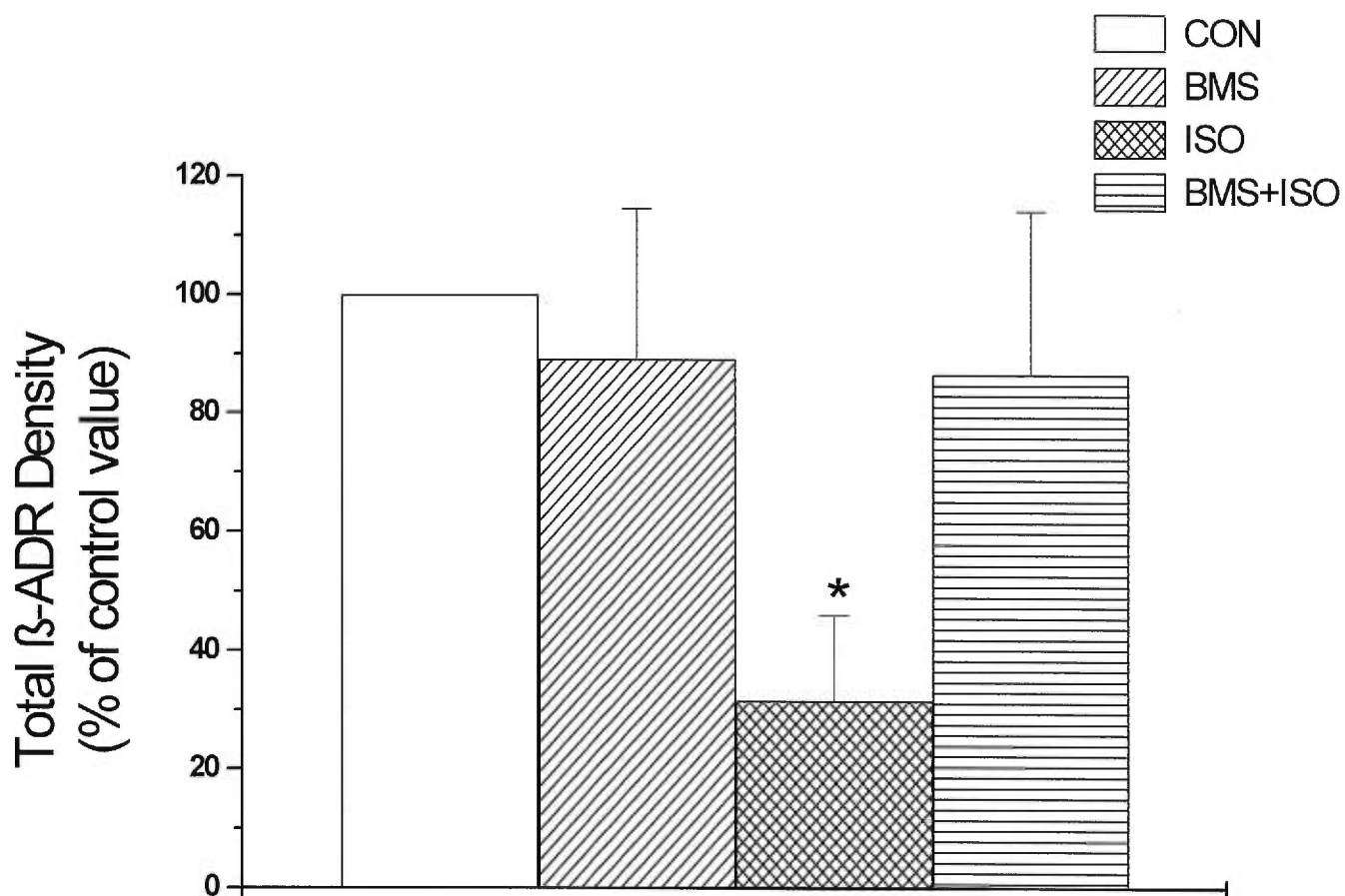


Figure 1B. β-adrenergic receptor regulation cardiac fibroblasts. In cultured neonatal rat cardiac fibroblasts, isoproterenol (ISO) treatment decreased total β-adrenergic receptor (β-ADR) density compared to control (CON). The pretreatment with BMS-191563 (BMS) inhibited the decrease in total β-ADR density following the chronic exposure to agonist. * Significantly different from all values ($p < 0,05$).

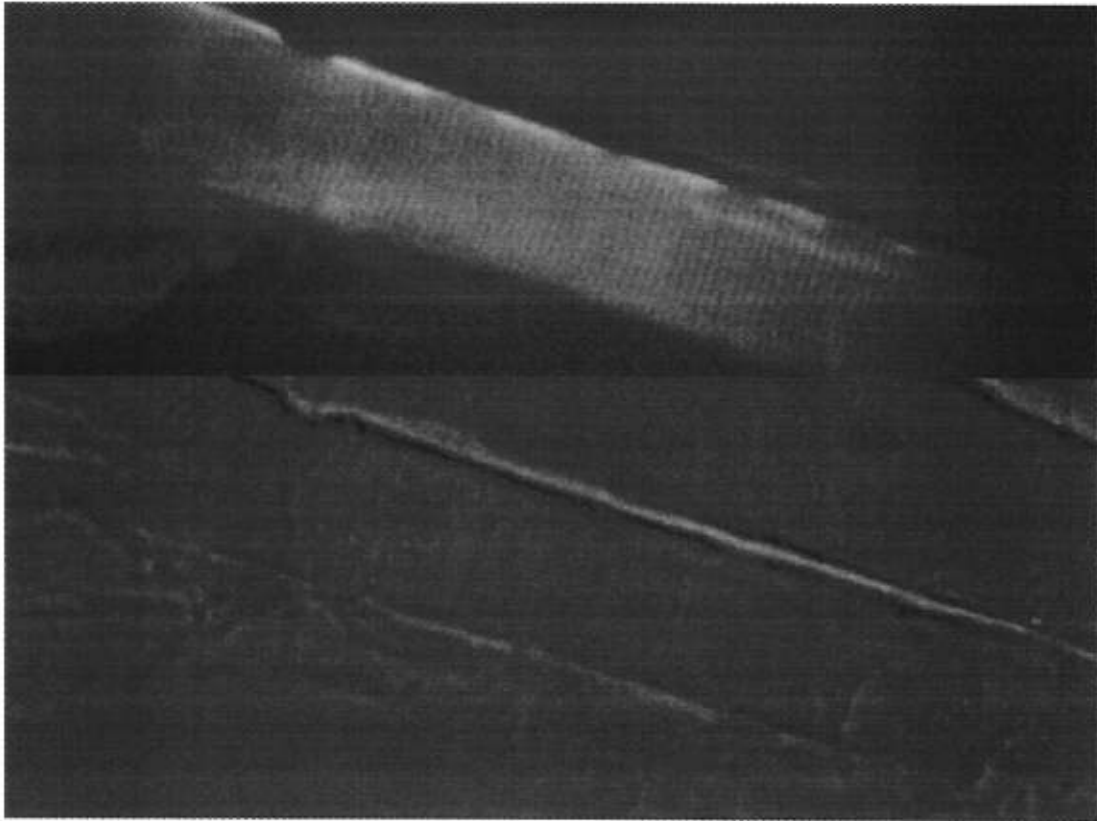


Figure 2A. Ras distribution in the soleus muscle. Utilizing an immunofluorescence approach, the small GTP-binding protein Ras was detected primarily along the plasma membrane in the soleus muscle (Upper panel). The lower panel represents a phase-contrast photomicrograph of the soleus muscle, and was photographed at 250 x magnification.

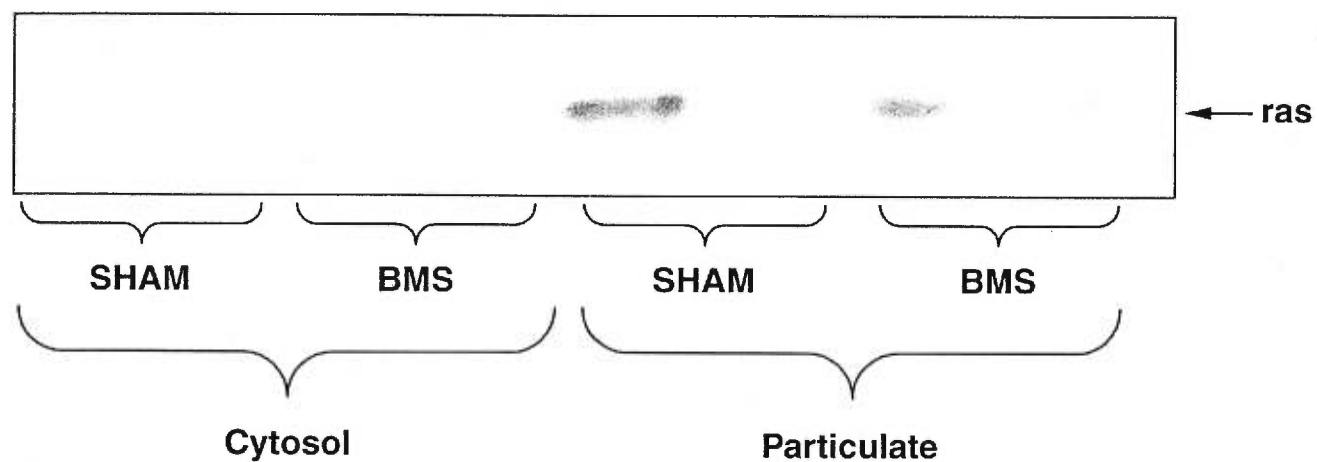


Figure 2B. Ras distribution in the soleus muscle.

Western blot analysis confirmed this finding, as Ras was detected exclusively in the particulate fraction of soleus lysates. The chronic treatment with BMS-191563 (BMS) did not result in the redistribution of particulate Ras to the cytosolic fraction.

Table 1. Effect of BMS and Clenbuterol on contractile and half-relaxation times.

	Control	BMS	Clenbuterol	BMS- Clenbuterol
Contractile time (s)	17,43 ± 1.48	17,86 ± 0.69	16,38 ± 0.8*	15,79 ± 1.31*
Half-relaxation time (s)	11,79 ± 0.16	12,68 ± 1.35	8,34 ± 0.83*	8,7 ± 1.35*

* main effect of clenbuterol

Chapitre 5 : Discussion Générale

Les résultats des études présentées dans cette thèse ont permis d'évaluer la contribution de différents facteurs à l'augmentation du spillover et à la diminution du pourcentage d'extraction de la NA lors de la contraction musculaire. De plus, ils ont permis de déterminer certains mécanismes impliqués dans la régulation négative des récepteurs β_2 -adrénergiques. Dans un premier temps, nous avons évalué la contribution du débit sanguin et de la bradykinine à l'augmentation du spillover de NA lors de la contraction dans un modèle de muscle squelettique *in situ* chez le Chien. Les résultats obtenus dans ces études suggèrent que l'augmentation du débit sanguin ainsi que la production de bradykinine dans le muscle contribuent de façon importante à l'augmentation du spillover de NA lors de la contraction. Dans ces études nous avons aussi regardé l'effet sur le pourcentage d'extraction de la NA lors de la contraction musculaire. Nous n'avons observé aucun effet du débit sanguin et de la bradykinine sur le pourcentage d'extraction de la NA. Également, nous avons voulu déterminer les mécanismes impliqués dans la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques causée par une stimulation chronique par un agoniste dans le muscle squelettique. Les résultats de cette étude suggère que l'inhibition de la farnésyltransférase pourrait inhiber la régulation négative des récepteurs β_2 -adrénergiques.

Modulation du spillover de noradrénaline lors de la contraction musculaire

Lors de l'exercice, l'augmentation du spillover total de NA serait principalement due à une augmentation du spillover dans les lits vasculaires du muscle squelettique (Hasking et al. 1988; Péronnet et al. 1988). Péronnet et al. (1988) ont observé une augmentation du spillover de NA dans les lits vasculaires du muscle squelettique de 37 pg/ml au repos à 400 pg/ml lors de l'exercice, donc une augmentation de onze fois sa valeur au repos. Plusieurs facteurs pourraient contribuer à l'augmentation du spillover de NA dans le muscle squelettique tel qu'expliqué dans l'introduction de cette thèse. Les résultats présentés ici suggèrent une contribution importante du débit sanguin et de la production de bradykinine à l'augmentation du spillover de NA observée dans le muscle squelettique lors de la contraction. Ainsi, à partir des résultats obtenus dans ces études nous pouvons estimer la contribution relative de ces facteurs à l'augmentation du spillover de NA observée dans les régions vasculaires du muscle squelettique lors de l'exercice (Figure 4). Dans notre première étude, nous avons observé qu'une augmentation du débit sanguin de 33% lors de la contraction musculaire, ce qui équivaut à une augmentation de 400% le débit au repos, a causé une augmentation du spillover de NA de 246 pg/min à 880 pg/min, c'est-à-dire une augmentation de trois à quatre fois sa valeur au repos. Donc, si on reporte cette augmentation sur celle obtenue

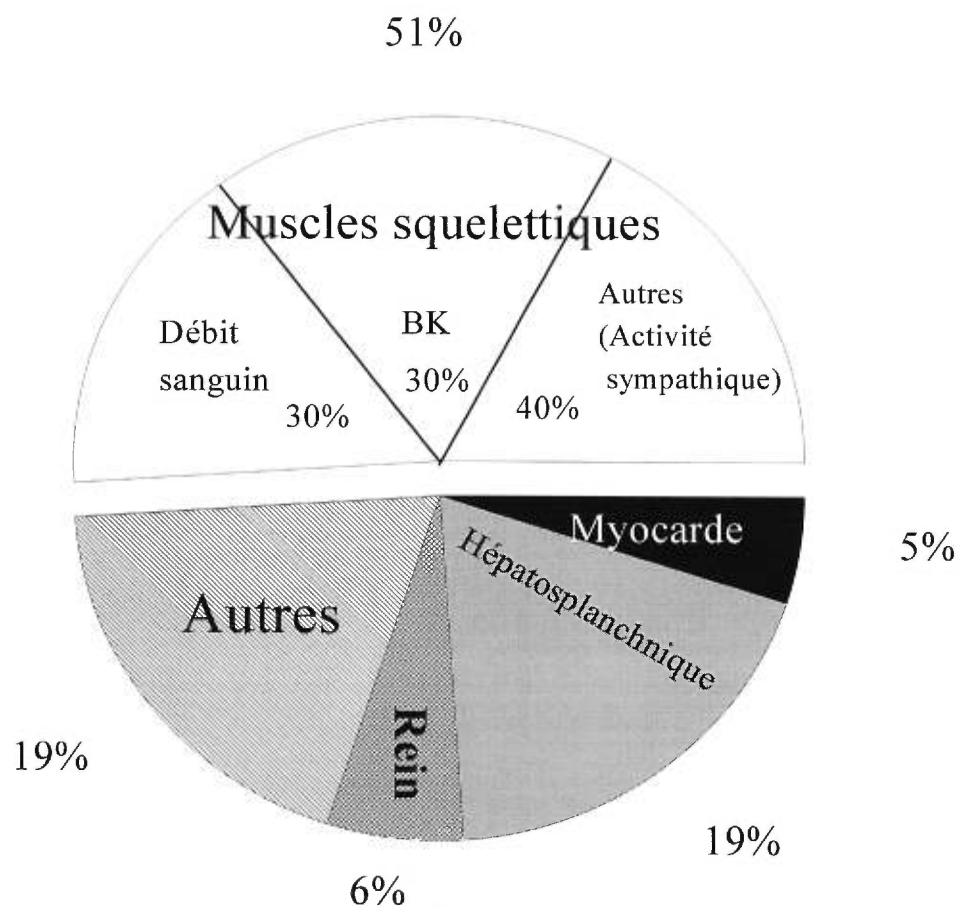


Figure 4. Contribution relative des différents lits vasculaires à l'augmentation du spillover de NA total tel que rapporté par Péronnet et al. (1988) (pourcentages présentés à l'extérieur de la figure) et contribution de différents facteurs à l'augmentation du spillover de NA dans le muscle squelettique lors de l'exercice (pourcentages présentés à l'intérieur de la figure). BK, bradykinine.

dans l'étude de Péronnet et al. (1988), l'augmentation du débit sanguin pourrait expliquer environ 30% de l'augmentation du spillover de NA observée lors de l'exercice. Dans notre deuxième étude, le blocage des récepteurs B₂ à la bradykinine par le HOE 140 a causé une baisse du spillover de NA de 558 pg/min à 181 pg/min lors de la contraction musculaire, c'est-à-dire une baisse de trois à quatre fois sa valeur. Ainsi, la bradykinine endogène, comme le débit sanguin, pourrait contribuer à une augmentation du spillover de NA dans les lits vasculaires du muscle squelettique d'environ 30% lors de l'exercice. Donc, une contribution d'environ 40% resterait à être déterminée. L'augmentation de l'activité sympathique dans les muscles squelettiques lors de l'exercice (Thompson et al. 1998) contribue sûrement de façon importante à l'augmentation du spillover de NA. De plus, d'autres facteurs pourraient aussi être impliqués, par exemple l'augmentation des concentrations d'A (Chang et al. 1989 ; Coppes et al. 1993, 1995; Dahlof et al. 1987; Kahan et al. 1987, 1988 ; Stein et al. 1993) et de la production d'angiotensine I (Kahan et al. 1997 ; Li et Zimmerman 1991) et II (Li et Zimmerman 1991 ; Schwieler et al. 1991, 1994). Toutefois, les contributions relatives de ces différents facteurs à l'augmentation du spillover de NA mentionnées ici ne sont que des estimations. Elles varieront sûrement selon l'exercice (type, durée et intensité) et les conditions expérimentales, par exemple l'état d'entraînement, le sexe et l'âge du sujet et les conditions environnementales comme la température.

