

Université de Nantes

Faculté de Médecine

**LES RECEPTEURS β_3 -ADRENERGIQUES DANS LE
SYSTEME CARDIOVASCULAIRE :**

**ROLES PHYSIOPATHOLOGIQUES ET
IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale de CHIMIE-BIOLOGIE

Discipline : Biologie-Médecine-Santé

Spécialité : Pharmacologie et Physiologie Cardiovasculaires

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Bertrand ROZEC

le 31 octobre 2006, devant le jury ci-dessous :

Président : M. LE MAREC Hervé, Professeur, Université de Nantes.

Rapporteurs : M. RICHARD Sylvain, Directeur de recherche, INSERM U637, Montpellier.

M. TEDGUI Alain, Directeur de recherche, INSERM U689, Paris.

Examineurs : M. BALLIGAND Jean-Luc, Professeur, Université Catholique de Louvain.

M. BLANLCEIL Yvonnick, Professeur, Université de Nantes.

Mme GAUTHIER-ERFANIAN Chantal, Maître de conférence,

Université de Nantes.

Directeur de thèse : Mme GAUTHIER-ERFANIAN Chantal, Maître de conférence,

Université de Nantes.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES ABREVIATIONS	7
AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION	16
I. Le récepteur β_3-adrénergique dans le système cardiovasculaire	19
A. Structure et caractéristiques du récepteur β_3-adrénergique	19
1. Structure du gène	19
2. Structure de la protéine	21
B. Pharmacologie des récepteurs β_3-adrénergiques	23
1. Les agonistes β_3 -ARs	24
2. Les antagonistes β_3 -ARs	26
C. Les récepteurs β_3-adrénergiques cardiaques	28
1. Effets sur la contractilité	30
2. Les effets électrophysiologiques	33
3. Les voies de signalisation	35
D. Les récepteurs β_3-adrénergiques vasculaires	40
1. Les études in vivo	42
2. Les artères de conduction	44
3. Les artères de résistance	46
4. La circulation pulmonaire	47
5. Le système veineux	48

6. Corps caverneux	49
7. Voies de signalisation	49
E. Implication des récepteurs β_3-adrénergiques dans les pathologies cardiovasculaires	51
1. Insuffisance cardiaque	51
2. Hypertension artérielle systémique	55
3. Obésité et diabète	58
4. Coronaropathie	59
II. Angiogenèse	62
A. Vasculogenèse-Angiogenèse-Artériogenèse	62
B. Régulateurs de l'angiogenèse	64
1. Les métalloprotéinases	67
2. Les facteurs pro-angiogéniques	69
(a) Structure et régulation de l'expression du VEGF	69
(b) Fonctions du VEGF	70
(c) Voies de signalisation du VEGF	71
3. Facteurs anti-angiogéniques	73
(a) Les interférons	73
(b) Les interleukines	74
(c) Fragments protéolytiques	74
▪ <i>Angiostatine</i>	74
▪ <i>Endostatine</i>	75
(d) Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases	75
(e) Autres molécules angiostatiques	75
(f) Le NO : un facteur angiogénique	75
C. Rôle des catécholamines dans l'angiogenèse	77
D. Angiogenèse : implications pathologiques et thérapeutiques	80
III. Le choc septique	83
A. Définitions et épidémiologie	83
B. Physiopathologie	86
1. Signaux et récepteurs	87

2. Le rôle de NF- κ B	93
3. Les cytokines pro-inflammatoires	94
4. Les cytokines anti-inflammatoires	95
C. Le système cardiovasculaire au cours du sepsis	97
1. Dysfonction cardiaque au cours du sepsis	97
(a) Historique	97
(b) Hypoperfusion coronaire	98
(c) Facteurs circulants	99
(d) Mécanismes cellulaires intrinsèques	99
▪ <i>Homéostasie calcique et couplage contraction excitation</i>	99
▪ <i>La voie du NO et du peroxy-nitrite</i>	100
▪ <i>Apoptose</i>	102
▪ <i>Récepteurs β-adrénergiques</i>	102
2. Dysfonction vasculaire au cours du sepsis	104
(a) Les mécanismes responsables de la vasodilatation	104
▪ <i>Activation des canaux potassiques ATP-dépendant dans les cellules musculaires lisses vasculaires</i>	105
▪ <i>Augmentation de synthèse du NO</i>	108
▪ <i>Déficit en vasopressine</i>	110
(b) La défaillance endothéliale	111
▪ <i>Vasomotricité</i>	112
▪ <i>Perméabilité vasculaire</i>	113
▪ <i>Recrutement et adhésion leucocytaire</i>	113
▪ <i>Hémostase</i>	114
(c) Microcirculation	114
▪ <i>Régulation de la microcirculation</i>	115
▪ <i>Altération de la régulation de la microcirculation</i>	115
▪ <i>Dysfonction mitochondriale</i>	117
▪ <i>Syndrome de détresse microcirculatoire et mitochondriale</i>	117
(d) Les récepteurs adrénérgiques vasculaires au cours du choc septique	119
D. Modèles expérimentaux de sepsis	120
1. Sélection de l'espèce animale	121
2. Modèle d'endotoxémie	121
3. Perfusion intraveineuse de bactéries	122

4. Modèles de péritonites	122
MATERIEL ET METHODES	124
I. Etude de la vasomotricité	125
A. Modèles expérimentaux	125
1. Artère mammaire interne humaine	126
2. Aorte thoracique de rat	129
(a) Rats Sprague-Dawley	129
(b) Rats Sprague-Dawley endotoxémiques	129
(c) Prélèvement de l'aorte thoracique de rat	129
B. Etudes hémodynamiques	129
C. Etude en cuves à organes isolés	130
1. Dispositif expérimental	130
2. Protocoles expérimentaux	131
D. Analyse statistique	133
E. Substances pharmacologiques utilisées	135
II. Etude sur myocarde humain	137
A. Origine des prélèvements	137
B. Dispositif expérimental	138
C. Protocole expérimental	139
D. Analyse des résultats	139
E. Substances pharmacologiques utilisées	141
III. Etude de l'activité angiogénique	142
A. Les lignées cellulaires	142
B. Adénovirus	142
1. Cycle de l'adénovirus sauvage	143
2. Vecteurs adénoviraux	143
(a) Principes généraux de construction d'un vecteur adénoviral	143
(b) Adénovirus utilisés et amplification	148

(c) Infection des lignées cellulaires	149
C. Lignées de souris utilisées pour les approches <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	149
1. Expériences <i>in vivo</i>	149
2. Expériences <i>ex vivo</i>	150
D. Méthode d'étude de l'angiogenèse	150
1. Méthodes <i>in vitro</i>	150
(a) Culture de cellules endothéliales sur une matrice de Matrigel®	150
▪ <i>Matrigel®</i>	150
▪ <i>Protocoles expérimentaux</i>	151
▪ <i>Analyse des résultats</i>	152
(b) Sphéroïdes de cellules endothéliales en gel de collagène	1152
▪ <i>Constitution des sphéroïdes d'HUVEC</i>	152
▪ <i>Gel de collagène</i>	153
▪ <i>Analyse des résultats</i>	153
2. Méthodes <i>ex vivo</i>	154
(a) Prélèvements	154
(b) Gel de collagène	154
(c) Protocole expérimental	154
(d) Analyse des résultats	155
3. Méthode <i>in vivo</i>	156
(a) Modèle d'ischémie de membre postérieur chez la souris	156
(b) Mesure du flux sanguin cutané	156
(c) Analyse des résultats	157
4. Substances pharmacologiques utilisées	157
IV. Biologie moléculaire	159
A. Préparation des ARNs totaux	159
B. Reverse transcription-amplification par polymérisation en chaîne	159
1. La reverse transcription	160
2. L'amplification par réaction en chaîne de polymérisation	160