Modulation du pourcentage d'extraction de la noradrénaline lors de la contraction musculaire

Lors de l'exercice, plusieurs auteurs ont observé une baisse du pourcentage d'extraction de la NA (Péronnet et al. 1988 ; Savard et al. 1987). Péronnet et al. (1988) ont suggéré que cette baisse du pourcentage d'extraction serait due à l'augmentation du débit sanguin lors de l'exercice. En effet, lorsque le débit sanguin augmente, le temps de transit de la NA dans les capillaires serait diminué et ainsi, moins de NA pourrait diffuser vers les tissus adjacents (Chang et al. 1991; Grossman et al. 1991). Toutefois, dans notre première étude, nous n'avons observé aucun effet du débit sanguin sur le pourcentage d'extraction de NA. De plus, dans notre deuxième étude, une baisse du pourcentage d'extraction a pu être observée lors de la contraction musculaire sans augmentation du débit sanguin. Ainsi, nos résultats suggèrent que le débit sanguin ne serait probablement pas le principal facteur impliqué dans la baisse du pourcentage d'extraction observée lors de l'exercice. Aussi, aucun effet de la bradykinine sur le pourcentage d'extraction n'a été observé. Ainsi, aucun des facteurs étudiés ici ne contribuerait significativement à la baisse du pourcentage d'extraction de NA lors de la contraction musculaire. Donc, l'implication de d'autres facteurs, par exemple la baisse du pH, demeure à être déterminée.

Désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques lors de l'exercice

Dans notre dernière étude, initialement nous voulions évaluer la contribution de Ras, un proto-oncogène, à l'hypertrophie musculaire causée par l'administration chronique d'agonistes β_2 -adrénergiques. En effet, les mécanismes impliqués dans cet effet ne sont pas bien connus. De plus, certaines études dans notre laboratoire suggéraient que les canaux calciques de type L n'étaient pas impliqués dans cette hypertrophie musculaire (Murphy et al. 1999). Nous souhaitons poursuivre en étudiant l'effet de Ras. En effet, Ras joue un rôle important dans plusieurs voies de signalisation impliquées dans la croissance, la différenciation et la transformation cellulaire (Boguski et McCormick 1993; McCormick 1994; Satoh et al. 1992) et peut être stimulé par certains agonistes (thyroïdolibérine et adrénaline) de récepteurs couplés à des protéines G (Koch et al. 1994 ; Ohmichi et al. 1994). Donc nous avons voulu évaluer s'il était impliqué dans l'hypertrophie musculaire causée par l'administration de clenbuterol, un agoniste β_2 -adrénergique, en inhibant sa farnésylation avec le BMS 191563 chez le Rat. Les résultats obtenus suggèrent que la farnésylation de Ras n'a pas été inhibée par le traitement au BMS 191563 et aucun effet n'a été observé sur l'hypertrophie musculaire. Toutefois, un résultat secondaire s'est avéré important et intéressant. En effet, nous avons observé que le traitement au BMS 191563 inhibait la régulation négative causée par l'administration chronique de l'agoniste β_2 -adrénergique. Nous avons donc voulu approfondir cette observation en regardant si cet effet était reproductible dans d'autres types de cellules, plus

particulièrement les fibroblastes qui sont également pourvus de récepteurs β -adrénergiques.

Cette observation pourrait avoir non seulement des implications dans des pathologies où il y a régulation négative des récepteurs β -adrénergiques, par exemple dans le cœur lors de l'hypertension, mais pourrait aussi se rapprocher de ce qui se produit lors de l'exercice alors que les concentrations de catécholamines circulantes augmentent de cinq à dix fois leurs valeurs au repos (Galbo et al. 1975, 1976 ; Naveri 1985). Tel que mentionné précédemment, cette augmentation serait due à une augmentation du spillover de NA total mais plus particulièrement des régions vasculaires du muscle squelettique (Hasking et al. 1988; Péronnet et al. 1988). Ainsi, il est possible que lors de l'exercice prolongé les récepteurs β -adrénergiques dans le muscle soient soumis à de hautes concentrations de catécholamines pendant une durée prolongée ce qui pourrait causer une désensibilisation. En effet, il est bien connu que les récepteurs β_2 adrénergiques se désensibilisent suite à l'exposition à un agoniste ce qui peut mener à une régulation négative de ces récepteurs si l'agoniste est présent pour plus d'une heure (Lohse 1993). À notre connaissance, seul Buckenmeyer et al. (1990) ont étudié l'effet d'un exercice aigu sur la densité des récepteurs β -adrénergiques. Ces auteurs n'ont observé aucun effet d'un exercice de 20 minutes à une intensité moyenne sur la densité des récepteurs dans le muscle squelettique. Toutefois, il est possible que cette durée ne soit pas suffisante pour induire une régulation négative des récepteurs β -adrénergiques et que lors d'un exercice plus long, une régulation négative puisse être observée. En effet, certaines

études sur la densité des récepteurs β -adrénergiques des lymphocytes, qui sont, comme dans le muscle squelettique, surtout du type β_2 , suggèrent qu'il pourrait y avoir une régulation négative suite à un exercice aigu (Butler et al. 1983 ; Fitzgerald et al. 1981 ; Frey et al. 1989 ; Krawietz et al. 1985 ; Maki 1989). Cependant, les mécanismes sous-jacents à cette régulation négative ne sont pas bien connus. Il a été suggéré que la séquestration des récepteurs serait nécessaire à cette réponse (Barak et al. 1995 ; Gagnon et al. 1998). Dans notre dernière étude, nous avons observé une inhibition par le BMS 191563, un inhibiteur de la farnésyltransférase, de la régulation négative causée par une stimulation chronique par un agoniste β_2 -adrénergique, le clenbuterol. Ainsi, il est possible que la farnésyltransférase soit impliquée dans la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques dans le muscle. De plus, nos résultats suggèrent que l'implication de la farnésyltransférase ne serait pas due à une modification de Ras. En effet, malgré que le traitement au BMS n'a pas eu d'effet sur la farnesylation de Ras, celle-ci était présente dans les fibroblastes en culture. Toutefois, l'inhibition de la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques était présente dans les muscles squelettiques ainsi que dans les fibroblastes en culture. Ainsi, cet effet semble indépendant de l'état de farnesylation de Ras.

Chapitre 6 : Conclusion

En conclusion, ces études ont démontré que le débit sanguin et la production de bradykinine pourraient contribuer de façon importante à l'augmentation du spillover de NA du muscle squelettique observée lors de la contraction. Ces résultats contribuent donc à avoir une meilleure connaissance de la modulation du spillover dans le muscle squelettique lors de l'exercice. Toutefois, ces facteurs n'expliqueraient pas complètement cette augmentation dans nos études. Ainsi, d'autres travaux devront être effectués afin d'évaluer la contribution de d'autres facteurs, par exemple l'activité sympathique et l'angiotensine. De plus, nos résultats suggèrent que le principal facteur impliqué dans la baisse du pourcentage d'extraction observée lors de la contraction musculaire n'est pas le débit sanguin et que la bradykinine ne semble pas avoir d'effet sur l'extraction. Ainsi, les facteurs impliqués dans la modulation du pourcentage d'extraction lors de la contraction musculaire demeurent à être déterminés. Finalement, nous avons démontré que la farnésyltransférase semble impliquée dans la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques suite à l'exposition chronique à un agoniste. Cependant, puisque l'inhibition de la farnésyltransférase ne bloque pas complètement la régulation négative, d'autres études seront nécessaires afin de déterminer tous les facteurs impliqués dans la modulation de la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques. L'inhibition de la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques pourrait également avoir des implications importantes dans le milieu clinique. En

effet, cette régulation négative est impliquée dans plusieurs pathologies. Par exemple, lors de l'hypertension et de la cardiomyopathie hypertrophique, la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques dans le cœur pourrait être responsable d'une baisse de la fonction cardiaque (Schafers et al. 1998).

Références

Abe, H., Minokoshi, Y. et Shimazu, T. Effect of a β_3 -adrenergic agonist, BRL 35135A, on glucose uptake in rat skeletal muscle *in vivo* and *in vitro*. J. Endocrinol. 139: 479-486, 1993.

Abrahamsen, J. et Nedergaard, O.A. Presynaptic action of adrenaline on adrenoceptors modulating stimulation-evoked ^3H -noradrenaline release from rabbit isolated aorta. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 339: 281-287, 1989.

Abrahamsen, J. et Nedergaard, O.A. Presynaptic modulation by adrenaline of ^3H -noradrenaline release in rabbit ear artery. Pharmacology 42: 79-85, 1991.

Achike, F.I. et Ballard, H.J. Influence of stimulation parameters on the release of adenosine, lactate and CO_2 from contracting dog gracilis muscle. J. Physiol. (Lond.) 463: 107-121, 1993.

Ahlquist, R.P. A study of the adrenotropic receptors. Am J. Physiol. 153: 586-600, 1948.

Allen, J.M., Bircham, P.M.M., Bloom, S.R. et Edwards, A.V. Release of neuropeptide Y in response to splanchnic nerve stimulation in the conscious calf. *J. Physiol.* 357: 401-408, 1984.

Astrup, A., Bulow, J., Madsen, J. et Christensen, N.J. Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *Am. J. Physiol.* 248: E507-E515, 1985.

Atrakchi, A., Carlsen, R.C., Gray, S.D., Michel, A. et Hance, A.J. β -receptor properties in soleus muscles from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens.* 14: 54-60, 1989.

Barak, L.S., Menard, L., Ferguson, S.S.G., Colapietro, A., Caron, M. The conserved seven-transmembrane sequence NP(X)_{2,3}Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the β_2 -adrenergic receptor. *Biochemistry* 34:15407-15414, 1995.

Bates, P.C. et Pell, J.M. Action and interaction of growth hormone and the beta-agonist, clenbuterol, on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice. *Br. J. Nutr.* 65: 115-129, 1991.

Beaty, O. et Donald, D.E. Role of potassium in the transient reduction in vasoconstrictive responses of muscle resistance vessels during rhythmic exercise in dogs. *Circ. Res.* 41: 452-460, 1977.

Beermann, D.H., Butler, W.R., Hogue, D.E., Fishell, V.K., Dalrymple, R.H., Ricks, C.A. et Scanes, C.G. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *J. Anim. Sci.* 65: 1514-1524, 1987.

Béliveau, L. Sources, cinétique et devenir des catécholamines circulantes au repos et à l'exercice chez le Chien. Thèse de doctorat, Université de Montréal, 1989, 276 p.

Béliveau, L., Péronnet, F., Trudeau, F., Brisson, G. et Nadeau, R. Plasma catecholamines in the aorta and the phrenicoabdominal vein in exercising dogs. *J. Appl. Physiol.* 69: 604-608, 1990.

Bell, C. Dopamine: Precursor or neurotransmitter in sympathetically innervated tissues? *Blood Vessels.* 24: 234-239, 1987.

Benbachir-Lamrini, L., Koubi, H., Sempore, B., Mayet, M.H., Frutoso, J., Cottet-Emard, J.M. et Favier, R.J. Soleus muscle alterations in spontaneously hypertensive rats are not dependent on activation of β_2 -adrenergic receptors. *J. Auton. Nerv. Syst.* 44: 161-170, 1993.

Berlan, M., Galitzky, J., Bousquet-Melou, A., Lafontan, M. et Montastruc, J.L. β_3 -adrenoceptor-mediated increase in cutaneous blood flow in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 1444-1451, 1994.

Berzetei-Gurske, I.P., Schwartz, R.W. et Toll, L. Determination of activity for nociceptin in the mouse vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 302: R1-R2, 1996.

Bitran, M., Torres, G. et Huidobro-Toro, J.P. Neuropeptide Y inhibits ^3H -noradrenaline release in the rat vas deferens independently of cAMP levels. *Neurochem. Int.* 28: 309-317, 1996.

Blais, C. Jr., Adam, A., Massicotte, D., et Péronnet, F. Increase in blood bradykinin concentration after eccentric weight-training exercise in men. *J. Appl. Physiol.* 87: 1197–1201, 1999.

Blandizzi, C., Tognetti, M., Colucci, R. et Del Tacca, M. Histamine H_3 receptors mediate inhibition of noradrenaline release from intestinal sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* 129: 1387-1396, 2000.

Boegehold, M.A. et Bohlen, H.G. Arteriolar diameter and tissue oxygen tension during muscle contraction in hypertensive rats. *Hypertension* 12: 184-191, 1988.

Boehm, S. et Huck, S. A somatostatin receptor inhibits noradrenergic release from chick sympathetic neurons through pertussis toxin-sensitive mechanisms: comparison with the action of α_2 -adrenoceptors. *Neuroscience* 73: 595-604, 1996.

Boguski, M.S. et McCormick, F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366 : 643-654, 1993.

Boicos, K.M., Cox, S.L. et Story, D.F. Modulation of noradrenergic transmission in rat isolated trachea by angiotensin I and angiotensin II. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358: R293, 1998.

Boss, O., Bachman, E., Vidal-Puig, Zhang, C.-Y., Peroni, O. et Lowell, B.B. Role of the β_3 -adrenergic receptor and /or a putative β_4 -adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 870-876, 1999.

Bowman, W.C. Effects of adrenergic activators and inhibitors on the skeletal muscles. Dans: Szekeres, L. *Adrenergic Activators and Inhibitors part II*. Springer-Verlag: Berlin. 1981; 47-128.

Bowman, W.C. et Raper, C. the effects of adrenaline and other drugs affecting carbohydrate metabolism on contractions of the rat diaphragm. *Br. J. Pharmacol.* 23: 184-200, 1964.

Brasch, H., Sieroslawski, I. et Dominiak, P. Angiotensin II increases norepinephrine release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors. *Hypertension* 22: 752-757, 1993.

Brawley, L., Shaw, A.M. et MacDonald, A. β_1 -, β_2 - and atypical β -adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* 129: 637-644, 2000.

Brown, M.J., Jenner, D.A., Allison, D.J. et Dollery, C.T. Variations in individual organ release of noradrenaline measured by an improved radioenzymatic technique; limitations of peripheral venous measurements in the assessment of sympathetic nervous activity. *Clin. Sci. Lond.* 61: 585-590, 1981.

Bruckmaier, R.M. et Blum, J.W. Responses of calves to treadmill exercise during beta-adrenergic agonist administration. *J. Anim. Sci.* 70: 2809-2821, 1992.

Buckenmeyer, P.J., Goldfarb, A.H., Partilla, J.S., Pineyro, M.A. et Dax, E.M. Endurance training, not acute exercise, differentially alters β -receptors and cyclase in skeletal fiber types. *Am. J. Physiol.* 258: E71-E77, 1990.

Bunemann, M., Lee, K.B., Pals-Rylaarsdam, R., Roseberry, A.G. et Hosey, M.M. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 169-192, 1999.

Burcher, B. ORL₁ receptor-mediated inhibition by nociceptin of noradrenaline release from perivascular sympathetic nerve endings of the rat tail artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358: 682-685, 1998.

Burcher, E. et Garlick, D. Effects of exercise metabolites on adrenergic vasoconstriction in the gracilis muscle of the dog. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 192: 149-156, 1975.

Burnstock, G. Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves. *Neurochem. Int.* 17 : 357-368, 1990.

Butler, J., Kelly, J.G., O'Malley, K. et Pidgeon, F. Beta-adrenoceptor adaptation to acute exercise. *J. Physiol.* 344: 113-117, 1983.

Buyse, J., Decuypere, E., Huyghebaert, G. et Herremans, M. The effect of clenbuterol supplementation on growth performance and on plasma hormone and metabolite levels of broilers. *Poult. Sci.* 70: 993-1002, 1991.

Bystrom, S. et Sjogaard, G. Potassium homeostasis during and following exhaustive submaximal static handgrip contractions. *Acta Physiol. Scand.* 142: 59-66, 1991.

Cairns, S.P. et Dulhunty, A.F. Beta adrenergic potentiation of E-C coupling increases force in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 16: 1317-1325, 1993a.

Cairns, S.P. et Dulhunty, A.F. The effects of beta-adrenoceptor activation on contraction in isolated fast- and slow-twitch skeletal muscle fibres of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 110: 1133-1141, 1993b.

Cairns, S.P. et Dulhunty, A.F. Beta-adrenoceptor activation shows high-frequency fatigue in skeletal muscle fibers of the rat. *Am. J. Physiol.* 266: C1204-C1209, 1994.

Cairns, S.P., Westerblad, H. et Allen, D.G. Changes of tension and $[Ca^{2+}]_i$ during beta-adrenoceptor activation of single, intact fibres from mouse skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 425: 150-155, 1993.

Calhau, C., Martel, F., Moura, D. et Azevedo, I. Somatostatin inhibits the release of noradrenaline induced by electrical stimulation of the rat mesenteric artery. *Pharmacol. Res.* 41: 497-501, 2000.

Calo, G., Rizzi, A., Bogoni, G., Neugebauer, V., Silvadori, S., Guerrini, R., Biachi, C. et Regoli, D. The mouse vas deferens : a pharmacological preparation sensitive to nociceptin. *Eur. J. Pharmacol.* 311 : R3-R5, 1996.

Canfield, P. et Abdul-Ghaffar, T. Stimulation of bicarbonate secretion by atypical β -receptor agonists in rat caecum in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 216: 293-297, 1992.

Canfield, P. et Parskeva, P. β -adrenoceptor agonist stimulation of acid secretion by rat stomach in vitro is mediated by "atypical" β -adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 106: 583-586, 1992.

Challiss, R.A., Arch, J.R. et Newsholme, E.A. The rate of substrate cycling between fructose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate in skeletal muscle. *Biochem. J.* 221: 153-161, 1984.

Chaliss, R.A., Leighton, B., Wilson, S., Thurlby, P.L. et Arch J.R.S. An investigation of the beta-adrenoceptor that mediates metabolic responses to the novel agonist BRL 28410 in rat soleus muscle. *Biochem. Pharmacol.* 37: 947-950, 1988.

Chang, P.C., Grossman, E., Kopin, I.J. et Goldstein, D.S. On the existence of functional beta-adrenoceptors on vascular sympathetic nerve endings in the human forearm. *J. Hypertens.* 12: 681-690, 1994.

Chang, P.C., Grossman, E., Kopin, I.J. et Goldstein, D.S. On the existence of functional angiotensin II receptors on vascular sympathetic nerve terminals in human forearm. *J. Hypertens.* 13: 1275-1284, 1995.

Chang, P.C., Kriek, E., van der Krogt, J.A., Blauw, G.J. et van Brummelen, P. Stimulation of norepinephrine release by peripheral presynaptic β -adrenoceptors. *Clin. Exp. - Theory Practice A11*: 311-321, 1989.

Chang, P.C., Kriek, E., van der Krogt, J.A. et van Brummelen, P. Does regional norepinephrine spillover represent local sympathetic activity? *Hypertension.* 18: 56-66, 1991.

Chang, P.C., van der Krogt, J.A. et van Brummelen, P. Demonstration of neuronal and extraneuronal uptake of circulating norepinephrine in the forearm. *Hypertension.* 9: 647-653, 1987.

Chiasson, J.L., Shikama, H., Chu, D.T. et Exton, J.H. Inhibitory effect of epinephrine on insulin-stimulated glucose uptake by rat skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 68: 706-713, 1981.

Choo, J.J., Horan, M.A., Little, R.A. et Rothwell, N.J. Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by β_2 -adrenoceptor activation. *Am. J. Physiol.* 263: E50-E56, 1992.

Christensen, N.J. et Galbo, H. Sympathetic nervous activity during exercise. *Ann. Rev. Physiol.* 45: 139-153, 1983.

Chuang, T.T., Iacovelli, L., Sallese, M. et De Blasi, A. G protein-coupled receptors : heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 17 : 416-421, 1996.

Chulak, C., Couture, R. et Foucart, S. Modulatory effect of bradykinin on noradrenaline release in isolated atria from normal and B_2 knockout transgenic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 346 : 167-174, 1998.

Claeys, M.C., Mulvaney, D.R., McCarthy, F.D., Gore, M.T., Marple, D.N. et Sartin, J.L. Skeletal muscle protein synthesis and growth hormone secretion in young lambs treated with clenbuterol. *J. Anim. Sci.* 67: 2245-2254, 1989.

Clausen, T. Regulation of the active $Na^+ - K^+$ transport in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 66: 580, 1986.

Clausen, T. et Flatman, J.A. The effect of catecholamines on Na-K transport and membrane potential in rat soleus muscle. *J. Physiol.* 270: 383-414, 1977.

Clausen, T. et Flatman, J.A. β_2 -adrenoceptors mediate the stimulating effect of the adrenaline on the active electrogenic Na-K-transport in rat soleus muscle. *Br. J. Pharmacol.* 68: 749-755, 1980.

Clemson, B., Gaul, L., Gubin, S.S., Campsey, D.M., McConville, J., Nussberger, J. et Zelis, R. Prejunctional angiotensin II receptors; facilitation of norepinephrine release in the human forearm. *J. Clin. Invest.* 93: 684-691, 1994.

Cohen, R.A. Inhibition of adrenergic neurotransmission in canine tibial artery after exposure to 5-hydroxytryptamine in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242: 493-499, 1987.

Coleman, R.A., Kennedy, I., Sheldrick, R.L.G. et Tolowinska, I.Y. Further evidence for the existence of three subtypes of PG_2 -sensitive (EP)-receptors. *Br. J. Pharmacol.* 91 : 407P, 1987.

Coppes, R.P., Smit, J., Benthem, L., Van der Leest, J. et Zaagsma, J. Co-released adrenaline markedly facilitates noradrenaline overflow through prejunctional β_2 -adrenoceptors during swimming exercise. *Eur. J. Pharmacol.* 274: 3-40, 1995.

Coppes, R.P., Smit, J., Khali, N.N., Brouwer, F. et Zaagsma, J. Strong activation of vascular prejunctional beta2-adrenoceptors in freely moving rats by adrenaline released as a co-transmitter. *Eur. J. Pharmacol.* 243: 272-279, 1993.

Coruzzi, G., Spaggiari, S. et Bertaccini, G. Comparison between β_3 and β_2 adrenoceptor agonists as inhibitors of gastric acid secretion. *J. Physiol. (Paris)* 91: 241-246, 1997.

Costa, M., Furness, J.B. et Gibbins, I.L. Chemical coding of enteric neurons. Dans : *Coexistence of neuronal messengers : A new principle in chemical transmission. Progress in brain research.* Hokfelt, T., Fuxe, K. et Pernow, B. (eds), Elsevier, Amsterdam. 68 : 217-239, 1986.

Costa, M. et Majewski, H. Facilitation of noradrenaline release from sympathetic nerves through activation of ACTH receptors, β -adrenoceptors et angiotensin II receptors. *Br. J. Pharmacol.* 95: 993-1001, 1988.

Costa, M. et Majewski, H. Inhibitory prejunctional muscarinic receptors at sympathetic nerves do not operate through a cyclic AMP dependent pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 342 : 630-639, 1990.

Cox, S.L., Ben, A., Story, D.F. et Ziogas, J. Evidence for the involvement of different receptor subtypes in the pre- and postjunctional actions of angiotensin II at rat sympathetic neuroeffector sites. *Br. J. Pharmacol.* 114: 1057-1063, 1995.

Cox, S.L., Schelb, V., Trendelenburg, A.U. et Starke, K. Enhancement of noradrenaline release by angiotensin II and bradykinin in mouse atria: evidence for cross-talk between $G_{q/11}$ protein- and $G_{i/o}$ protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129 : 1095-1102, 2000.

Cox, S.L., Story, D.F. et Ziogas, J. Angiotensin II receptors involved in the enhancement of noradrenergic transmission in the caudal artery of the spontaneously hypertensive rat. *Br. J. Pharmacol.* 119 : 965-975, 1996a.

Cox, S.L., Story, D.F. et Ziogas, J. Multiple prejunctional actions of angiotensin II on noradrenergic transmission in the caudal artery of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 119: 976-984, 1996b.

Cox, S.L., Trendelenburg, A.U. et Starke, K. Prejunctional angiotensin receptors involved in the facilitation of noradrenaline release in mouse tissues. *Br. J. Pharmacol.* 127 : 1256-1262, 1999.

Criswell, D.S., Powers, S.K. et Herb, R.A. Clenbuterol-induced fiber type transition in the soleus of adult rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 74: 391-396, 1996.

Daaka, Y., Pitcher, J.A., Richardson, M., Stoffel, R.H., Robishaw, J.D., et Lefkowitz, R.J. Receptor and G $\beta\gamma$ isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2180-2185, 1997.

Dahlof, C., Kahan, T. et Ablad, B. Prejunctional β_2 -adrenoreceptor blockade reduces nerve stimulation evoked release of endogenous noradrenaline in skeletal muscle *in situ*. *Acta Physiol. Scand.* 129: 499-503, 1987.

Dahlof, C., Ljung, B. et Ablad, B. Increased noradrenaline release in rat portal vein during sympathetic nerve stimulation due to activation of presynaptic β -adrenoceptors by noradrenaline and adrenaline. *Eur. J. Pharmacol.* 50: 75-78, 1978.

Dahlstrom, A. Aminergic transmission. Introduction and short review. *Brain Res.* 62: 441-460, 1973.

Deibert, D.C. et DeFronzo, R.A. Epinephrine-induced insulin resistance in man. *J. Clin. Invest.* 65: 717-721, 1980.

De Potter, W.P., Coen, E.P. et De Potter, R.W. Evidence for the coexistence and co-release of [Met]enkephalin and noradrenaline from sympathetic nerves of the bovine vas deferens. *Neurosci.* 20 : 855-866, 1987.

De Potter, W.P., Moerman, E.J., de Schaepdryver, A.F. et Smith, A.D. Release of noradrenaline and dopamine β -hydroxylase upon splenic nerve stimulation. *Proc. 4th int. Congr. Pharmac. Abstracts.* Schwabe & Co., Basel, 1969, p.146

Del Villar, K., Dorin, D., Sattler, I., Urano, J., Poulet, P., Robison, N., Mitsuzawa, H. et Tamanoi, F. C-terminal motifs found in Ras-superfamily G-proteins : CAAX and C-seven motifs. *Biochem. Soc. Transac.* 24: 709-713, 1996.

Deng, C., Paoloni-Giacobino, A., Kuehne, F., Boss, O., Revelli, J.-P., Moinat, M., Cawthorne, M.A., Muzin, P. et Giacobino, J.-P. Respective degree of expression of β_1 -, β_2 - et β_3 -adrenoceptors in human brown and white adipose tissues. *Br. J. Pharmacol.* 118: 929-934, 1996.

Deutsh, D.G., Goligorsky, M.S., Schmid, P.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H.O., Das, S.K., Dey, S.K., Arreaza, G., Thorup, C., Stefano, G. et Moore, L.C. Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J. Clin. Invest.* 100: 1538-1546, 1997.

Docherty, J.R. Subtypes of functional α_1 - and α_2 -adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* 361: 1-15, 1998.

Docherty, J.R., Gothert, M., Dieckhofer, C. et Starke, K. Effects of 4-chloro-2-(2-imidazolin-2-ylamino)-isoindoline hydrochloride (BE 6143) at pre- and postsynaptic α -adrenoceptors in rabbit aorta and pulmonary artery. *Drug Res.* 32: 1534-1540, 1982.

Douglas, B.H., Duff, R.B., Thureson-Klein, A. et Klein, R.L. Atrial natriuretic factor inhibits adrenergic and purinergic neurotransmission in the rabbit isolated vas deferens. *Regul. Pept.* 14: 193-210, 1986.

Drewett, J.G., Trachte, G.J. et Marchand, G.R. Atrial natriuretic factor inhibits adrenergic and purinergic neurotransmission in the rabbit isolated vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248: 135-142, 1989.

Du, X.-J., Dart, A.M., Riemersma, A. et Oliver, M.F. Sex difference in presynaptic adrenergic inhibition of norepinephrine release during normoxia and ischemia in the rat heart. *Circ. Res.* 68: 827-835, 1991.

Du, X.-J. et Riemersma, R.A. Effect of high potassium (K^+) on noradrenaline release in normoxic heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23: 61, 1991.

Duckles, S.P. et Budai, D. Stimulation intensity as critical determinant of presynaptic receptor effectiveness. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 440-443, 1990.

Duffy, S.J., New, G., Tran, B.T., Harper, R.W. et Meredith, I.T. Relative contribution of vasodilator prostanoids and NO to metabolic vasodilation in the human forearm. *Am. J. Physiol.* 276: H663-H670, 1999.