V. Etudes biochimiques	162
A. Immuno-empreintes	162
1. Protocole pour les artères mammaires internes	162
(a) Préparation des extraits protéiques	162
(b) Gels de protéines et analyse par immuno-empreinte	162
2. Protocole pour les cellules endothéliales	163
(a) Préparation des extraits protéiques	163
(b) Gels de protéines et analyse par immuno-empreinte	164
B. Immunohistologie et Immunocytologie	166
1. Immunohistologie	166
2. Immunocytologie	166
RESULTATS	168
I. Caractérisation du récepteur β_3-adrénergique dans l'artère mammaire interne humaine	169
A. Introduction	169
B. Article 1	171
C. Conclusions et perspectives	172
II. Le nébivolol : un agoniste β_3-adrénergique cardiovasculaire	174
A. Introduction	174
B. Article 2	176
C. Résumé AHA 2006	177
D. Résultats	179
1. Comparaison de l'effet du nébivolol et du BRL 37344 sur l'amplitude de contraction des biopsies endomyocardiques humaines.	179
2. Effet d'un antagoniste β_1 - et β_2 -AR, le nadolol, sur les propriétés inotropes négatives du BRL 37344 et du nébivolol.	180
3. Effet d'un antagoniste β_3 -AR sélectif, le L-748,3371, sur les propriétés inotropes négatives du BRL 37344 et du nébivolol.	181

4.	Implication de la voie du NO dans les effets inotropes négatifs du BRL 37344 et du nébivolol.	182
E.	Conclusions et perspectives	184
III.	Effets pro-angiogéniques du récepteur β_3-adrénergique	187
A.	Introduction	187
B.	Résumé AHA 2006	189
C.	Résultats	191
1.	Effet de la stimulation β_3 -adrénergique sur la réponse angiogénique	191
2.	Augmentation de l'expression du récepteur β_3 -AR dans des cellules endothéliales humaines (HUVEC ou HMVEC-D) suite à l'infection par adénovirus Ad β_3 AR	192
3.	Evaluation de la réponse angiogénique <i>in vitro</i> de cellules endothéliales humaines surexprimant le récepteur β_3 -AR	198
(a)	Culture d'HMVEC-D sur GFR-Matrigel®	198
(b)	Sphéroïdes d'HUVEC sur gel de collagène	199
4.	Voies de signalisations impliquées dans la réponse angiogénique induite par la surexpression du récepteur β_3 -AR humain	202
(a)	Rôle de la voie du NO dans la réponse angiogénique induite par la surexpression du récepteur β_3 -AR humain.	202
(b)	Implication de la voie Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Protein kinase B (PI3-Kinase/Akt-PKB) dans la réponse angiogénique induite par la surexpression du récepteur β_3 -AR humain	204
(c)	Participation de la voie Extracellular Receptor-activated Kinase 1/2 (ERK1/2)	207
5.	Importance physiopathologique du récepteur β_3 -AR dans les phénomènes d'ischémie <i>in vivo</i>	211
D.	Conclusions et perspectives	214
IV.	Modification de la réponse β-adrénergique vasculaire au cours du choc endotoxémique chez le rat	220
A.	Introduction	220
B.	Résultats	222

1. Etude hémodynamique	222
2. Etude pharmacologique	224
(a) Contraction vasculaire en réponse à la phényléphrine	224
(b) Réponses aux agents relaxants	225
▪ <i>Réponse à l'acétylcholine</i>	226
▪ <i>Réponse au nitroprussiate de sodium (SNP)</i>	227
(c) Réponse aux agonistes β -ARs	228
▪ <i>Réponse à l'isoprénaline</i>	228
▪ <i>Réponse à la dobutamine</i>	230
▪ <i>Réponse au salbutamol</i>	231
▪ <i>Réponse au SR 58611A</i>	232
C. Conclusions et perspectives	235
CONCLUSION GENERALE	242
REFERENCES	249
ANNEXES : Articles de revue et chapitre d'ouvrages	296

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1: Schéma du gène du récepteur β_3 -AR et structure des isoformes potentielles obtenues après épissage alternatif.*
- Figure 2 : Structure primaire du récepteur β_3 -AR.*
- Figure 3 : Structure chimique des agonistes et des antagonistes β_3 -ARs.*
- Figure 4 : Représentation schématique des voies de signalisations activées par les récepteurs β_1 et β_2 -ARs dans les cardiomyocytes.*
- Figure 5 : Effets de la stimulation des différents sous-types de récepteurs β -ARs sur la contractilité de biopsie endomyocardique humaine.*
- Figure 6 : Voies de signalisation du récepteur β_3 -AR dans les cardiomyocytes ventriculaires humains.*
- Figure 7 : Représentation schématique de la boucle de rétrocontrôle négatif de la stimulation β_1 -/ β_2 -AR par le récepteur β_3 -AR.*
- Figure 8 : Signalisation intracellulaire de la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires.*
- Figure 9 : Principales voies de signalisation du récepteur β_3 -AR au niveau vasculaire.*
- Figure 10 : Atténuation des réponses inotropiques à l'isoprénaline, un agoniste non sélectif des récepteurs β -adrénergiques, et au BRL 37344 , un agoniste préférentiel des récepteurs β_3 -adrénergiques dans l'insuffisance cardiaque.*
- Figure 11 : Formation du réseau vasculaire.*
- Figure 12 : La balance angiogénique.*
- Figure 13 : Structure et classification des métalloprotéinases.*
- Figure 14 : Structure des isoformes du VEGF-A.*
- Figure 15 : Sites de phosphorylation du VEGFR2 et principales voies de signalisation.*
- Figure 16 : Le concept de SIRS.*
- Figure 17 : Structure des parois des bactéries Gram négatives*
- Figure 18 : Structure de l'endotoxine (*Salmonella typhi murium*).*
- Figure 19 : La famille des toll-like receptors (TLR) chez les mammifères.*
- Figure 20 : Voies de signalisation intracellulaires induite par le LPS.*
- Figure 21 : Régulation du tonus musculaire lisse*
- Figure 22 : Effets du potentiel de membrane sur la régulation du tonus vasculaire.*

Figure 23 : Mécanisme de régulation par la NO synthase endothéliale de l'induction de la NO synthase inductible par le LPS.

Figure 24 : Voies de signalisation activées par le LPS dans les cellules endothéliales.

Figure 25 : Shunt fonctionnel observé au cours du choc septique dans une unité microcirculatoire.

Figure 26 : La microcirculation, pierre angulaire du sepsis.

Figure 27 : Structure de la paroi artérielle.

Figure 28 : Représentation schématique des deux principaux types de pontage.

Figure 29 : Anatomie de l'artère mammaire interne.

Figure 30 : Représentation schématique d'un ensemble de 4 cuves à organes isolés.

Figure 31 : Exemple de relaxation obtenue après application de 1 μ M d'acétylcholine sur un anneau artérielle d'artère mammaire interne précontracté par 1 μ M de phényléphrine.

Figure 32 : Représentation schématique de la cuve expérimentale.

Figure 33 : Structure d'un adénovirus.

Figure 34 : Principes de construction et d'amplification d'un vecteur adénoviral.

Figure 35 : Représentation schématique du système développé par Stratagene®.

Figure 36 : Aspect d'un sphéroïde d'HUVEC en cours de constitution

Figure 37 : Anneaux aortiques placés dans un gel de collagène.

Figure 38 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope négatif du BRL 37344 et du nébivolol sur des biopsies endomyocardiques humaines.