Dumas, M., Dumas, J.-P., Bardou, M., Rochette, L., Advenier, C. et Giudicelli, J.-F. Influence of β -adrenoceptor agonists on the pulmonary circulation. Effects of a β_3 -adrenoceptor antagonist, SR 59230A. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 223-228, 1998.

Dunning, E.B. et Taborsky, G.J. Galanin – sympathetic neurotransmitter in endocrine pancreas? *Diabetes* 37: 1157-1162, 1988.

Eisemann, J.H., Huntington, G.B. et Ferrell, C.L. Effects of dietary clenbuterol on metabolism of the hindquarters in steers. *J. Anim. Sci.* 66: 342-353, 1988.

Elfellah, M.S., Dalling, R., Kantola, I.M. et Reid, J.L. β -adrenoceptors and human skeletal muscle characterisation of receptor subtype and effect of age. *Br J Clin Pharmacol.* 27: 31-38, 1989.

Elfellah, M.S., Deighton, N. et Reid, J.L. Regulation of β -adrenoceptors by catecholamines in the rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 139: 67-72, 1987.

Elfellah, M.S. et Khan, M.T. Studies on the inhibitory effect of ouabain on the release of [3 H]-noradrenaline from the rat heart. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 282: 288-297, 1986.

Elfellah, M.S. et Reid, J.L. Regulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors following chronic treatment with β -adrenoceptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 173: 85-92, 1989.

Ellingsen, O., Sejersted, O.M., Leraand, S. et Ilebekk, A. Catecholamine-induced myocardial potassium uptake mediated by β_1 -adrenoceptors and adenylate cyclase activation in the pig. *Circ. Res.* 60: 540-550, 1987.

Ellingsen, O., Sejersted, O.M., Vengen, O.A. et Ilebekk, A. In vivo quantification of myocardial Na-K pump rate during β -adrenergic stimulation of intact pig hearts. *Acta Physiol. Scand.* 135: 493-503, 1989.

Emery, P.W., Rothwell, N.J., Stock, M.J. et Winter, P.D. Chronic effects of β_2 -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci. Rep.* 4: 83-91, 1984.

Emilsson, V., Summers, R.J., Hamilton, S., Liu, Y.L. et Cawthorne, M.A. The effects of the beta3-adrenoceptor agonist BRL 35135 on UCP isoform mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252: 450-454, 1998.

Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C. et Strosberg, A.D. Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science.* 245: 1118-1121, 1989.

Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Suttren, M.-M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, D. et Strosberg, A.D. Molecular characterisation of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* 245: 1118-1121, 1996.

Endo, Y., Tabata, T., Kuroda, H., Tadano, T., Matsushima, K. et Watanabe, M. Induction of histidine decarboxylase in skeletal muscle in mice by electrical stimulation, prolonged walking and interleukin-1. *J. Physiol. (Lond.)* 509: 587-598, 1998.

Endou, M., Poli, E. et Levi, R. Histamine H_3 -receptor signalling in the heart: Possible involvement of G_i/G_o proteins and N-type Ca^{++} channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 221-229, 1994.

Esler, M., Kaye, D., Thompson, J., Jennings, G., Cox, H., Turner, A., Lambert, G. et Seals, D. Effects of aging on epinephrine secretion and regional release of epinephrine from the human heart. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 435-442, 1995.

Esler, M., Jennings, G., Korner, P., Willett, I., Dudley, F., Hasking, G., Anderson, W. et Lambert, G. Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover. *Hypertension.* 11: 3-20, 1988.

Evans, B.A., Papaioannou, M., Bonazzi, V.R. et Summers, R.J. Expression of β_3 -adrenoceptor mRNA in rat tissues. *Br. J. Pharmacol.* 117: 210-216, 1996.

Everitt, B., Hokfelt, T., Terenius, L., Tatemoto, K., Mutt, V. et Goldstein, M. Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neurosci.* 11: 443-462, 1984.

Everts, M.E., Retterstol, K. et Clausen, T. Effects of adrenaline on excitation-induced stimulation of the sodium-potassium pump in rat skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 134: 189-198, 1988.

Fell, R.D., Lizzo, F.H., Cervoni, P. et Crandal, D.L. Effect of contractile activity on rat skeletal muscle β -adrenoceptor properties. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 180: 527-532, 1985.

Fellenius, E, Hedberg, R, Holmberg, E. et Waldeck, B. Functional and metabolic effects of terbutaline and propranolol in fast- and slow-contracting skeletal muscle in vitro. *Acta Physiol Scand.* 109: 89-95, 1980.

Ferguson, S.S.G., Zhang, J., Barak, L.S., et Caron, M.G. G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: regulators of G-protein-coupled receptor sequestration. *Biochem. Soc. Trans.* 24:953-959, 1996.

Fernandes, F.A., Alonso, M.J., Marin, J. et Salices, M. M_3 -muscarinic receptor mediates prejunctional inhibition of noradrenaline release and the relaxation in cat femoral artery. *J. Pharm. Pharmacol.* 43: 644-649, 1991.

Ferrer, M., Galvan, R., Marin, J. et Balfagon, G. Presynaptic muscarinic receptor subtypes involved in the inhibition of acetylcholine and noradrenaline release in bovine cerebral arteries. *Naunyn-Schmiedbergs Arch. Pharmacol.* 345: 619-626, 1992.

Fiems, L.O., Batjoens, P., Uytterhaegen, L., Moermans, R.J., Van Hoff, J. et Boucqué, Ch. V. The effects of cimaterol on myofiber and metabolic aspects in different strains of belgian white-blue bulls. Dans: *Proc. 39th Int. Congr. On Meat Sci. and Tech.* 1993, p. 23.

Fitzgerald, G.A., Robertson, D. et Wood, A.J.J. Beta-adrenoceptor down-regulation by dynamic exercise and up-right posture in man. *Trans. Assoc. Am. Phys.* 94: 310-313, 1981.

Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D. et Warden, C.H. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* 15: 269-72, 1997.

Fozard, J.R. et Mwaluko, G.M.P. The 5-hydroxytryptamine content of rabbit hearts and its release during in vitro perfusion. *J. Pharm. Pharmacol.* 25: 809-814, 1973.

Fredholm, B.B. et Dunwiddie, T.V. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 130-134, 1988.

Freedman, N.J. et Lefkowitz, R.J. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Rec. Prog. Horm. Res.* 51: 319-351, 1996.

Frey, M.J., Mancini, D., Fischberg, D., Wilson, J.R. et Molinoff, P.B. Effect of exercise duration on density and coupling of beta-adrenergic receptors on human mononuclear cells. *J. Appl. Physiol.* 66: 1494-1500, 1989.

Fried, G., Lundberg, J.M. et Theodorsson-Norheim, E. Subcellular storage and axonal transport of neuropeptide Y (NPY) in relation to catecholamines in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 125: 145-154, 1985.

Fuder, H. Opioid receptor mechanisms in the peripheral regulation of noradrenaline release on the heart. Dans: Illes, P. et Farsang, C. (eds) *Regulatory roles of opioid peptides*. VCH, Weinheim, 1988, pp 205-217.

Fuder, H., Brink, A., Meincke, M. et Tauber, U. Purinoceptor-mediated modulation by endogenous and exogenous agonists of stimulation-evoked [³H]noradrenaline release on rat iris. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 345: 417-423, 1992.

Fuder, H. et Muscholl, E. Heteroreceptor-mediated modulation of noradrenaline and acetylcholine release from peripheral nerves. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 126: 265-412, 1995.

Fuder, H. et Muth, U. ATP and endogenous agonists inhibit evoked [³H]-noradrenaline release in rat iris via A₁ and P_{2Y}-like purinoceptors. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 348: 352-357, 1993.

Fuder, H., Ries, P. et Schwartz, P. Histamine and serotonin released from the rat perfused heart by compound 48/80 or by allergen challenge influence noradrenaline or acetylcholine exocytotic release. Fundam. Clin. Pharmacol. 8: 477-90, 1994.

Fuder, H. et Schwarz, P. Desensitization of inhibitory prejunctional α₂-adrenoceptors and putative imidazoline receptors on rabbit heart sympathetic nerves. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 348: 127-133, 1993.

Fuder, H., Siebenborn, R. et Muscholl, E. Nicotine receptors do not modulate the ³H-noradrenaline release from isolated rat heart evoked by sympathetic nerve stimulation. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 318: 301-307, 1982.

Gagnon A.W., Kallal, L., et Benovic, J.L. Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-mediated downregulation of the β₂-adrenergic receptor. J. Biol. Chem. 273:6976-6981, 1998.

Gaiser, E.G., Trendelenburg, A.U. et Starke, K. A search for presynaptic imidazoline receptors at rabbit and rat noradrenergic neurones in the absence of

alpha2-autoinhibition. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 359: 123-132, 1999.

Galbo, H., Holst, J.J. et Christensen, N.J. Glucagon and plasma catecholamine responses to graded and prolonged exercise in man. *J. Appl. Physiol.* 38: 70-76, 1975.

Galbo, H., Holst, J.J., Christensen, N.J. et Hilsted, J. Glucagon and plasma catecholamines during β -receptor blockade in exercising man. *J. Appl. Physiol.* 40: 855-863, 1976.

Garber, A.J., Karli, I.E. et Kipnis, D.M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. IV Beta-adrenergic inhibition of amino acid release. *J. Biol. Chem.* 251: 851-857, 1976.

Garcia-Villalon, A.L., Buchholz, J.N., Duckles, S.P. et Krause, D.N. Noradrenaline content and release in male and female rat tail arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29: 93-96, 1997.

Galitzky, J., Langin, D., Verwaerde, P., Montastruc, J.L., Lafontan, M. et Berlan, M. Lipolytic effect of conventional β_3 -adrenoceptor agonists and of CGP 12,177 in rat

and human fat cells: preliminary pharmacological evidence for a putative β_4 -adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.* 122: 1244-1250, 1997.

Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Lanin, D. et Le Marec, H. Functional β -adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.* 98: 556-562, 1996.

Gillespie, J.S. et Towart, R. Uptake kinetics and ion requirements for extraneuronal uptake of noradrenaline by arterial smooth muscle and collagen. *Br. J. Pharmacol.* 47: 556-567, 1973.

Gironacci, M.M., Alder-Graschinsky, E., Pena, C. et Enero, M.A. Effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on the release of [3 H] norepinephrine from rat atria. *Hypertension* 24: 457-460, 1994.

Goncalves, J. et Queiroz, G. Facilitatory and inhibitory modulation by endogenous adenosine of noradrenaline release in the epididymal portion of rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 348: 367-371, 1993.

Gonzales-Serratos, H., Hill, L. et Valle-Aguilera, R. Effects of catecholamines and cyclic AMP on excitation-contraction coupling in isolated skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol. (Lond.)* 315: 267-282, 1981.

Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H. et Benovic, J.L. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*. 383: 447-50, 1996.

Gorski, J. Muscle triglyceride metabolism during exercise. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: 123-131, 1992.

Gothert, M. Somatostatin selectively inhibits noradrenaline release from hypothalamic neurones. *Nature*. 288: 86-89, 1980.

Gothert, M. ACTH₁₋₂₄ increases stimulation-evoked noradrenaline release from sympathetic nerves by acting on presynaptic ACTH receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 76: 295-296, 1981.

Gothert, M. Facilitatory effect of adrenocorticotrophic hormone and related peptides on Ca²⁺-dependent noradrenaline release from sympathetic nerves. *Neuroscience* 11: 1001-1009, 1984.

Gothert, M. et Hentrich, F. Role of cAMP for regulation of impulse-evoked noradrenaline release from the rabbit pulmonary artery and its possible relationship to presynaptic receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 343: 271-282, 1984.

Gothert, M. et Molderings, G.J. Involvement of presynaptic imidazoline receptors in the α_2 -adrenoceptor-independent inhibition of noradrenaline release by imidazoline derivatives. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 343: 271-282, 1991.

Granata, L., Caraffa Braga, E., Cevese, A. et Data, P.G. Beta adrenergic receptor activity in peripheral vascular beds of the unanesthetized dog. *Pfluegers Arch.* 320: 64-78, 1970.

Granneman, J.G., Lahners, K.N. et Chandley, A. Characterization of the human β_3 -adrenergic receptor gene. *Mol. Pharmacol.* 44: 264-270, 1993

Granneman, J.G., Lahners, K.N. et Chaudrhy, A. Molecular cloning and expression of the rat beta 3-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 40: 895-899, 1991.

Grossman, E., Chang, P.C., Hoffman, A., Tamrat, M., Kopin, I.J. et Goldstein, D.S. Tracer norepinephrine kinetics: dependence on regional blood flow and the site of infusion. *Am. J. Physiol.* 260: R946-R952, 1991.

Grubb, B. et Folk, G.E. Effect of cold acclimation on norepinephrine stimulated oxygen consumption in muscle. *J. Comp. Physiol.* 110: 217-226, 1976.

Grubb, B. et Folk, G.E. the role of adrenoceptors in norepinephrine stimulated V_{O_2} in muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 43: 217-223, 1977.

Guemes, M., Rivilla, F., Sanchez Ferrer, C.F. et Marin, J. Purinergic and cyclic AMP modulation of noradrenaline release in cat femoral arteries. *Gen. Pharmacol.* 21: 109-115, 1990.

Guimaraes, S., Brandao, F. et Paiva, M.Q. A study of the adrenoceptor-mediated feedback mechanisms by using adrenaline as a false transmitter *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 305: 185-188, 1978.

Guimaraes, S., Paiva, M.O. et Moura, D. Different receptors for angiotensin II at pre- and postjunctional level of the canine mesenteric and pulmonary arteries. *Br. J. Pharmacol.* 124: 1207-1212, 1998.

Guyton, A.C. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders company, 1991, 1014 p.

Haaksma, E.E.J., Leurs, R. et Timmerman, H. Histamine receptors: subclasses and specific ligands. *Pharmacol. Ther.* 47: 73-104, 1990.

Hagstrom-Toft, E., Enoksson, S., Moberg, E., Bolinder, J. et Arner, P. Absolute concentrations of glycerol and lactate in human skeletal muscle, adipose tissue, and blood. *Am. J. Physiol.* 273: E584-E592, 1997.

Hagstrom-Toft, E., Enoksson, S., Moberg, E., Bolinder, J. et Arner, P. β -adrenergic regulation of lipolysis and blood flow in human skeletal muscle in vivo. *Am. J. Physiol.* 275: E909-E916, 1998.

Hasking, G.J., Esler, M.D., Jennings, G.L., Dewar, E. et Lambert, G. Norepinephrine spillover to plasma during steady-state supine bicycle exercise. Comparison of patients with congestive heart failure and normal subjects. *Circ.* 78: 516-521, 1988.

Hatta, E., Maryama, R., Marshall, S.J., Imamura, M. et Levi, R. Bradykinin promotes ischemic norepinephrine release in guinea pig and human hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288: 919-927, 1999.

Hatta, E., Yasuda, K. et Levi R. Activation of Histamine H₃ receptors inhibits carrier-mediated norepinephrine release in a human model of protracted myocardial ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 494-500, 1997.

Havel, P.J., Mundinger, T.O., Veith, R.C., Dunning, B.E. et Taborsky, G.J. Corelease of galanin and NE from pancreatic sympathetic nerves during severe hypoglycemia in dogs. *Am. J. Physiol.* 263: E8-E16, 1992.

Hayashi, K., Matsumara, Y., Yoshida, Y., Suzuki, Y. et Morimoto, S. The role of endogenous angiotensin II in antidiuresis and norepinephrine overflow induced by stimulation of renal nerves in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17: 807-813, 1991.