Figure 39 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope négatif du BRL 37344 et du nébivolol sur des biopsies endomyocardiques humaines en présence ou non de 10 μ M de nadolol

Figure 40 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope négatif du BRL 37344 et du nébivolol sur des biopsies endomyocardiques humaines en présence ou non de 1 μ M de L-748,337.

Figure 41 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope négatif du BRL 37344 et du nébivolol sur des biopsies endomyocardiques humaines en présence ou non de 100 μ M de L-NMMA.

Figure 42 : Exemples de réponse angiogénique observée au 12ème jour sur un anneau aortique contrôle et un anneau traité par le SR 58611A.

Figure 43 : Effets pro-angiogéniques du SR 58611A (1 nM), agoniste préférentiel du récepteur β_3 -AR.

Figure 44 : Immunoempreinte analysant le niveau d'expression du récepteur β_3 -AR humain dans des cellules HMVEC-D.

Figure 45 : Immunoempreinte analysant le niveau d'expression du récepteur β_3 -AR humain dans des cellules HMVEC-D infectées avec 500 MOI d'ad β_3 AR ou d'adGFP en fonction des délais.

Figure 46 : Immunocytomarquage de cellules endothéliales HMVEC-D infectées ou non par 500 MOI d'Ad β_3 AR ou d'AdGFP.

Figure 47 : Immunocytomarquage de cellules endothéliales HUVEC infectées ou non par 500 MOI d'ad β_3 AR ou d'adGFP.

Figure 48 : Diagramme représentant le nombre de cellules (Count) en fonction de l'intensité de la fluorescence (GFP) obtenue par FACS.

Figure 49 : Exemples de réseaux de structures capillaires constitués par des HMVEC-D sur GFR Matrigel® après 20 H.

Figure 50 : Longueur en μm du réseau de structures capillaires constitué par des HMVEC-D sur GFR Matrigel® après 20 H.

Figure 51 : Exemple de sphéroïdes dans des conditions de base (CTRL) et en présence de 30 ng/ml de bFGF, de 10 μM de DETA-NONOate.

Figure 52 : Effet de 30 ng/ml de bFGF (FGF) et de 10 μM de DETA-NONOate sur la longueur de structures capillaires générées par les sphéroïdes d'HUVEC.

Figure 53 : Exemple de sphéroïdes d'HUVEC infectées ou non par 500 MOI d'Ad β_3 -AR ou d'AdGFP.

Figure 54 : Effet de la surexpression du récepteur β_3 -AR sur la formation de structure tubulaire à partir de sphéroïdes d'HUVEC placés dans un gel de collagène.

Figure 55 : Effet du L-NAME (inhibiteur de NO synthase) sur l'effet pro-angiogénique de la surexpression du récepteur β_3 -AR humain dans des HUVEC.

Figure 56 : Exemple d'immuno-empreinte réalisée pour mettre en évidence la forme phosphorylée de la NO synthase endothéliale.

Figure 57 : Effet du Ly 294002 (inhibiteur de PI3-kinase) sur l'effet pro-angiogénique de la surexpression du récepteur β_3 -AR humain dans des HUVEC.

Figure 58 : Exemple d'immuno-empreinte mettant en évidence la forme phosphorylée de Akt-PKB.

Figure 59 : Immuno-empreinte mettant en évidence la relation entre le niveau d'expression du récepteur β_3 -AR humain dans des cellules HMVEC-D infectées par Ad β_3 AR à des MOI croissantes (100-500-2500 MOI) et l'intensité de la phosphorylation d'Ark-PKBt.

Figure 60 : Effet du PD 98059 (inhibiteur de ERK/MAPK) sur l'effet pro-angiogénique de la surexpression du récepteur β_3 -AR humain dans des HUVEC.

Figure 61 : Immuno-empreinte mettant en évidence les formes phosphorylées de ERK1/2 dans les HUVEC.

Figure 62 : Immuno-empreinte mettant en évidence les formes phosphorylées de ERK1/2 dans les HMVEC-D infectées (Ad β_3 AR à des MOI croissantes de 100-500-2500 MOI ou par 500 MOI AdGFP) ou non (CTRL).

Figure 63 : Evaluation du flux sanguin cutané par mesure de vélocimétrie laser doppler.

Figure 64: Courbe du ratio de perfusion en préopératoire (J0-préop), postopératoire (J0-postop) et aux 3ème (J3), 7ème (J7), 14ème (J14) et 21ème (J21) jours postopératoires, après ligature-résection de l'artère fémorale droite chez les souris β_3 -KO et FVB.

Figure 65 : Fréquence cardiaque (nombre de battements par minute b/min.) chez les rats (LPS) ayant reçu 5mg/kg IV d'endotoxine et les animaux contrôles (CTRL).

Figure 66 : pression artérielle moyenne (PAM) en mm de mercure (mmHg) chez les rats (LPS) ayant reçu 5mg/kg IV d'endotoxine et les animaux contrôles (CTRL).

Figure 67 : Courbes concentration-réponse à la phényléphrine (Phe) sur des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS.

Figure 68 : Courbes concentration-réponse à l'acétylcholine (AC) des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe.

Figure 69: Courbes concentration-réponse au nitroprussiate de sodium (SNP) des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe.

Figure 70 : Courbes concentration-réponse à l'isoprénaline (ISO) des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe.

Figure 71 : Courbes concentration-réponse à l'isoprénaline (ISO) des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe et prétraités avec 10 μ M de nadolol.

Figure 72 : Courbes concentration-réponse à la dobutamine des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe.

Figure 73 : Courbes concentration-réponse au salbutamol des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe.

Figure 74 : Courbes concentration-réponse au SR 58611A des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe.

Figure 75 : Courbes concentration-réponse au SR 58611A des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe en présence ou non de 7 μ M de L-748,337.

Figure 76 : Courbes concentration-réponse au SR 58611A des anneaux d'aorte thoracique désendothélialisés ou non de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe en présence ou non de 10 μ M de nadolol.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Polymorphisme W64R du récepteur β_3 -ARs et hypertension.

Tableau 2 : Polymorphisme W64R du récepteur β_3 -ARs et coronaropathie

Tableau 3 : Liste non exhaustive de quelques facteurs pro- et anti-angiogéniques.

Tableau 4 : Les principales fonctions des facteurs pro et anti-angiogéniques.

Tableau 5 : Exemples de pathologies associées à un excès d'angiogénèse.

Tableau 7 : Définition clinique du sepsis.

Tableau 8 : Agents vasoactifs synthétisés par les cellules endothéliales.

Tableau 9 : Les différents modèles de sepsis.

Tableau 10 : Composition du Tyrode-HEPES de transport vasculaire.

Tableau 11 : Composition et paramètres gazeux de la solution de Krebs.

Tableau 12 : Liste des substances pharmacologiques utilisées pour les études de vasomotricité.

Tableau 13 : Composition et pH de la solution de Tyrode-HEPES de transport des biopsies myocardiques.

Tableau 14 : Composition de la solution de Tyrode-bicarbonate.

Tableau 15 : Liste des substances pharmacologiques utilisées pour les études sur le myocarde.

Tableau 16 : Compositions des différents Matrigel®.

Tableau 17 : Liste des substances pharmacologiques utilisées lors de l'étude de l'angiogénèse.

Tableau 18 : Séquences et températures d'hybridation des oligonucléotides utilisés comme amorces au cours de nos études de RT-PCR.

Tableau 19 : Compositions des gels de protéines pour les protocoles d'immuno-empreinte sur les extraits protéiques d'AMI.

Tableau 20 : Compositions des gels de protéines de cellules endothéliales pour les protocoles d'immuno-empreinte sur les extraits protéiques de cellules endothéliales humaines.

Tableau 21 : Origine et titre des différents anticorps utilisés lors des expériences d'immuno-empreintes.

Tableau 22 : Détermination par FACS du taux de cellules HMVEC-D fluorescentes

Tableau 23 : relaxation spontanée au cours du temps (effets temps) exprimée en pourcentage de la contraction maximale sous phényléphrine.

LISTE DES ABREVIATIONS

β -AR :	β -adrénergique
α -AR :	α -adrénergique
α_1 -AR :	α_1 -adrénergique
β_1 -AR :	β_1 -adrénergique
α_2 -AR :	α_2 -adrénergique
β_2 -AR :	β_2 -adrénergique
β_3 -AR :	β_3 -adrénergique
β -ARK :	β -adrenergic receptor kinase : kinase des récepteurs β -adrénergiques
β_1 -KO :	Souris avec invalidation du gène codant pour le récepteur β_1 -AR
β_2 -KO :	Souris avec invalidation du gène codant pour le récepteur β_2 -AR
β_1/β_2 -KO :	Souris avec invalidation des gènes codant pour les récepteurs β_1 -et β_2 -AR
β_3 -KO :	Souris avec invalidation du gène codant pour le récepteur β_3 -AR
AC :	Adénylate cyclase
ACTH :	Adrenocorticotropin hormone
Ad β_3 -AR :	Adénovirus adénovirus bicistronique, codant pour l'isoforme C du récepteur β_3 -AR humain et la protéine GFP
AdGFP	Adénovirus codant pour la protéine GFP
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Akt/PKB :	protéine kinase B
AMPc :	Adénosine 3', 5'-nosine monophosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
ATP :	Adénosine triphosphate
bFGF :	Basic fibroblast growth factor
B _{Kca} :	Canaux potassiques dépendants du calcium de grande conductance
BRL 37344 :	4-[2-hydroxy-(3-chlorophényl)ethyl-amino]propyl phenoxyacétate
CAM :	Calmoduline

CD :	Cluster of différenciation : suivi d'un chiffre, nom donné à des molécules de surface des leucocytes, initialement caractérisées par des anticorps monoclonaux. Elles sont de nature très diverses
CFTR :	Cystic fibrosis transmembrane conductance régulator
CGP 12177 :	4-[3-t-butylamino-2hydroxypropoxyl]benzimidazol-2-1
CHO :	Chinese hamster ovary
CL 316 243 :	Disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl-amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate]
CML :	cellule musculaire lisse
COX-2 :	Cyclo-oxygénase de type 2
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
CSF :	Colony stimulating factor
DAG :	Diacylglycérol
DBH :	Dopamine- β -hydroxylase
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
E1 à e4 :	Domaines extracellulaires 1 à 4 du récepteur β_3 -AR
EDHF	Endothelial derived hyperpolarising factors : facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium
EDTA :	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGF :	Epidermal growth factor
EMT :	Extraneuronal monoamine transporter
ERK :	Extracellular signal-regulated kinase
FAK :	Focal adhesion kinase
GAP :	GTPase activating protein
GCs :	Guanylate cyclase soluble
GDP :	Guanosine diphosphate
GMCSF :	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GMPc :	Guanosine 3', 5'-nosine monophosphate cyclique
GRK :	G protein-coupled receptor kinase : kinase des récepteurs couplés aux protéines G
GTP :	Guanosine triphosphate
HB-EGF :	Heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor
HGF :	Hepatocyte growth factor

HIF-1 :	Hypoxia inducible factor-1
HMGB1 :	High mobility group box 1
HSP27 :	Heat shock protein 27
i1 à i4 :	Domaines intracellulaires 1 à 4 du récepteur β_3 -AR
ICAM-1 :	Intercellular adhesion molecule-1
IGF :	Insulin like growth factor
IKK :	I kappa B kinase
IL-1 :	Interleukine-1
IL-1 β :	Interleukin-1 β
IL-4 :	Interlukine-4
IL-6 :	Interleukine-6
IL-8 :	Interleukine-8
IL-10 :	Interleukine-10
IL-12 :	Interleukine-12
IL-13 :	Interleukine 13
IL-18 :	Interleukine-18
IL-1R1 :	récepteur de type 1 de l'IL-1
INF :	Interféron
IP ₃ :	Inositol triphosphate
IRAK :	IL-1R1-associated kinase
IRF :	Interferon regulatory factor
ISRE :	Interferon stimulated responsive element
K _{ATP} :	Canaux potassiques ATP-dépendant
kb :	Kilobase
K _V :	Canaux potassiques voltage-dépendant
KvLQT1/minK :	Voltage(v)-gated potassium (K) channel long (L) QT subtype 1/ minimal potassium channel : canal potassique voltage dépendant du syndrome du QT long de type 1/régulateur membranaire de KvLQT1
L-748,337 :	((S)-N-N-[4-[2-[3-[3-(acetamido methyl)phenoxy]-2 hydroxypropyl]amino]ethyl phenyl]benzensulfonamide)
LBP :	LPS binding protein
L-NAME :	N ^g -nitro-L-arginine méthyl ester
L-NMMA :	N ^g -monométhyl-L-arginine monoacétate

LPS :	lipopolysaccharide
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
MEK :	MAPK and ERK kinase : kinase de MAPK et de ERK
MLC :	Myosin light chain
MLCK :	Myosine light chain kinase
MLCP :	Myosin light chain phosphatase
MMP :	Matrix metalloproteinase
MOF :	Multiple organ failure
MyD88 :	Myeloid differentiation protein 88
NADPH-oxydase :	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxydase
NF-κB :	Nuclear factor κB
NGF :	Nerve Growth Factor : facteur de croissance nerveuse
NHE-RF :	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulator factor (facteur régulateur de l'échangeur sodium/proton)
NO :	Monoxyde d'azote
O ⁻ :	Anion superoxyde
ONO O ⁻ :	peroxynitrite
PAF :	Platelet activating factor
PAMP :	Pathogen-associated molecular pattern
PARP :	poly(adenosine 5'-diphosphate [ADP]-ribose) polymerase
PBS :	Tampon phosphate salin
PDE :	Phosphodiesterase
PDGF :	Platelet derived growth factor
PECAM-1 :	platelet-endothelium cell adhesion molecule-1
PEGF :	Pigment epithelial derived factor
PGE ₂ :	Prostaglandine de type E ₂
PGF _{2α} :	Prostaglandine de type F _{2α}
PGI ₂ :	Prostaglandine de type I ₂ ou prostacycline
PI3K :	phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2 :	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA :	protéine kinase AMPc-dépendante
PKC :	Protéine kinase dépendante du calcium et des phospholipides
PKG :	Protéine kinase dépendante du GMPc
PLA ₂ :	Phospholipase A ₂

PLCb :	Phospholipase C de type b
PLC γ :	Phospholipase C de type γ
PIGF :	Placenta growth factor
RTK :	Récepteur tyrosine kinase
RT-PCR :	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction : transcription réverse suivie d'une PCR
SDMV :	Syndrome de défaillance multiviscérale
SIRS :	Systemic inflammatory response syndrome
S _{Kca}	Canaux potassiques dépendants du calcium de petite conductance
SNA :	Système nerveux autonome
SR 58611A :	(RS)-N-[(25)-7-éthoxycarbonylméthoxy-1,2,3,4-tétrahydronapht-2-yl]-(2R)-2-(3-chlorophényl)-2-hydroéthannamine
SR 59230A :	3-(2-ethylphénoxy)-1-[(1S)1,2,3,4-tétrahydronapht-1-ylaminol]-2(S)-2-propanolol oxalate
TGF- β :	Transforming growth factor- β
TIMP :	Tissue inhibitor métalloproteinase
TIR :	Toll/IL-1R : domaine cytoplasmique des TLR semblable à la portion cytoplasmique de IL-1R1
TLR :	Toll-like receptor
TM1 à 7 :	Domaine transmembranaire 1 à 7 du récepteur β_3 -AR
TNF- α :	Tumor necrosis factor- α
TRAF6 :	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
TSAd :	T-cell-specific adaptator
TSH :	Thyroid stimulating hormone
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂
VCAM-1:	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF :	Vascular endothelial growth factor
VEGFR1 :	VEGF receptor 1 : récepteur de type 1 du VEGF
VEGFR2 :	VEGF receptor 2 : récepteur de type 2 du VEGF
VIP :	Vasoactive intestinal peptide
VPF :	Vascular permeability factor