Hayes, A. et Williams, D.A. Long-term clenbuterol administration alters the isometric contractile properties of skeletal muscle from normal and dystrophin-deficient mdx mice. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.* 21: 757-765, 1994.

Hedberg, A., Mattson, H., Nerme, V. et Carlsson, E. Effects of in vivo treatment with isoprenaline or prenalterol on beta-adrenoceptor mechanisms in the heart and soleus muscle of the cat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 325: 251-258, 1984.

Hesse, B., Kanstrup, I.L., Christensen, N.J., Ingemann-Hansen, T., Hansen, J.F., Halkjaer-Kristensen, J. et Petersen, F.B. Reduced norepinephrine response to dynamic exercise in human subjects during O₂ breathing. *J. Appl. Physiol.* 51: 176-178, 1981.

Higuchi, H., Costa, E. et Yang, H.Y.T. Neuropeptide Y inhibits the nicotine-mediated release of catecholamines from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 468-474, 1988.

Hirche, H.J., Franz, C., Boss, L., Bissig, Lang, R. et Schramm, M. Myocardial extracellular K^+ and H^+ increase and noradrenaline release as possible cause of early arrhythmias following acute coronary artery occlusion in pigs. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12: 579-593, 1980.

Hiwatari, M., Satoh, K., Angus, J.A. et Johnston, C.I. No effect of atrial natriuretic factor on cardiac rate, force and transmitter release. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 13: 163-168, 1986.

Hordijk, P.L., Verlaan, I., Jalink, K., van Corven, E.J. et Molenaar, W.H. cAMP abrogates the p21^{ras}-mitogen-activated protein kinase pathway in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269: 3534-3538, 1994.

Horinouchi, T et Koike, K. Characterization of atypical β -adrenoceptors in the guinea pig duodenum. *Eur. J. Pharmacol.* 376: 61-66, 1999.

Ijzerman, A.P., Bultsma, T., Timmerman, H. et Zaagsma, J. The relationship between ionization and affinity of β -adrenoceptor ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 327: 293-298, 1984.

Illes, P. Modulation of transmitter and hormone release by multiple neuronal opioid receptors. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 112: 139-233, 1989.

Imamura, M., Poli, E., Omoniyi, A.T. et Levi, R. Unmasking of activated histamine H_3 -receptors in myocardial ischemia: Their role as regulators of exocytotic norepinephrine release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271: 1259-1266, 1994.

Ishac, E.J.N., Jiang, L., Lake, K.D., Varga, K., Abood, M.E. et Kunos, G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB_1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* 118: 2023-2028, 1996.

Iversen, L.L. Uptake processes for biogenic amines. Dans: *Handbook of psychopharmacology* (Iversen, L.L., Iversen, S.D., Snyder, S.H., Eds.) vol. 3. New York: Plenum Press, 1975, pp. 381-442.

Jansky, L. et Hart, J.S. Participation of skeletal muscle and kidney during non-shivering thermogenesis in cold-acclimated rats. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41: 953-964, 1963.

Jensen, J., Brors, O. et Dahl, H.A. Different β -adrenergic receptor density in different rat skeletal muscle fiber types. *Pharmacol Toxicol.* 76: 380-385, 1995.

Jensen, T.J. et Nedergaard, O.A. Modulation of norepinephrine release from sympathetic neurons of the rabbit aorta by prejunctional prostanoid receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291: 7-11, 1999.

Johansson, M., Rundqvist, B., Eisenhofer, G. et Friberg, P. Cardiorenal epinephrine kinetics: evidence for neuronal release in the human heart. *Am. J. Physiol.* 273: H2178-H2185, 1997.

Johnson, B.G., Trachte, G.J. et Drewett, J.G. Neuromodulatory effect of the atrial natriuretic factor clearance receptor binding peptide, cANF(4-23)-NH₂ in rabbit isolated vasa deferentia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 720-726, 1991.

Jorgensen, A.O. et Jones, L.R. Localization of phospholamban in slow but not fast canine skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.* 261: 3773-3781, 1986

Juel, C. The effect of β_2 -adrenoceptor activation on ion-shifts and fatigue in mouse soleus muscles stimulated in vitro. *Acta Physiol. Scand.* 134: 209-216, 1988.

Juel, C., Bangsbo, J., Graham, T. et Saltin, B. Lactate and potassium fluxes from human skeletal muscle during and after intense, dynamic, knee extensor exercise. *Acta Physiol. Scand.* 140: 147-159, 1990.

Juel, C., Hellsten, Y., Saltin, B. et Bangsbo, J. Potassium fluxes in contracting human skeletal muscle and red blood cells. *Am. J. Physiol.* 276: r184-R188, 1999.

Kadowaki, M., Kamata, T. et Noguchi, T. Acute effect of epinephrine on muscle proteolysis in perfused rat hindquarters. *Am. J. Physiol.* 270: E961-E967, 1996.

Kahan, T., Dahlof, C. et Hjemdahl, P. Influence of acetylcholine, peptides, and other vasodilators on endogenous noradrenaline overflow and vasoconstriction in canine blood perfused gracilis muscle. *Acta Physiol. Scand.* 124: 457-465, 1985.

Kahan, T., Dahlof, C. et Hjemdahl, P. Facilitation of nerve stimulation evoked noradrenaline overflow by isoprenaline but not by circulating adrenaline in the dog in vivo. *Life Sci.* 40: 1811-1818, 1987.

Kahan, T. et Hjemdahl, P. Pre- and postjunctional α -adrenoceptor-mediated effects of prazosin, methoxamine and 6-fluoronoradrenaline in blood-perfused canine skeletal muscle *in situ*. *Eur. J. Pharmacol.* 133: 9-20, 1987a.

Kahan, T. et Hjemdahl, P. Prejunctional β_2 -adrenoceptor-mediated enhancement of noradrenaline release in skeletal muscle vasculature *in situ*. J. Cardiovasc. Pharmacol. 10: 433-438, 1987b.

Kahan, T., Hjemdahl, P. et Dahlof, C. Relationship between the overflow of endogenous and radiolabelled noradrenaline from canine blood perfused gracilis muscle. Acta Physiol. Scand. 122: 571-582, 1984.

Kahan, T., Lindqvist, M., Nussberger, J., Melcher, A. et Hjemdahl, P. Plasma angiotensins and human forearm circulation: effects of sympatho-adrenal activation. Acta Physiol. Scand. 159: 107-111, 1997.

Kahan, T., Pernow, J., Schwieler, J., Wallin, B.G., Lundberg, J.M. et Hjemdahl, P. Noradrenaline release evoked by a physiological irregular sympathetic discharge pattern is modulated by prejunctional α - and β -adrenoceptors *in vivo*. Br. J. Pharmacol. 95: 1101-1108, 1988.

Kaijser, L., Pernow, J., Berglund, B., Grubbstrom, J. et Lundberg, J.M. Neuropeptide Y release from human heart is enhanced during prolonged exercise in hypoxia. J. Appl. Physiol. 76: 1346-1349, 1994.

Kasakov, L., Ellis, J., Kirkpatrick, K., Milner, P. et Burnstock, G. Direct evidence for concomitant release of noradrenaline, adenosine 5'-triphosphate and neuropeptide Y from sympathetic nerve supplying the guinea-pig vas deferens. *J. Auton. Nerv. Syst.* 22: 75-82, 1988.

Kaumann, A.J. et Molenaar, P. Modulation of human cardiac function through 4 β -adrenoceptor populations. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355: 667-681, 1997.

Kaye, D.M., Wiviott, S.D., Kobzik, L., Kelly, R.A. et Smith, T.W. S-nitrosothiols inhibit neuronal norepinephrine transport. *Am. J. Physiol.* H875-H883, 1997.

Kendall, M.J. et Haffner, C.A. The acute unwanted effects of beta₂ receptor agonist therapy. Dans: *The role of beta receptor agonist therapy in asthma mortality*, Beasley, R. et Pearce, N.E. (eds) London: CRC, p. 163-199, 1993.

Kim, Y.S., Lee, Y.B. et Ashmore, C.R. Cimaterol-induced growth in rats: growth pattern and biochemical characteristics. *Growth Dev. Aging* 52: 41-5, 1988.

Kim, Y.S., Lee, Y.B. et Dalrymple, R.H. Effect of the repartitioning agent cimaterol on growth, carcass and skeletal muscle characteristics in lambs. *J. Anim. Sci.* 65: 1392-1399, 1987.

Kim, Y.S., Sainz, R.D., Molenaar, P. et Summers, R.J. Characterization of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1783-1789, 1991.

Kim, Y.S. et Sainz, R.D. β -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscle. *Life Sciences.* 50: 397-407, 1992.

Kim, Y.S., Sainz, R.D., Summers, R.J. et Molenaar, P. Cimaterol reduces β -adrenergic receptor density in rat skeletal muscles. *J Anim Sci.* 70: 115-122, 1992.

Kirchberger, M.A. et Tada, M. Effects of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase on sarcoplasmic reticulum isolated from cardiac and slow and fast contracting skeletal muscles. *J. Biol. Chem.* 251: 725-729, 1976.

Kirpekar, S.M., Prat, J.C., Puig, M. et Wakade, A.R. Modification of evoked release of noradrenaline from the perfused cat spleen by various ions and agents. *J. Physiol.* 221: 601-615, 1972.

Klasing, K.C., Palmer, W.K., Riss, T.L., Novakofski, J. et Bechtel, P.J. Effects of the β -agonist clenbuterol on rat muscle and heart. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 44: 505, 1985.

Klein, R.L. Chemical composition of the large noradrenergic vesicles. Dans: *Neurotransmitter vesicles*, Klein, R.L., Lagercrantz, H. et Zimmermann, H. (eds) Academic, London, pp 219-239, 1982.

Koblan, K.S., Kohl, N.E., Omer, C.A., Anthony, N.J., Conner, M.W., deSolms, S.J., Williams, T.M., Graham, S.L., Hartman, G.D., Oliff, A. et Gibbs, J.B. Farnesyltransferase inhibitors: a new class of cancer chemotherapeutics. *Biochem. Soc. Transac.* 24: 688-692, 1996.

Koch, H., von Kugelgen, I. et Starke, K. P2-receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the rat pancreas. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357: 431-440, 1998.

Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F. et Lefkowitz, R.J. Direct evidence that G_i-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G_{βγ} activation of p21^{ras}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 : 12706-12710, 1994.

Kohlenbach, A. et Schlicker, E. GABA_B receptor-mediated inhibition of the neurogenic vasopressor response in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol.* 100: 365-369, 1990.

Konkar, A.A., Zhai, Y. et Granneman, J.G. β_1 -adrenergic receptors mediate β_3 -adrenergic-independent effects of CGP 12177 in brown adipose tissue. *Mol. Pharmacol.* 57: 252-258, 2000.

Kraus, W.E., Bernard, T.S. et Williams, R.S. Interactions between sustained contractile activity and beta-adrenergic receptors in regulation of gene expression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 256: C506-C514, 1989.

Krawietz, W., Klein, E.M., Unterberg, C. et Ackenheil, M. Physical activity decreases the number of beta-adrenergic receptors on human lymphocytes. *Klin. Wochenschr.* 63: 73-78, 1985.

Krief, S., Lonnqvist, f., Rainbault, S., Baude, B., Van Spronsen, A., Arner, P., Strosberg, A.D., Ricquier, D. et Emorine, L.J. Tissue distribution of beta₃-adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest.* 91: 344-349, 1993.

Krueger, K.M., Daaka, Y., Pitcher, J.A. et Lefkowitz, R.J. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization: regulation of β_2 -adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem.* 272: 5-8, 1997.

Krukoff, T.L. Coexistence of neuropeptides in sympathetic preganglionic neurons of the cat. *Peptides* 8: 109-112, 1987.

Kupfermann, I. Functional studies of cotransmission. *Physiol. Rev.* 71: 683-732, 1991.

Kurz, T., Tolg, R. et Richardt, G. Bradykinin B₂-receptor-mediated stimulation of exocytotic noradrenaline release from cardiac sympathetic neurons. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 2561-2569, 1997.

Kurz, K., von Kugelgen, I. et Starke, K. Prejunctional modulation of noradrenaline release in mouse and rat vas deferens: contribution of P₁ and P₂-purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 110: 1465-1472, 1993.

Lands, A.M., Luduena, F.P. et Buzzo, H.J. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci.* 6: 2241-2249, 1967.

Lang, R.E., Hermann, K., Dietz, R., Gaida, W., Ganten, D., Kraft, K. et Unger, T. Evidence for the presence of enkephalins in the heart. *Life Sci.* 32: 399-406, 1983.

Langer, S.Z. 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *T.i.P.S.* 18: 95-99, 1997.

Langer, S.Z. et Lehmann, J. Presynaptic receptors on catecholamine neurons. Dans: *Handbook of experimental pharmacology*. Trendelenberg, U. et Weiner, N. (eds), vol. 90, Springer-Verlag, Berlin, 1988, pp. 419-507.

Lash, J.M. Regulation of skeletal muscle blood flow during contractions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211: 218-235, 1996.

Lash, J.M. et Bohlen, H.G. Perivascular and tissue PO₂ in contracting rat spinotrapezius muscle. *Am. J. Physiol.* 252: H1192-H1202, 1987.

Lefkowitz, R.J., Hoffman, B.B. et Taylor, P. Neurotransmission. The autonomic and somatic motor nervous systems. Dans: *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics 9th ed.*, Hardman, J.G. et Limbird, L.E. (eds.), New York : Montreal : McGraw-Hill, Health Professions Division, 1996, pp.105-139.

Leuenberger, U., Gleeson, K., Wroblewski, K., Prophet, S., Zelis, R., Zwillich, C. et Sinoway, L. Norepinephrine clearance is increased during acute hypoxemia in humans. *Am. J. Physiol.* 261 : H1659-H1664, 1991.

Levi, R. et Smith, N.C. Histamine H₃-receptors : A new frontier in myocardial ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292 : 825-830, 2000.

Li, J.B. et Jefferson, L.S. Effect of isoproterenol on amino acid levels and protein turnover in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 232: E243-E249, 1977.

Li, K.X. et Sperelakis, N. Isoproterenol- and insulin-induced hyperpolarization in rat skeletal muscle. *J. Cell. Physiol.* 157: 631-636, 1993.

Li, T. et Zimmerman, B.G. β -adrenergic-induced local angiotensin generation in the rabbit hind limb is dependent on the kidney. *Hypertens.* 17: 1010-1017, 1991.

Liang, F., Li, J.-Y., Lovisetti-Scamihorn, P., Coen, E., Depreitere, J., Claeys, M., Wechsung, E., Dahlstrom, A., Winkler, H. et De Potter, W.P. The processing of secretogranin II in the peripheral nervous system : release of secretoneurin from porcine sympathetic nerve terminals. *Brain Res.* 818 : 459-467, 1999.

Liggett, S.B., Shah, S.D. et Cryer, P.E. Characterization of β -adrenergic receptors of human skeletal muscle obtained by needle biopsy. *Am. J. Physiol.* 254: E795-E798, 1988.

Lindinger, M.I. et Sjogaard, G. Potassium regulation during exercise and recovery. *Sports Med.* 11: 382-401, 1991.

Linkungu, J., Molderings, G.J. et Gothert, M. Presynaptic imidazoline receptors and α_2 -adrenoceptors in the human heart : discrimination by clonidine and moxonidine. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 354 : 689-692, 1996.

Liu, X., Perusse, F. et Bukowiecki, L.J. Mechanisms of the antidiabetic effects of the beta 3-adrenergic agonist CL-316243 in obese Zucker-ZDF rats. *Am. J. Physiol.* 274: R1212-9, 1998.