VRAP : VEGF receptor associated protein
 α -MSH : α -Melanocyte stimulating hormone

AVANT-PROPOS

Le maintien de l'homéostasie s'effectue notamment grâce et sous le contrôle du système nerveux autonome (SNA). A l'origine des processus de régulation réflexe, son intégrité conditionne les facultés d'adaptation de l'organisme face aux différents stress. Au niveau cardiovasculaire, le rôle du SNA est large et repose d'une part sur la modulation du tonus vasomoteur sous la dépendance sympathique et d'autre part sur l'optimisation de la fonction cardiaque qui dépend à la fois du contrôle vagal et du contrôle sympathique.

Un des principes de l'anesthésie-réanimation est de maintenir l'homéostasie malgré les agressions importantes que peut subir l'organisme telles qu'une intervention chirurgicale, un traumatisme ou une infection par exemple. Son objectif est donc de moduler la réponse du SNA au cours de la prise en charge de différentes agressions. En effet, la réponse à ces agressions se caractérise par une libération massive d'hormones neuroendocrines, responsables de perturbations hémodynamiques, énergétiques et métaboliques pouvant s'avérer délétères avec le risque de majorer la morbidité notamment en cas de pathologies préexistantes. La libération de catécholamines endogènes simultanément à l'agression initiale, joue un véritable rôle de starter dans ces réactions. Une bonne connaissance de la pharmacologie du SNA est nécessaire pour produire des interactions utiles entre les médicaments de l'anesthésie et le SNA, et éviter des interactions ou des effets propres néfastes. De nombreuses pathologies cardiovasculaires se caractérisent par des altérations du SNA : hypertension artérielle systémique, insuffisance cardiaque, diabète par exemple. De plus, ces patients bénéficient le plus souvent de traitements dont la cible est le SNA et en particulier le système sympathique. Ces éléments sont à prendre en compte par un anesthésiste-réanimateur lors de la prise en charge de tels patients.

Dans ce contexte, la mise en évidence en 1989 chez l'homme, d'un troisième sous-type de récepteur β -adrénergique (β -AR) au niveau du système sympathique, constitue un sujet de recherche majeur pouvant avoir des implications fondamentales dans l'exercice de l'anesthésie-réanimation. Cet intérêt est d'autant plus important que les actions de ce récepteur s'exercent notamment sur le système cardiovasculaire et que certains agonistes et antagonistes β -ARs, d'ores et déjà disponibles en clinique, ont potentiellement des propriétés agonistes β_3 -ARs.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai été impliqué dans différents projets de recherches complémentaires, dont un certain nombre sont publiés ou en cours de finalisation avant publication (*cf.* résultats) mais j'ai également pu participer à la rédaction de revues et de

chapitres d'ouvrage portant sur le récepteur β_3 -adrénergique (β_3 -AR) au sein du système cardiovasculaire (cf. Annexes du document)

Par différentes approches expérimentales, j'ai cherché à déterminer les rôles physiologiques et physiopathologiques du récepteur β_3 -AR. Les différents modèles s'inspirent de situations cliniques où le récepteur β_3 -AR peut être impliqué. De plus, je me suis attaché à évaluer les propriétés β_3 -ARs d'un β -bloquant, le nébivolol, qui est indiqué notamment dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque et l'hypertension chez l'homme et dont tous les effets ne sont pas parfaitement caractérisés.

J'ai effectué ce travail de recherche dans deux laboratoires qui collaborent depuis de nombreuses années : d'une part de novembre 2001 à mars 2005 dans le groupe de Chantal Gauthier de l'unité INSERM U533 de Nantes dirigée par le Pr Denis Escande et d'autre part de mars 2005 à août 2006, dans le cadre d'une mobilité, dans l'unité de pharmacothérapie du Pr Jean-Luc Balligand à l'Université Catholique de Louvain à Bruxelles.

INTRODUCTION

Au niveau du système sympathique, les récepteurs adrénergiques sont les cibles des catécholamines endogènes : l'adrénaline circulante qui est libérée principalement par la médullosurrénale et agit comme neuromodulateur, et la noradrénaline qui est libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques et joue le rôle de neurotransmetteur. Les catécholamines ont des actions physiologiques diverses et régulent notamment les fonctions cardiovasculaires, respiratoires et métaboliques. C'est Alquist en 1948, qui a proposé pour la première fois l'existence de récepteurs α -adrénergiques (α -AR) et β -ARs, pour expliquer les effets opposés « excitateurs » ou « inhibiteurs » de la noradrénaline et de ses analogues sur différents tissus musculaires lisses (Alquist, 1948).

Plus tard, les récepteurs β -ARs ont été subdivisés en récepteurs β_1 et β_2 -ARs à partir de l'activité relative d'une série d'agonistes β -ARs dans plusieurs tissus (Lands et coll., 1967a). L'ordre de puissance des catécholamines est :

Isoprénaline* > Noradrénaline \geq Adrénaline, pour le récepteur β_1 -AR,

Isoprénaline* > Adrénaline > Noradrénaline, pour le récepteur β_2 -AR.

(*catécholamine de synthèse)

Cette classification a été confirmée d'une part, par le développement d'agonistes et d'antagonistes spécifiques et d'autre part, par le clonage des deux gènes codant pour ces récepteurs (Dixon et coll., 1986; Frielle et coll., 1987).

Au niveau cardiaque, les récepteurs β_1 -ARs sont couplés aux protéines G_s et par le biais de cette protéine ils activent l'adénylate cyclase catalysant la formation de l'adénosine 3', 5' monophosphate cyclique (AMPC). Il en résulte une activation de la protéine kinase AMPC-dépendante (PKA), conduisant à la phosphorylation des protéines régulatrices de la fonction cardiaque. Il en résulte des effets inotrope et lusitrope positifs (Steinberg, 1999). En revanche, le récepteur β_2 -AR cardiaque est couplé à de nombreuses voies de signalisation. Les récepteurs β_2 -ARs cardiaques sont comme les récepteurs β_1 -ARs couplés aux protéines G_s mais également aux protéines G_i . L'importance relative ainsi que les possibles substitutions de ces différents couplages, en particulier dans des circonstances pathologiques restent à préciser (Steinberg, 1999).

L'activation de récepteurs β_1 et β_2 -ARs vasculaires est responsable d'un effet vasodilatateur. Les récepteurs β_2 -ARs sont prédominants dans la plupart des lits vasculaires, néanmoins les récepteurs β_1 -ARs sont majoritaires au niveau coronaire et cérébral (Guimaraes et Moura,

2001). La vasodilatation induite par les agonistes β_2 -ARs dépend de récepteurs présents sur les cellules musculaires lisses vasculaires et de l'activation de l'adénylate cyclase par le biais d'une protéine G_s mais également de récepteurs endothéliaux qui activent la voie de la monoxyde d'azote (NO) synthase (Ferro et coll., 2004).

Cependant, tous les effets des catécholamines dans différents tissus ne pouvaient s'expliquer par la classification en récepteurs β_1 et β_2 -ARs. Dès 1984, des études réalisées avec une nouvelle classe de substances ayant une action thermogène suggèrent la présence de récepteurs β -AR atypiques (Arch et coll., 1984). Depuis, un gène codant pour un troisième sous-type de récepteur β -AR a été cloné chez l'homme Emorine et coll., 1989), puis dans de nombreuses espèces animales (pour revue Rozec et Gauthier, 2006). Plus récemment, il a été suggéré l'existence d'un état de faible affinité du récepteur β_1 -AR. Sa stimulation conduit à l'activation de la voie adénylate cyclase-AMPC

Etant donné le rôle prépondérant des catécholamines dans le contrôle du système cardiovasculaire, il est donc paru important d'évaluer l'implication du récepteur β_3 -AR dans les effets β -ARs non β_1 et β_2 -ARs.

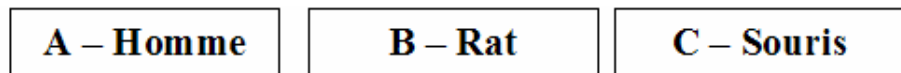
I. Le récepteur β_3 -adrénergique dans le système cardiovasculaire

A. Structure et caractéristiques du récepteur β_3 -adrénergique

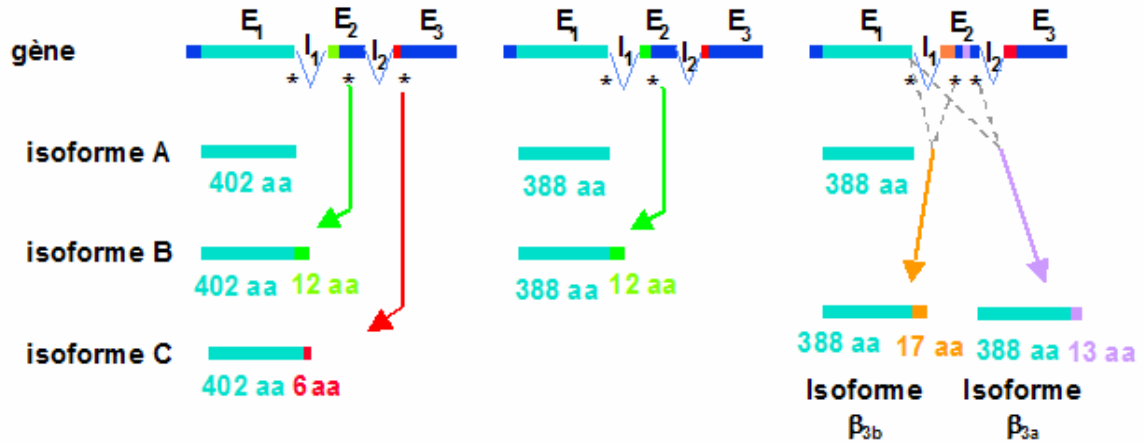
1. Structure du gène

Le gène codant pour le récepteur β_3 -AR humain a été cloné en 1989 (Emorine et coll., 1989). Depuis lors, le gène de ce récepteur a été cloné chez de nombreuses autres espèces : rat, souris, bovins, singes, chien, brebis, chèvre (Strosberg, 1997; Forrest et Hickford, 2000). Dans les différentes espèces, la comparaison des séquences nucléotidiques du gène et de l'ADNc correspondant a mis en évidence des différences de longueur et de séquence dans la région C-terminale du récepteur. A la différence des gènes codant pour les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs, le gène codant pour le récepteur β_3 -AR comporte des introns. La présence d'introns permet, par épissage alternatif, la synthèse de plusieurs isoformes de la protéine qui ont potentiellement des caractéristiques pharmacologiques distinctes (Figure 1).

Chez l'homme, le gène du récepteur β_3 -AR est situé sur le chromosome 8. Le nombre d'exons et d'introns est sujet à controverse. La première structure proposée comporte 2 exons et 1 intron. Le premier exon de 1,7 kb a une grande homologie avec celui des rongeurs. Il code pour les 402 premiers acides aminés du récepteur. Le second exon code pour les 6 derniers acides aminés de la partie C-terminale et de la région 3' non traduite de l'ARN messenger (Granneman et coll., 1992; Granneman et coll., 1993; Van Spronsen et coll., 1993). Cette structure à 2 exons/1 intron a été également décrite chez le singe et le chien (Walston et coll., 1997; Lenzen et coll., 1998). Dans ce cas, 2 isoformes avec des parties C-terminales différentes peuvent exister : une isoforme de 402 acides aminés (isoforme A) et une isoforme allongée de 6 acides aminés (isoforme C). Une autre structure avec 3 exons et 2 introns a également été proposée pour le gène humain (Levasseur et coll., 1995). Cependant, le site d'épissage alternatif du second exon ne semble pas fonctionnel (Granneman et coll., 1992) et renforce l'hypothèse d'une structure à 2 exons.



3 exons / 2 introns



2 exons / 1 intron

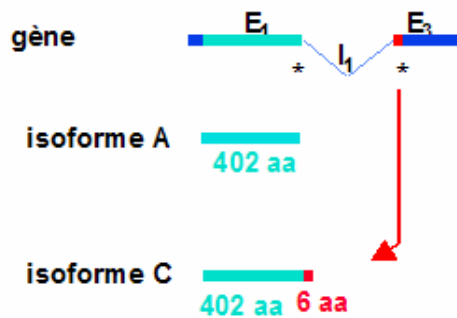


Figure 1 : Schéma du gène du récepteur β_3 -AR et structure des isoformes potentielles obtenues après épissage alternatif chez l'homme (A), le rat (B) et la souris (C).

E : exon ; I : intron ; * : codon stop ; aa : acide aminé.

Chez les rats et les souris, le gène codant pour le récepteur β_3 -AR contient 3 exons et 2 introns. Le premier exon de 1,4 kb code pour les 388 premiers acides aminés. Chez le rat, le second exon de 0,7 kb code pour les 12 derniers acides aminés de la partie C-terminale. Dans cette espèce, 2 isoformes du récepteur β_3 -AR peuvent être retrouvées : une isoforme A et une isoforme B de 388 et 400 acides aminés respectivement (Van Spronsen et coll., 1993). Chez la souris, 2 sites dans l'exon 2 permettent un épissage alternatif et donc la production de 2 isoformes β_{3a} et β_{3b} (Evans et coll., 1999). Le récepteur β_{3b} -AR possède une partie C-terminale de 17 acides aminés suivant la séquence codée par le premier exon, alors que le récepteur β_{3a} -AR ne présente que 13 acides aminés dans cette même région. Le niveau

d'expression de ces isoformes varie suivant le type de tissu considéré, les taux d'ARN messager de l'isoforme β_{3a} -AR étant plus élevés dans l'hypothalamus, le cortex, le tissu adipeux blanc et brun, le muscle lisse de la partie basse de l'iléon (Evans et coll., 1999).