Liu, Y.L., Cawthorne, M.A. et Stock, M.J. Biphasic effects of the β -adrenoceptor agonist, BRL 37344, on glucose utilization in rat isolated skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 117: 1355-1361, 1996.

Liu, Y.L. et Stock, M.J. Acute effects of the β_3 -adrenoceptor agonist, BRL 35135, on tissue glucose utilisation. *Br. J. Pharmacol.* 114: 888-894, 1995.

Llona, I., Galleguillos, X., Belmar, J. et Huidobro-Toro, J.P. Bradykinin modulates the release of noradrenaline from vas deferens nerve terminals. *Life Sci.* 48: 2585-2592, 1991.

Lohse, M.J. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1179:171-188, 1993

Lorenz, R.R. et Vanhoutte, P.M. Inhibition of adrenergic neurotransmission in isolated veins of the dog by potassium ions. *J. Physiol.* 246: 479-500, 1975.

Lundberg, J.M., Anggard, A., Theodorsson-Norheim, E. et Pernow, J. Guanethidine-sensitive release of NPY-like immunoreactivity in the cat spleen by sympathetic nerve stimulation. *Neurosci. Lett.* 52: 175-180, 1984.

Lundberg, J.M. et Hokfelt, T. Multiple co-existence of peptides and classical transmitter in peripheral autonomic and sensory neurons: functional and pharmacological implications. *Prog. Brain Res.* 68 : 241-262, 1986.

Lundberg, J.M., Martinsson, A., Hemsén, A., Theodorsson-Norheim, E., Svedenhag, J., Ekblom, B. et Hjemdahl, P. Co-release of neuropeptide Y and catecholamines during physical exercise in man. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 30-6, 1985.

Lundberg, J.M., Pernow, J., Dahlof, C. et Tatemoto, K. Pre- and postjunctional effects of NPY on sympathetic control of rat femoral artery. *Acta Physiol. Scand.* 123: 511-512, 1985.

Lundberg, J.M., Rudehill, A., Sollevi, A., Theodorsson-Norheim, E. et Hamberger, B. Frequency- and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic

transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. *Neurosci. Lett.* 63 : 96-100, 1986.

Lundholm, L. et Svedmyr, N. Influence of adrenaline on blood flow and metabolism in the human forearm. *Acta Physiol. Scand.* 65: 344-351, 1965.

Lynch, G.S., Hayes, A., Campbell, S.P. et Williams, D.A. Effects of β_2 -agonist administration and exercise on contractile activation of skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 81: 1610-1618, 1996.

MacLennan, P.A. et Edwards, R.H.T. Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass. Evidence that clenbuterol stimulates muscle β -adrenoceptors to induce hypertrophy. *Biochem. J.* 264: 573-579, 1989.

MacLennan, P.A. et Edwards, R.H.T. Clenbuterol induces a propranolol-sensitive accumulation of action message in rat skeletal muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 191S, 1992.

Mahata, S.K., O'Connor, D.T., Mahata, M., Yoo, S.H., Taupenot, L., Wu, H., Gill, B.M. et Parmer, R.J. Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J. Clin. Invest.* 100: 1623-1633, 1997.

Maki, T. Density and functioning of human lymphocytic β -adrenergic receptors during prolonged physical exercise. *Acta Physiol. Scand.* 136: 5569-5574, 1989.

Malik, K.U. et Sehic, E. Prostaglandins and the release of the adrenergic transmitter. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 604: 222-236, 1990.

Malinowska, B., Godlewski, B., Burcher, B. et Schlicker, E. Cannabinoid CB₁ receptor-mediated inhibition of the neurogenic vasopressor pithed rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356: 197-202, 1997.

Maltin, C.A., Delday, M.I., Hay, S.M., Innes, G.M. et Williams, P.E. Effects of bovine pituitary growth hormone alone or in combination with the beta-agonist clenbuterol on muscle growth and composition in veal calves. *Br. J. Nutr.* 63: 535-545, 1990.

Maltin, C.A., Delday, M.I., Hay, S.M., Smith, F.G. et Reeds, P.J. Propranolol apparently separates the physical and compositional characteristics of muscle growth induced by clenbuterol. *Biosci. Rep.* 7: 51-57, 1987.

Maltin, C.A., Delday, M.I. et Reeds, P.J. The effect of a growth promoting drug, clenbuterol, on fibre frequency and area in hind limb muscles from young male rats. *Biosci. Rep.* 6: 293-299, 1986.

Mantelli, L., Amerini, S., Rubino, A. et Ledda, F. Prejunctional prostanoid receptors on cardiac adrenergic terminals belong to the EP₃ subtype. *Br. J. Pharmacol.* 102: 573-576, 1991.

Martin, W.H., Coggan, A.R., Spina, R.J. et Saffitz, J. E. Effects of fiber type and training on β -adrenergic density in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 257: E736-E742, 1989b.

Martin, W.H., Murphree, S.S. et Saffity, J.E. β -adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red and intermediate skeletal muscle. *Circ. Res.* 64: 1096-1105, 1989a

Maynard, K.I., Saville, V.L. et Burnstock, G. Somatostatin modulates vascular sympathetic neurotransmission in the rabbit ear artery. *Eur. J. Pharmacol.* 196: 125-131, 1991.

McCance A.J. et Forfar, J.C. Noradrenaline kinetics and coronary haemodynamics during acute β_1 -adrenoceptor blockade in man. *Clin. Sci.* 84: 413-417, 1993.

McCormick, F. Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 : 71-76, 1994.

McElligott, M.A., Mulder, J.E., Chaung, L-Y. et Barreto, A. Clenbuterol-induced muscle growth: investigation of possible mediation by insulin. *Am. J. Physiol.* 253: E370-E375, 1987.

McGrath, M.A. et Shepherd, J.T. Hyperosmolarity: effects on nerves and smooth muscle of cutaneous veins. *Am. J. Physiol.* 231: 141-147, 1976.

McNeel, R.L. et Mersmann, H.J. Distribution and quantification of beta1-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues. *J. Anim. Sci.* 77: 611-621, 1999.

Mejsnar, J., Kolar, F. et Mala, J. Effects of noradrenaline and the blood perfusion rate on the oxygen consumption of intact and isolated muscles of cold-acclimated rats. *Physiol. Bohemoslov.* 29: 151-160, 1980.

Mejsnar, J. et Pacha, J. Thermogenesis due to noradrenaline in muscles under different rates of perfusion. *Pfluegers Arch.* 397: 149-151, 1983.

Mersmann, H.J. Acute changes in blood flow in pigs infused with β -adrenergic agonists. *J. Anim. Sci.* 67: 2913-2920, 1989.

Mersmann, H.J. Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J. Anim. Sci.* 76: 160-172, 1998.

Miles, J.M., Nissen, S.V., Gerich, J.E. et Haymond, M.W. Effects of epinephrine infusion on leucine and alanine kinetics in humans. *Am. J. Physiol.* 247: E166-E172, 1984.

Miller, M.F., Garcia, D.K., Coleman, M.E., Ekeren, P.A., Lunt, D.K., Wagner, K.A., Procknor, M., Welsh, T.H. et Smith, S.B. Adipose tissue, longissimus muscle and anterior pituitary growth and function in clenbuterol-fed heifers. *J. Anim. Sci.* 66: 12-20, 1988.

Minneman, K.P., Hedberg, A. et Molinoff, P.B. comparison of β -adrenergic receptor subtype in mammalian tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221: 502-508, 1979.

Minshall, R.D., Yelamanchi, V.P., Djokovic, A., Miletich, D.J., Erdos, E.G., Rabito, S.F. et Vogel, S.M. Importance of sympathetic innervation in the positive inotropic effects of bradykinin and ramiprilat. *Circ. Res.* 74: 441-447, 1994.

Miyasaki, T. et Zipes, D.P. Presynaptic modulation of efferent sympathetic and vagal neurotransmission in the canine heart by hypoxia, high K^+ , low pH, and adenosine: possible relevance to ischemia-induced denervation. *Circ. Res.* 66: 289-301, 1990.

Mohlig, S., Reimann, A., Brautigam, M. et Racké, K. Release of endogenous noradrenaline from the rat stomach is inhibited via prostanoid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 345: R63, 1992.

Molderings, G.J., Colling, E., Likungu, J., Jakschik, J. et Gothert, M. Modulation of noradrenaline release from the sympathetic nerves of the human saphenous vein and pulmonary artery by presynaptic EP_3 - and DP-receptors. *Br. J. Pharmacol.* 111: 733-738, 1994.

Molderings, G.J. et Gothert, M. Inhibitory presynaptic imidazoline receptors on sympathetic nerves in the rabbit aorta differ from I_1 and I_2 -imidazoline binding sites. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 351: 507-516, 1996.

Molderings, G.J. et Gothert, M. Imidazoline binding sites and receptors in cardiovascular tissue. *Gen. Pharmacol.* 32: 17-22, 1999.

Molderings, G.J., Hentrich, F. et Gothert, M. Pharmacological characterization of the imidazoline receptor which mediates inhibition of noradrenaline release in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 344: 630-638, 1991.

Molderings, G.J., Likungu, J. et Gothert, M. Modulation of noradrenaline release from the sympathetic nerves of human right atrial appendages by presynaptic EP₃- and DP-receptors. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 358: 440-444, 1998.

Molderings, G.J., Likungu, J. et Gothert, M. Presynaptic cannabinoid and imidazoline receptors in the human heart and their potential relationship. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 360: 157-164, 1999.

Molderings, G.J., Likungu, J., Jakschik, J., Gothert, M. Presynaptic imidazoline receptors and non-adrenoceptor [³H]-idazoxan binding sites in human cardiovascular tissue. *Br. J. Pharmacol.* 122: 43-50, 1997.

Molderings, G.J., Malinowska, B. et Schlicker, E. Inhibition of noradrenaline release in the rat vena cava via prostanoid receptors of the EP₃-subtype. *Br. J. Pharmacol.* 107: 352-355, 1992a.

Molderings, G.J., van Ahlen, H. et Gothert, M. Modulation of noradrenaline release in human corpus cavernosum presynaptic prostaglandin receptors. *Int. J. Impot. Res.* 4: 19-25, 1992b.

Molenaar, P., Roberts, S.J., Kim, Y.S., Pak, H.S., Sainz, R.D. et Summers, R.J. Localization and characterization of two propranolol resistant (-)-[¹²⁵I] cyanopindolol binding sites in rat skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 209: 257-262, 1991.

Molenaar, P., Sarsero, D. et Kaumann, A.J. Proposal for the interaction of non-conventional partial agonists and catecholamines with the "putative β_4 -adrenoceptor" in mammalian heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24: 647-656, 1997.

Moore, N.G., Sillence, M.N., Pegg, G.G. et Lindsay, D.B. Discovery of an atypical β -adrenoceptor in rat skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc. Aust.* 15: 164, 1990.

Moore, N.G., Sillence, M.N., Pegg, G.G. et Lindsay, D.B. Biphasic displacement of [¹²⁵I]iodocyanopindolol by ICI 18551: evidence for an atypical β -adrenoceptor or an enantiomeric artifact? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 18: 43, 1991.

Morris, M.J., Elliot, J.M., Cain, M.D., Kapoor, M.J., West, M.J. et Chalmers, J.P. Plasma neuropeptide Y levels rise in patients undergoing exercise tests for the investigation of chest pain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 13: 437-440, 1986.

Morris, J.L. et Gibbins, I.L. Co-localization and plasticity of transmitters in peripheral autonomic and sensory neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7: 521-531, 1989.

Moura, D., Vaz-da-Silva, M., Magina, S., Pinheiro, H. et Guimaraes, S. Involvement of angiotensin II receptors in the facilitatory effect of bradykinin on noradrenaline release from the rat left ventricle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356: R51, 1997.

Mozdziak, P.E., Greaser, M.L. et Schultz, E. Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 84: 1359-1364, 1998.

Msghina, M., Gonon, F. et Stjarne, L. Facilitation and depression of ATP and noradrenaline release from sympathetic nerves of rat tail artery. *J. Physiol.* 515: 523-531, 1999.

Munch, G., Kurz, T., Urlbauer, T., Seyfarth, M. et Richardt, G. Differential presynaptic modulation of noradrenaline release in human atrial tissue in normoxia and anoxia. *118* : 1855-1861, 1996.

Murphy, R.J.L., Béliveau, L., Gardiner, P.F. et Calderone, A. Nifedipine does not impede clenbuterol-stimulated muscle hypertrophy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221: 184-187, 1999.

Murphy, R.J.L., Gardiner, P.F., Rousseau, G., Bouvier, M. et Béliveau, L. Chronic β -blockade increases skeletal muscle β -adrenergic-receptor density and enhances contractile force. *J. Appl. Physiol.* 83 : 459-465, 1997.

Nakajima, M. et Toda, N. Neuroeffector actions of prostaglandin D₂ on isolated dog mesenteric arteries. *Prostaglandins* 27 : 407-419, 1984.

Naveri, H. Blood hormones and metabolite levels during graded cycle ergometer exercise. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 45: 599-603, 1985.

Nedergaard, O.A. Effect of nicotine on neuroeffector transmission in blood vessels. Dans : *The pharmacology of nicotine*, Rand, M. et Thurau, K. (eds), IRL Press, Oxford Washington DC, pp 143-162, 1988.

Nedergaard, O.A. et Abrahamsen, J. Modulation of noradrenaline release by activation of presynaptic beta-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 604: 528-544, 1990.

Nie, Z.T., Lisjo, S., Astrand, P.-O. et Henriksson, J. In vitro stimulation of the rat epitrochlearis muscle. II. Effects of catecholamines and nutrients on protein degradation and amino acid metabolism. *Acta Physiol Scand.* 135: 523-529, 1989.

Niederhoffer, N. et Szabo, B. Effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on sympathetic cardiovascular regulation. *Br. J. Pharmacol.* 126: 457-466, 1999.

Niklasson, M., Holmang, A. et Lonroth, P. Induction of rat muscle insulin resistance by epinephrine is accompanied by increased interstitial glucose and lactate concentrations. *Diabetologica* 41: 1467-1473, 1998.

Nilsson, C., Kannisto, P., Londvall-Axelsson, M., Owman, C. et Resengren, E. The neuropeptides vasoactive intestinal polypeptide, peptide histidine isoleucine and neuropeptide Y modulate [³H]noradrenaline release from sympathetic nerves in the choroid plexus. *Eur. J. Pharmacol.* 181 : 247-252, 1990.

Noshiro, T., Shimizu, K., Way, D., Miura, Y. et McGrath, B.P. Angiotensin II enhances norepinephrine spillover during sympathetic activation in conscious rabbits. *Am. J. Physiol.* 266: H1864-H1871, 1994.

Nozaki, M. et Sperelakis, N. Pertussis toxin effects on transmitter release from perivascular nerve terminals. *Am. J. Physiol.* 256: H455-H459, 1989.

O'Connor, D.T., Klein, R.L., Thureson-Klein, A.K. et Barbosa, J.A. Chromogranin A: localization and stoichiometry in large dense core catecholamine storage vesicles from sympathetic nerve. *Brain Res.* 567: 188-196, 1991.

Ohia, S.E. et Jumblatt, J.E. Prejunctional inhibitory effects of prostanoids on sympathetic neurotransmission in the rabbit iris-ciliary body. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 11-16, 1990.

Ohia, S.E. et Jumblatt, J.E. Prejunctional prostaglandin receptors in the human iris-ciliary body. *Current Eye Res.* 10: 967-975, 1991.