2. Structure de la protéine

Le récepteur β_3 -AR appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont caractérisés par leur structure à sept domaines hydrophobes transmembranaires d'environ 22 à 28 acides aminés chacun (TM 1 à 7), reliés entre-eux par des boucles hydrophiles successivement intra (i1 à i3) et extracellulaires (e2 à e4) (Figure 2). L'extrémité N-terminale (e1) est extracellulaire et possède 2 sites de N-glycosylation. L'extrémité C-terminale (i4) est cytoplasmique et présente un site de palmitoylation assurant son ancrage à la membrane. Les domaines transmembranaires TM3, TM4, TM5 et TM6 sont essentiels pour la liaison aux ligands (Strosberg et Pietri-Rouxel, 1996). Les récepteurs β -ARs contiennent des cystéines qui permettent la formation de ponts di-sulfures impliqués dans la stabilité de la structure tridimensionnelle des protéines. Le pont disulfure entre la cystéine 110 et la cystéine 189, dans la 3^{ème} boucle extracellulaire est essentielle pour la liaison aux ligands et l'activité du récepteur (Moffet et coll., 1993). Il existe une homologie de séquence des acides aminés entre les récepteurs β_1 -, β_2 - et β_3 -ARs d'environ 40 à 50% chez l'homme et le rat. Cette homologie est essentiellement retrouvée dans les 7 domaines transmembranaires et dans la plupart des régions proches de la membrane plasmique des boucles intracellulaires. Les récepteurs β_3 -ARs de l'homme et du rat présentent une homologie d'environ 79%, les plus grandes différences étant retrouvées dans la partie C-terminale et la 3^{ème} boucle intracellulaire (Figure 2). Par une approche de gène-candidat, une mutation ponctuelle du gène β_3 -AR correspondant à la substitution du tryptophane par une arginine en position 64 (mutation W64R) a été découverte chez 30% des Indiens Pimas (Walston et coll., 1995). Cette mutation naturelle est en fait un polymorphisme. Elle est également observée chez 8 à 10% des Européens et Américains du Nord et 25% des Afro-américains.

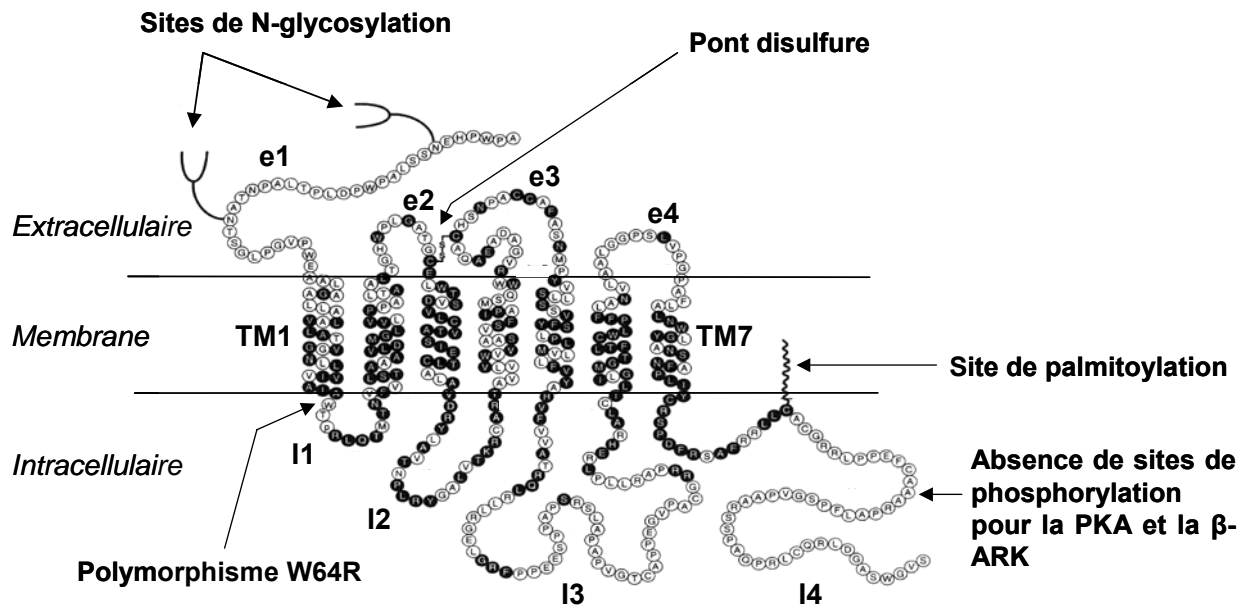


Figure 2 : Structure primaire du récepteur β_3 -AR. Les résidus mentionnés par les cercles noirs sont communs aux trois sous-types de récepteurs β -ARs. e : régions extracellulaires ; I : régions intracellulaires, TM : domaines transmembranaires.

La régulation du récepteur β_3 -AR diffère de celle des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs. Classiquement, la désensibilisation des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs, après une stimulation prolongée, est secondaire à la phosphorylation, le découplage et l'internalisation des récepteurs dont le site de liaison est occupé par un agoniste (Summers et coll., 1997). Les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs possèdent des résidus sérines et thréonines dans leur portion C-terminale, qui se comportent comme des substrats pour les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK), et comme séquence consensus de phosphorylation par la PKA. Le récepteur β_3 -AR est dépourvu de site de phosphorylation pour la PKA et présente moins de résidus sérine et thréonine au niveau de sa partie C-terminale. Il a été démontré que le récepteur β_3 -AR est résistant aux phénomènes de désensibilisation induits par les agonistes (Nantel et coll., 1994). Des études réalisées sur des récepteurs β_2/β_3 -ARs chimériques ont montré que la partie C-terminale et les 2^{ème} et 3^{ème} boucles intracellulaires du récepteur β_2 -AR sont des éléments essentiels pour le phénomène de désensibilisation (Liggett et coll., 1993; Jockers et coll., 1996). Ainsi, au niveau du myomètre humain, l'exposition prolongée au salbutamol entraîne une diminution du nombre de récepteurs β_2 -ARs. Au contraire, une stimulation prolongée avec un agoniste β_3 -AR ne modifie pas la réponse fonctionnelle, ni le nombre de sites de liaison aux agonistes β_3 -ARs (Rouget et coll., 2004). Ces données

suggèrent donc, qu'après une activation prolongée du système nerveux sympathique, la réponse β_3 -AR pourrait être préservée alors que les réponses β_1 - et β_2 -ARs seraient diminuées.

Chez la souris, il a été montré que le récepteur β_{3b} -AR diffère du récepteur β_{3a} -AR par la présence au niveau de sa portion C-terminale de 2 sérines supplémentaires. Ceux-ci pourraient constituer des sites potentiels de phosphorylation impliqués dans les phénomènes de désensibilisation (Evans et coll., 1999). Ainsi, il serait intéressant de déterminer les sites potentiels de phosphorylation mais aussi les mécanismes de désensibilisation associés du récepteur β_{3b} -AR. Les phénomènes de désensibilisation ont été essentiellement étudiés dans des cellules transfectées (Chinese Hamster Ovary, CHO), les adipocytes, et le tube digestif, aucune donnée n'est actuellement disponible concernant le système cardiovasculaire.

La quantification des récepteurs β_3 -ARs en comparaison aux autres sous-types de récepteurs β -ARs est difficile. En effet, les études de liaisons de radioligands aux récepteurs β -ARs utilisent des composés tel que le [125 I] iodocyanopindolol et le [3 H] 4-[3-*t*-butylamino-2hydroxypropoxy]benzimidazol-2-one (CGP 12177A). Or ces composés ont une faible affinité pour les récepteurs β_3 -ARs et se lient aux récepteurs β_1 - et β_2 -ARs ainsi qu'aux récepteurs β_1 -ARs de faible affinité. Un énantiomère tritié du BRL 37344 ([3 H]SB 206606), un agoniste β_3 -AR, semble permettre une reconnaissance spécifique d'une seule population de récepteurs dans la graisse brune de rat, cependant son utilisation n'a pas été rapportée dans les tissus où le niveau d'expression est plus faible (Klaus et coll., 1995).