Ohia, S.E. et Jumblatt, J.E. Prejunctional receptors and second messengers for angiotensin II in the rabbit iris-ciliary body. *Exp. Eye Res.* 57: 419-425, 1993.

Ohmichi, M., Sawada, T., Kanda, Y., Koike, K., Hirota, K., Miyake, A. et Bernstein, K.E. Thyrotropin-releasing hormone stimulates MAP kinase activity in GH3 cells by divergent pathways. *J. Biol. Chem.* 269 : 3783-3788, 1994.

Oksbjerg, N., Henckel, P. et Rolph, T. Effects of salbutamol, a β_2 -adrenergic agonist, on muscles of growing pigs fed different levels of dietary protein. I. Muscle

fibre properties and muscle protein accretion. *Acta Agric. Scand. Sect. A Anim. Sci.* 44: 12-19, 1994.

Oliver, J.A., Pinto, J., Sciacca, R.R. et Cannon, P.J. Basal norepinephrine overflow into the renal vein: effect of renal nerve stimulation. *Am. J. Physiol.* 239: F371-F377, 1980.

Olsson, R.A. et Pearson, J.D. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol. Rev.* 70: 761-845, 1990.

Oota, I. et Nagai, T. Effects of catecholamines on excitation-contraction coupling from single twitch fiber. *Jpn. J. Physiol.* 27: 195-213, 1977.

Oriowo, M.A. Atypical β -adrenoceptors in the rat isolated common carotid artery. *Br. J. Pharmacol.* 113: 699-702, 1994.

Oriowo, M.A. Different atypical β -adrenoceptors mediate isoprenaline-induced relaxation in vascular and non-vascular smooth muscles. *Life Sci.* 56: PL269-PL275, 1995.

Osswald, W. et Guimaraes, S. Adrenergic mechanisms in blood vessels: morphological and pharmacological aspects. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 96: 53-122, 1983.

Palmer, R.M., Delday, M.I., McMillan, D.N., Noble, B.S., Bain, P. et Maltin, C.A. Effects of the cyclo-oxygenase inhibitor, fenbufen, on clenbuterol-induced hypertrophy of cardiac and skeletal muscle of rats. *Br. J. Pharmacol.* 101: 835-838, 1990.

Pan, H. L., Stebbins, C.L. et Longhurst, J.C. Bradykinin contributes to the exercise pressor reflex: mechanism of action. *J. Appl. Physiol.* 75: 2061–2068, 1993.

Parker, D.A.S., Hennian, E., Marino, V. et de la Lande, I.S. Inhibitory effects of adrenaline on the release of noradrenaline from sympathetic nerves in human dental pulp. *Arch. Oral Biol.* 44: 391-394, 1999.

Pendry, Y.D. et Maclagan, J. Evidence for inhibition of sympathetic neurotransmission by endogenously released acetylcholine in the guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.* 104: 817-822, 1991.

Pernow, J., Lundeberg, J.M., Kauser, L., Hjemdahl, P., Theodorsson-Norheim, E., Martinsson, A. et Pernow, B. Plasma neuropeptide Y-like immunoreactivity and

catecholamines during various degrees of sympathetic activation in man. *Clin. Physiol.* 6: 561-578, 1986.

Pernow, J., Kahan, T., Hjemdahl, P., Lundberg, J.M. Possible involvement of neuropeptide Y in sympathetic vascular tone control of canine skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 132: 43-50, 1988.

Péronnet, F., Nadeau, R., Boudreau, G., Cardinal, R., Lamontagne, D., Yamaguchi, N. et De Champlain, J. Epinephrine release from the heart during left stellate ganglion stimulation in dogs. *Am. J. Physiol.* 254: R659-R662, 1988.

Persson, M.G., Hedqvist, P. et Gustafsson, L.E. Nerve-induced tachykinin-mediated vasodilation in skeletal muscle dependent on nitric oxide formation. *Eur. J. Pharmacol.* 205: 295-301, 1991.

Pfliegler, G., Szabo, I. et Kovacs, T. The influence of catecholamines on Na, K transport in slow- and fast-twitch muscles of the rat. *Pflugers Arch.* 398: 236-40, 1983.

Pitcher, J.A., Payne, E.S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A.A. et Lefkowitz, R.J. The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a

distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 8343, 8347, 1995.

Plenz, E. Nicotinic facilitation of the electrically evoked release of noradrenaline from the guinea pig myenteric plexus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 341: R86, 1990.

Plourde, G., Rousseau-Mignerot, S. et Nadeau, A. Effect of endurance training on β -adrenergic system in three different skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 74 : 1641-1646, 1993.

Prakash, Y.S., Van Der Heijden, H.F.M., Gallant, E.M. et Sieck, G.C. Effect of β -adrenoceptor activation on $[Ca^{2+}]_i$ regulation in murine skeletal myotubes. *Am. J. Physiol.* 276 : C1038-C1045, 1999.

Preitner, F., Muzzin, P., Revelli, J.-P., Seydoux, J., Galitzky, J., Berlan, M., Lafontan, M. et Giacobino, J.-P. Metabolic response to various β -adrenoceptor agonists in β_3 -adrenoceptor knockout mice: Evidence for a new β -adrenergic receptor in brown adipose tissue. *Br. J. Pharmacol.* 124: 1684-1688, 1998.

Proctor, K.G. et Bohlen, H.G. Exercise hyperemia in the absence of tissue PO_2 decrease. *Blood vessels* 18: 58-66, 1981.

Przywara, D.A., Bhave, S.V., Bhave, A., Wakade, T.D. et Wakade, A.R. Dissociation between intracellular Ca^{2+} and modulation of [^3H]noradrenaline release in chick sympathetic neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 437 : 201-220, 1991.

Racké, K., Bähring, J. et Wessler, I. Release of endogenous noradrenaline from the rat isolated trachea is inhibited via prostaglandin receptors of the EP_3 -subtype. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 344 : R128, 1991.

Radawski, D.P., Hoppe, W. et Haddy, F.J. Role of vasoactive substances in active hyperemia in skeletal muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148: 270-276, 1975.

Rand, J.J., Majewski, H. et Story, D.F. Modulation of neuroeffector transmission. Dans : *Cardiovascular pharmacology*, 3rd edn, Antonaccio, M. (ed.), Raven, New York, 1990, pp. 229-292.

Richter, E.A., Ruderman, N.B., Gavras, H., Belur, E.R. et Galbo, H. Muscle glycogenolysis during exercise: dual control by epinephrine and contractions. *Am. J. Physiol.* 242: E25-E32, 1982.

Roberts, S.J., Molenaar, P. and Summers, R.J. Characterization of propranolol-resistant (-)-[¹²⁵I]-cyanopindolol binding sites in rat soleus muscle. *Br. J. Pharmacol.* 109: 344-352, 1993.

Roberts, S.J. et Summers, R.J. Cyclic AMP accumulation in rat soleus muscle: stimulation by β_2 - but not β_3 -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 53-60, 1998.

Roeder, R.A., Hackmann, N.L., Arnzen, J.M. et Hunt, C.W. Effect of β -adrenergic agonists on protein turnover in muscle cell cultures. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 46: 1177, 1987.

Rolett, E.L., Strange, S., Sjogaard, G., Kiens, B. et Saltin, B. β_2 -adrenergic stimulation does not prevent potassium loss from exercising quadriceps muscle. *Am. J. Physiol.* 258: R1192-R1200, 1990.

Rongen, G.A., Brooks, S.C., Ando, S.-I., Abramson, B.L. et Floras, J.S. Angiotensin AT receptor blockade abolishes the reflex sympatho-excitatory response to adenosine. *J. Clin. Invest.* 101: 769-776, 1998.

Rosell, S., Axelrod, J. et Kopin, I.J. Release of tritiated epinephrine following sympathetic nerve stimulation. *Nature.* 201: 301, 1964.

Rothwell, N.J. et Stock, M.J. Increased body weight gain and body protein in castrated and adrenalectomized rats treated with clenbuterol. *Br. J. Nutr.* 60: 355-360, 1988.

Rothwell, N.J., Stock, M.J. et Sudera, D.K. Changes in tissue blood flow and β -receptor density of skeletal muscle in rats treated with the β_2 -adrenoceptor agonist clenbuterol. *Br J Pharmacol.* 90: 601-607, 1987.

Rotto, D.M., Massey, K.D., Burton, K.P. et Kaufman, M.P. Static contractions increases arachidonic acid levels in gastrocnemius muscles of cats. *J. Appl. Physiol.* 66: 2721-2724, 1989.

Rump, L.C., Berlit, T., Schwertfeger, E., Beyersdorf, F., Schollmeyer, P. et Bohmann, C. Angiotensin converting enzyme inhibition unmasks the sympathofacilitatory effect of bradykinin in the human right atrium. *J. Hypertens.* 15: 1263-1270, 1997.

Rump, L.C., Bohmann C., Schaible, U., Schultze-Seemann, W. et Schollmeyer, P.J. β -adrenergic, angiotensin II, and bradykinin receptors enhance neurotransmission in human kidney. *Hypertension* 26 : 445-451, 1995.

Rump, L.C. et Majewski, H. Modulation of norepinephrine release through α_1 - and α_2 -adrenoceptors in rat isolated kidney. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9: 500-507, 1987.

Rundqvist, B., Eisenhofer, G., Emanuelsson, H., Albertsson, P. et Friberg, P. Intracoronary blockade of angiotensin-converting enzyme in humans: Interaction with cardiac sympathetic neurotransmission. *Acta Physiol. Scand.* 161: 15-22, 1997.

Sahlin, K. et Broberg, S. Release of K^+ from muscle during prolonged dynamic exercise. *Acta Physiol. Scand.* 136: 293-294, 1989.

Salviati, G., Sorenson, M.M. et Eastwood, A.B. Calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in two populations of chemically skinned human muscle fibers. Effects of calcium and cyclic AMP. *J. Gen. Physiol.* 79: 603-632, 1982.

Sarsero, D., Molenaar, P., Kaumann, A.J. et Freestone, N.S. Putative β_4 -adrenoceptors in rat ventricle mediate increase in contractile force and cell Ca^{2+} : comparison with atrial receptors and relationship to (-)-[3H]-CGP 12177 binding. *Br. J. Pharmacol.* 128: 1445-1460, 1999.

Satoh, T., Nakafuku, M. and Kaziro, Y. Function of ras as a molecular switch in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267 : 24149-24152, 1992.

Savard, G., Strange, S., Kiens, B., Richter, E.A., Christensen, N.J. et Saltin, B. Noradrenaline spillover during exercise in active versus resting skeletal muscle in man. *Acta Physiol. Scand.* 131: 507-515, 1987.

Savard, G.K., Richter, E.A., Strange, S., Kiens, B., Christensen N.J. et Saltin, B. Norepinephrine spillover from skeletal muscle during exercise in humans: role of muscle mass. *Am. J. Physiol.* 257: H1812-H1818, 1989.

Schafers, M., Dutka, D., Rhodes, C.G., Lammerstsma, A.A., Hermansen, F., Schober, O. et Camici, P.G. Myocardial presynaptic and postsynaptic autonomic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res.* 82: 57-62, 1998.

Scheurink, A.J.W., Mundinger, T.O., Dunning, B.E., Veith, R.C. et Taborsky, G.J. α_2 -adrenergic regulation of galanin and norepinephrine release from canine pancreas. *Am. J. Physiol.* 262: R819-R825, 1992.

Schlicker, E., Malinowska, B. et Kathmann, M. CGP 35348 blocks noradrenaline-release-inhibiting GABA_B receptors in the pig retina, rat vena cava and pithed rat vasculature. *Pharmacology* 47: 111-116, 1993.

Schmitt, M.P., Meunier, P., Rochas, A. et Chatonnet, J. Catecholamines and oxygen uptake in dog skeletal muscle in situ. *Pfluegers Arch.* 345: 145-158, 1973.

Schwartz, D.D. et Eikenburg, D.C. Effects of synthetic ANF (rANF(3-28)) on sympathetic neurotransmission in the isolated perfused rat kidney. *Life Sci.* 48: 781-787, 1991.

Schwieler, J.H., Kahan, T., Nussberger, J. et Hjendahl, P. Converting enzyme inhibition modulates sympathetic neurotransmission *in vivo* via multiple mechanisms. *Am. J. Physiol.* 264: E631-E637, 1993.

Schwieler, J.H., Kahan, T., Nussberger, J. and Hjendahl, P. Participation of prostaglandins and bradykinin in the effects of angiotensin II and converting enzyme-inhibition on sympathetic neurotransmission *in vivo*. *Acta Physiol. Scand.* 152 : 83-91, 1994.

Schwieler, J.H., Kahan, T., Nussberger, J., Johansson, M.C. et Hjendahl, P. Influence of angiotensin II, α - and β -adrenoceptors on peripheral noradrenergic neurotransmission in canine gracilis muscle *in vivo*. *Acta Physiol. Scand.* 145: 333-343, 1992.

Schwieler, J.H., Nussberger, J., Kahan, T. et Hjendahl, P. Nerve stimulation augments angiotensin II overflow from canine gracilis muscle *in vivo*. *J. Hypertens.* 9 : 487-490, 1991.

Schwieler, J.H., Nussberger, J., Kahan, T. et Hjendahl, P. Angiotensin II overflow canine skeletal muscle in vivo : importance of plasma angiotensin I. *Am. J. Physiol.* 266 : R1664-R1669, 1994.

Scott, J.B., Rudko, M., Radawski, D. et Haddy, F.J. Role of osmolarity, K^+ , H^+ , Mg^{++} et O_2 in local blood flow regulation. *Am. J. Physiol.* 218: 338-345, 1970.

Segal, S.S. et Kurjiaka, D.T. Coordination of blood flow control in the resistance vasculature of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 1158-1164, 1995.

Seyedi, N., Win, T., Lander, H.M. et Levi, R. Bradykinin B_2 -receptor activation augments norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings. Mediation by autocrine/paracrine mechanisms. *Circ. Res.* 81: 774-784, 1997.

Seyfarth, M., Feng, Y., Hagl, S., Sebening, F., Richardt, G. et Schomig, A. Effect of myocardial ischemia on stimulation-evoked noradrenaline release. Modulated neurotransmission in rat, guinea pig, and human cardiac tissue. *Circ. Res.* 73: 496-502, 1993.

Shafiei M. et Mahmoudian M. Atypical beta-adrenoceptors of rat thoracic aorta. *Gen. Pharmacol.* 32: 557-62, 1999.

Shen, Y.-T., Zhang, H. et Vatner, S.F. Peripheral vascular effects of β -3 adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 466-473, 1994.

Shimizu, K., Wang, Z.-Q., Way, D.J., Palmos, J. et McGrath, B.P. Enalaprilat suppresses hindlimb noradrenaline spillover during exercise in the rabbit. *J. Hypertens.* 11: S158-S159, 1993.

Sillence, M.N. et Matthews, M.L. Classical and atypical binding sites for β -adrenoceptor ligands and activation of adenylyl cyclase in bovine skeletal muscle and adipose tissue membranes. *Br J Pharmacol.* 111: 866-872, 1994.

Sillence, M.N., Matthews, M.L., Moore, N.G. et Reich, M.M. Effects of BRL-47672 on growth, β_2 -adrenoceptors, and adenylyl cyclase activation in female rats. *Am. J. Physiol.* 268: E159-E167, 1995.

Sillence, M.N., Matthews, M.L., Spiers, W.G., Pegg, G.G. et Lindsay, D.B. Effects of clenbuterol, ICI118551 and sotalol on the growth of cardiac and skeletal muscle and on β_2 -adrenoceptor density in female rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 344: 449-453, 1991.

Sillence, M.N., Moore, N.G., Pegg G.G. et Lindsay, D.B. Ligand binding properties of putative β_3 -adrenoceptors compared in brown adipose tissue and in skeletal muscle membranes. *Br J Pharmacol.* 109 : 1157-1163, 1993.

Sjogaard, G., Adams, R.P. et Saltin, B. Water and ion shifts in skeletal muscle of humans with intense dynamic knee extension. *Am. J. Physiol.* 248: R190-R196, 1985.

Skinner, N.S. et Costin, J.C. Interactions between oxygen, potassium, and osmolality in regulation of skeletal muscle blood flow. *Circ. Res.* 28s : I-73-I85, 1971.

Stainsby, W.N., Sumners, C. et Eitzman, P.D. Effects of adrenergic agonists and antagonists on muscle O₂ uptake and lactate metabolism. *J. Appl. Physiol.* 62: 1845-51, 1987.

Stankiewicz-Choroszuca, B. et Gorski, J. Effect of beta-adrenergic blockade on intramuscular triglyceride mobilization during exercise. *Experientia* 34: 357-358, 1978.

Starke, K. Presynaptic α -autoreceptor. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 107: 73-146, 1987.

Starke, K., Peskar, B.A., Schumacher, K.A. et Taube, H.D. Bradykinin and postganglionic sympathetic transmission. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 299: 23-32, 1977.

Stebbins, C.L., Carretero, O.A., Mindroiu, T. et Longhurst, J.C. Bradykinin release from contracting skeletal muscle of the cat. *J. Appl. Physiol.* 69 : 1225-1230, 1990.

Stein, M., Deegan, R., He, H. et Wood, A.J.J. β -adrenergic receptor-mediated release of norepinephrine in the human forearm. *Clin. Pharmacol. Ther.* 54: 58-64, 1993.

Sterne-Marr, R. et Benovic, J.L. Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins. *Vitam. Horm.* 51: 193-234, 1995.

Stjarne, L. Basic mechanisms and local modulation of nerve impulse-induced secretion of neurotransmitters from individual sympathetic nerve varicosities. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 112: 4-137, 1989.

Storgaard, T. et Nedergaard, O.A. Prejunctional modulation by angiotensins of noradrenaline release from sympathetic neurons in isolated rabbit aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356: 706-711, 1997.

Story, D.F., Standford-Starr, C.A. et Rand, M.J. Evidence for the involvement of α -adrenoceptors in negative feedback regulation of noradrenergic transmitter release in rat atria. *Clin. Sci.* 68: 111s-115s, 1985.

Strosberg, A.D. Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 421-450, 1997.

Summers, R.J., Russell, F.D., Roberts, S.J., Bonazzi, V.R., Sharkey, A., Evans, B.A. et Molenaar, P. Localisation and characterisation of atypical β -adrenoceptors in skeletal muscle and gut. *Pharmacol. Commun.* 6: 237-252, 1995.

Suzuki, J., Gao, M., Xie, Z. et Koyama, T. Effects of the β_2 -adrenergic agonist clenbuterol on capillary geometry in cardiac and skeletal muscles in young and middle-aged rats. *Acta Physiol. Scand.* 161: 317-326, 1997.

Suzuki, Y., Matsumura, Y., Egi, Y. et Morimoto, S. Effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on norepinephrine overflow and antidiuresis induced by stimulation of renal nerves in anesthetized dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263: 956-963, 1992.

Svedenhag, J., Henriksson, J. et Juhlin-Dannfelt, A. Beta-adrenergic blockade and training in human subjects: effects on muscle metabolic capacity. *Am. J. Physiol.* 247: E305-E311, 1984.

Symons, J.D., Theodossy, S.J., Longhurst, J.C., Stebbins, C.L. Intramuscular accumulation of prostaglandins during static contraction of the cat triceps surae. *J. Appl. Physiol.* 71: 1837-1842, 1991.

Szabo, B., Hedler, L., Schurr, C. et Starke, K. ACTH increases noradrenaline release in the rabbit heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 338: 368-372, 1988.

Tada, M., Kadoma, M., Inui, M. et Fujii, J. Regulation of Ca^{2+} -pup from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Methods Enzymol.* 157: 107-154, 1988.

Tagaya, E., Tamaoki, J., Takemura, H., Isono, K. et Nagai, A. Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cyclic adenosine monophosphate-dependent pathway. *Lung* 177: 321-332, 1999.

Takahashi, H., Yoshida, T., Nishimura, M., Nakanishi, T., Kondo, M. et Yoshimura, M. Beta3-adrenergic agonist, BRL-26830A, and alpha/beta blocker, arotinolol, markedly increase regional blood flow in the brown adipose tissue in anesthetized rats. *Jpn. Circ. J.* 56: 936-942, 1992.

Takahashi, K., Mouri, T., Murakami, O., Itoi, K., Sone, M., Ohneda, M., Nozuki, M. et Yoshinaga, K. Increases of neuropeptide Y-like immunoreactivity in plasma during insulin hypoglycemia in man. *Peptides* 9: 433-435, 1988.

Takiyyuddin, M.A., Brown, M.R., Dinh, T.Q., Cervenka, J.H., Braun, S.D., Parmer, R.J., Kennedy, B. et O'Connor, D.T. Sympatho-adrenal secretion in humans: factors governing catecholamine and storage vesicle peptide co-release. *J. Auton. Pharmacol.* 14: 187-200, 1994.

Takiyyuddin, M.A., Cervenka, J.H., Sullivan, P.A., Pandian, M.R., Parmer, R.J., Barbosa, J.A. et O'Connor, D.T. Is physiologic sympathoadrenal catecholamine release exocytotic in humans? *Circ.* 81: 185-195, 1990.

Tanishita, T., Shimizu, Y., Minokoshi, Y. et Shimazu, T. The beta3-adrenergic agonist BRL37344 increases glucose transport into L6 myocytes through a mechanism different from that of insulin. *J. Biochem. (Tokyo)* 122: 90-95, 1997.

Thiringer, G. et Svedmyr, N. Evaluation of skeletal muscle tremor due to bronchodilator agents. *Scand. J. Respir. Dis.* 56: 93-, 1975.

Thomas, R.F. et Liggett, S.B. Lack of β_3 -adrenergic receptor mRNA expression in adipose and other metabolic tissues in the adult human. *Mol. Pharmacol.* 43: 343-348, 1993.

Thompson, J.M., Wallin, B.G., Lambert, G.W., Jennings, G.L. et Esler, M.D. Human muscle sympathetic activity and cardiac catecholamine spillover: no support for augmented sympathetic noradrenaline release by adrenaline co-transmission. *Clin. Sci.* 94 : 383-393, 1998.

Thurlby, P.L. et Ellis R.D.M. Differences between the effects of noradrenaline and the β -adrenoceptor agonist BRL 28410 in brown adipose tissue and hindlimb of the anaesthetized rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64: 1111-1114, 1986.

Todorov, L.D., Bjur, R.A. et Westfall, D.P. Temporal dissociation of the release of the sympathetic co-transmitters ATP and noradrenaline. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 21: 931-932, 1994.

Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S.T., Bjur, R.A. et Westfall, D.P. Differential cotransmission in sympathetic nerves: Role of frequency of stimulation and prejunctional autoreceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 241-246, 1999.

Todorov, L.D. Mihaylova-Todorova, S.T., Cravison, G.L., Bjur, R.A. et Westfall, D.P. Evidence for the differential release of the cotransmitters ATP and noradrenaline from sympathetic nerves of the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol. (Lond.)* 496: 731-748, 1996.

Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S.T., Westfall, T.D., Sneddon, P. Kennedy, C. et Westfall D.P. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387: 76-79, 1997.

Todorov, L., Windisch, K., Shersen, H., Lajtha, A., Papasova, M. et Vizi, E.S. Prejunctional nicotinic receptors involved in facilitation of stimulation-evoked noradrenaline release from the vas deferens of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 341: 30-36, 1991.

Tominaga, S., Suzuki, T. et Nakamura, T. Evaluation of roles of potassium, inorganic phosphate, osmolarity, pH, pCO₂, pO₂, and adenosine or AMP in exercise and reactive hyperemias in canine hindlimb muscles. *Tohoku J. Exp. Med.* 109: 347-363, 1973.

Tomura, Y., Yamagata, T., Hisa, H. et Satoh, S. Effects of atrial natriuretic peptide on adrenergically induced norepinephrine release and vasoconstriction in the dog kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 255-258, 1991.

Torgan, C.E., Brozinick, J.T., Banks, E.A., Cortez, M.Y., Wilcox, R.E. et Ivy, J.L. Exercise training and clenbuterol reduce the insulin resistance of obese zucker rats. *Am. J. Physiol.* 264: E373-E379, 1993a.

Torgan, C.E., Etgen, G.J., Brozinick, J.T., Wilcox, R.E. et Ivy, J.L. Interaction of aerobic exercise training and clenbuterol: effects on insulin-resistant muscle. *J. Appl. Physiol.* 75: 471-1476, 1993b.

Torres, G., Bitran, M. et Huidobro-Toro, J.P. Co-release of neuropeptide Y (NPY) and noradrenaline from the sympathetic nerve terminals supplying the rat vas deferens; influence of calcium and the stimulation intensity. *Neurosci. Letters* 148: 39-42, 1992.

Toth, P.T., Bindokas, V.P., Bleakman, D., Colmers, W.F. et Miller, R.J. Mechanism of presynaptic inhibition by neuropeptide Y at sympathetic nerve terminals. *Nature* 364: 635-639, 1993.

Trendelenburg, A.U., Cox, S.L., Klebroff, W., Khairallah, L. et Starke, K. Modulation of H-noradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and β -adrenoceptors in mouse tissue. *Br. J. Pharmacol.* 130: 321-330, 2000.

Tsuda, K., Shima, H., Ura, M., Takeda, J., Kimura, K., Nishio, I. et Masuyama, Y. role of substance P and neurotensin in the regulation of neurosecretion and vascular responsiveness in hypertension. *J. Hypertens.* 6: S539-S541, 1988.

Tsuda, K., Tsuda, S., Goldstein, M., Nishio, I. et Masuyama, Y. Effects of bradykinin on [³H]-norepinephrine release in rat hypothalamus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 20: 787-791, 1993.

Tsuda, K., Tsuda, S. et Masuyama, Y. Enhanced endogenous epinephrine release from the vascular adrenergic neurons in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 3: 52-54, 1990.

Vallieres, J., Cote, C. et Bukowiecki, L. Regulation of beta-adrenergic receptors in rat skeletal muscle by catecholamines in vivo. *Gen. Pharmacol.* 10: 63-7, 1979.

Van Mil, H.G.J., Kerkhof, C.J.M. et Siegenbeek van Heukelom, J. Modulation of the isoprenaline-induced membrane hyperpolarization of mouse skeletal muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2881-2888, 1995.

Vanhoutte, P.M., Verbeuren, T.J. et Webb, R.C. Local modulation of adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Physiol. Rev.* 61: 151-247, 1981.

- Vaz-da-Silva, M., Magina, S., Domingues-Costa, A., Moura, D. et Guimaraes, S. The role of the endocardium in the facilitatory effect of bradykinin on electrically-induced release of noradrenaline in rat cardiac ventricle. *Br. J. Pharmacol.* 118 : 364-368, 1996.
- Verbeuren, T.J., Janssens, W.J. et Vanhoutte, P.M. Effects of moderate acidosis on adrenergic neurotransmission in canine saphenous veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206: 105-114, 1978.
- Vestergaard, M., Henckel, P., Oksbjerg, N. et Sejrsen, K. The effect of cimaterol on muscle fiber characteristics, capillary supply, and metabolic potentials on longissimus and semitendinosus muscles from young friesland bulls. *J. Anim. Sci.* 72: 2298-2306, 1994.
- Von Kugelgen, I., Allgaier, C., Schobert, A. et Starke, K. Co-release of noradrenaline and ATP from cultured sympathetic neurons. *Neurosci.* 61: 199-202, 1994.
- Wagner, J.A., Varga, K. et Kunos, G. Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. *J. Mol. Med.* 76: 824-836, 1998.

- Wennmalm, M., Fredholm, B.B. et Hedqvist, P. Adenosine as a modulator of sympathetic nerve-stimulation-induced release of noradrenaline from the isolated rabbit heart. *Acta. Physiol. Scand.* 132: 487-494, 1988.
- Westfall, D.P., Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S.T. et Bjur, R.A. Differences between the regulation of noradrenaline and ATP release. *J. Autonom. Pharmacol.* 16: 393-395, 1996.
- Willems, J.L., Buylaert, W.A., Lefebvre, R.A. et Bogaert, M.G. Neuronal dopamine receptors on autonomic ganglia and sympathetic nerves and dopamine receptors in the gastrointestinal system. *Pharmacol. Rev.* 37: 165-216, 1985.
- Williams, J.H. et Barnes, W.S. The positive inotropic effect of epinephrine on skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 12: 968-975, 1989.
- Williams, R.S., Caron, M.G. et Daniel, K. Skeletal muscle β -adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. *Am. J. Physiol.* 246: E160-E167, 1984.
- Wilson, J.R. et Kapoor, S.C. Contribution of prostaglandins to exercise-induced vasodilation in humans. *Am. J. Physiol.* 265: H171-H175, 1993.

- Wollenberger, A. et Shahab, L. Anoxia-induced release of noradrenaline from the isolated perfused heart. *Nature* 207: 88-89, 1965.
- Wong, P.C., Hart, S.D. et Timmermans, P.B.M.W.M. Effect of angiotensin II antagonism on canine renal sympathetic nerve function. *Hypertension* 17: 1127-1134, 1991.
- Xiang, J.Z., Archelos, J. et Lang, R.E. Enkephalins in the heart. *Clin. Exp. Theory Pract. A* 6: 1883-1888, 1984.
- Yamaguchi, N., de Champlain, J. et Nadeau, R. Correlation between the response of the heart to sympathetic stimulation and the release of endogenous catecholamines into the coronary sinus of the dog. *Circ. Res.* 36: 662-668, 1975.
- Yang, X.-P. et Chiba, S. Dissociation of inhibitory effects of guanethidine on adrenergic and on purinergic transmission in isolated canine splenic artery. *Eur. J. Pharmacol.* 380: 5-11, 1999.
- Yang, Y.T. et McElligott, M.A. Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem J.* 261: 1-10, 1989.

- Yokotani, K. et Osumi, Y. Cholinergic M_2 muscarinic receptor-mediated inhibition of endogenous noradrenaline release from the vascularly perfused rat stomach. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 54-60, 1993.
- Young, E.W. et Sparks, H.V. Prostaglandins and exercise hyperemia of dog skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 238: H1192-H1202, 1980.
- Young, R.B., Bridge, K.Y. et Strietzel, C.J. Effect of electrical stimulation on β -adrenergic receptor population and cyclic AMP production in chicken and rat skeletal muscle cells cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36: 167-173, 2000.
- Zeman, R.J., Ludemann, R., Easton, T.G. et Etlinger, J.D. Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a β_2 -receptor agonist. *Am. J. Physiol.* 254: E726-E732, 1988.
- Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G. et Ferguson, S.S.G. Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/ β -arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem.* 274: 10999-11006, 1999.
- Zimmerman, B.G. et Whitmore, L. Transmitter release in skin and muscle blood vessels during sympathetic stimulation. *Am. J. Physiol.* 212: 1043-1054, 1967.