B. Pharmacologie des récepteurs β_3 -adrénergiques

Les récepteurs β_3 -ARs sont caractérisés par plusieurs critères pharmacologiques :

- Une faible affinité pour les agonistes β -ARs de référence (comme l'adrénaline et la noradrénaline) (Emorine et coll. 1994) ;
- Une forte affinité et une puissance élevée pour des agonistes de synthèse comme le BRL 37344, le CL 316 243 et le SR 58611A (Arch et Kauman, 1993; Emorine et coll., 1994; Strosberg et Pietri-Rouxel 1996) ;
- Une activité agoniste partielle de plusieurs antagonistes β_1 - et/ou β_2 -ARs, comme le CGP 12177A (Liggett, 1992; Blin et coll., 1993; Kaumann et Molenaar, 1996), le bucindolol et le pindolol (Blin et coll., 1993) ;
- Une faible affinité pour les antagonistes β -ARs conventionnels comme le propranolol et le nadolol.

Pendant longtemps, le récepteur β_3 -AR était également caractérisé par des indices de stéréospécificité faible pour les énantiomères des agonistes et des antagonistes de référence

comparativement aux récepteurs β_1 - et β_2 -ARs (Arch et Kaumann, 1993; De Ponti et coll., 1996). Cependant, des expériences réalisées avec des antagonistes β_3 -ARs ont montré des effets différents entre les énantiomères *S,S* (SR 59230A) et *R,R* (SR 59483A) (De Ponti et coll., 1996; Manara et coll., 1996). Plus récemment, il a été montré que le degré de stéréospécificité varie entre les espèces : le récepteur β_3 -AR humain présente des degrés d'affinité et des rapports énantiomériques plus élevés que le récepteur β_3 -AR de souris ou de rat. Le niveau de stéréospécificité est relativement faible pour des agonistes tels que l'isoprenaline et la noradrénaline, mais plus élevé pour des antagonistes et en particulier le tertatolol et le propranolol (Popp et coll., 2004).

Récemment, il a été suggéré sur la base d'expériences pharmacologiques menées sur des cellules de type CHO (Chinese Hamster Ovary), qu'à l'instar du récepteur β_1 -AR, le récepteur β_3 -AR humain pourrait se présenter sous 2 conformations différentes avec une forme de haute et une forme de basse affinité pour les agonistes β_3 -ARs (Baker, 2005). En effet, les réponses fonctionnelles induites par certains ligands, comme le cimaterol et le fenoterol, sont inhibées dans ce modèle facilement par des antagonistes alors que d'autres ligands (comme l'alprenolol et le SR 59230) sont plus résistants. De plus, l'alprenolol inhibe l'effet agoniste β_3 -AR du fenoterol, mais à plus haute concentration il a un effet agoniste β_3 -AR. Un agoniste β_3 -AR, le ZD 7114 ((S)-4-[2-Hydroxy-3-phenoxypropylaminoethoxy]-N-(2-methoxyethyl)phenoxyacetamide), présente une réponse fonctionnelle à 2 composantes, dont la première est plus facilement inhibée que la seconde. L'ensemble de ces résultats suggèrent à l'auteur que le récepteur β_3 -AR possède 2 états de conformation, l'un avec une faible et l'autre avec une forte affinité pour les agonistes β_3 -ARs. Ces agonistes étant eux-même capables de modifier la conformation du récepteur β_3 -AR.

1. Les agonistes β_3 -ARs

Le récepteur β_3 -AR est activé par les catécholamines (Figure 3) mais à des concentrations beaucoup plus élevées que pour les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs avec une constante d'inhibition (K_i) de l'ordre de 1 μ M (Strosberg 1997) suggérant que le récepteur β_3 -AR pourrait être activé dans des situations où le tonus sympathique est élevé. L'ordre d'affinité et l'ordre de puissance des catécholamines pour le récepteur β_3 -AR sont similaires :



Les récepteurs β_3 -ARs sont activés avec une affinité et une puissance élevées par des agonistes sélectifs appartenant à deux classes. La première est celle des phényléthanolamines (Figure 3), comprenant le BRL 37344 (Arch et coll., 1984), le SR 58611A (Bianchetti et

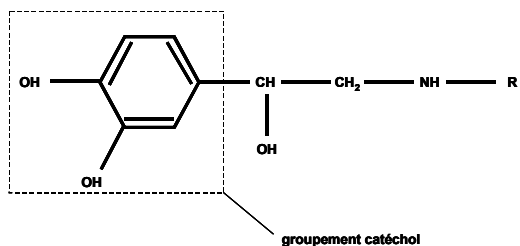
Manara, 1990) et le CL 316 243 (Dolan et coll., 1994). Cependant, certains de ces composés tels que le BRL 37344 et le SR 58611A possèdent également une faible affinité pour les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs (Dolan et coll., 1994). La seconde classe est celle des aryloxypropranolamines (Figure 3), tel que le CGP 12177A (Pietri-Rouxel et Strosberg, 1995; Lenzen et coll., 1998) et le cyanopindolol. Le CGP 12177A est un antagoniste β_1 - et β_2 -AR et un agoniste β_3 -AR partiel. L'efficacité et la puissance du CGP 12177A comme agoniste β_3 -AR varie de façon importante avec le niveau d'expression du récepteur β_3 -AR (Wilson et coll., 1996) comme précédemment décrit pour des agonistes d'autres récepteurs couplés aux protéines G, Il est important de noter que les récepteurs β_{3a} et β_{3b} de souris exprimés dans des cellules CHO présentent des degrés d'affinité et de puissance équivalents pour tous les ligands β -AR testés (Hutchinson et coll., 2002).

Les études réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent la complexité de la pharmacologie du récepteur β_3 -AR suggérant des profils pharmacologiques hétérogènes dans une espèce donnée notamment et une variabilité inter-espèces. Par exemple, les agonistes présentent des différences d'efficacité et de puissance entre l'homme et les rongeurs. De plus, l'affinité et la puissance varient en fonction du type d'expérience réalisée. Certains agonistes ont été évalués par la mesure de la production d'AMPc dans des cellules entières transfectées avec le récepteur β_3 -AR humain, alors que d'autres ont été testés sur des préparations membranaires pour mesurer la production d'AMPc par l'adénylate cyclase (Sennit et coll., 1998). Non seulement les agonistes sont plus puissants sur des cellules entières mais la puissance relative diffère entre les 2 types d'expériences, les phényléthanolamines étant plus puissantes que les aryloxypropranolamines sur cellules entières que sur préparations membranaires. De plus, dans des mesures de liaisons utilisant le [125 I] iodocyanopindolol comme radioligand, les résultats de puissance relative d'une série d'agonistes sont complètement à l'opposé des valeurs obtenues avec la mesure de la production d'AMPc (Arch, 2002).

2. Les antagonistes β_3 -ARs

Les récepteurs β_3 -ARs sont inhibés par des antagonistes β -ARs non sélectifs tels que le bupranolol (Langin et coll., 1991, Galitzky et coll., 1993) (Figure 3). Comme pour les agonistes β_3 -ARs, la puissance des antagonistes β_3 -ARs peut varier. Les récepteurs β_3 -ARs sont également inhibés par un antagoniste sélectif, le SR 59230A. Cependant, alors que ce composé est un antagoniste sélectif des récepteurs β_3 -ARs de rongeurs (Kaumann et Molenaar, 1996; Manara et coll., 1996; Kubo et coll., 1997), sa sélectivité chez l'humain est bien moins certaine (Arch, 2002). De plus, il a été montré récemment chez le rat que le SR 59230A est un antagoniste compétitif du récepteur α_1 -AR (Leblais et coll., 2004). Deux antagonistes sélectifs du récepteur β_3 -AR humain, le L-748,328 et le L-748,337, ont été synthétisés (Candelore et coll., 1999). Le L-748,328 est un antagoniste sélectif du récepteur β_3 -AR humain et de singe rhésus qui possède une spécificité 90 fois supérieure pour le récepteur β_3 -AR par rapport au récepteur β_1 -AR et 20 fois supérieure à celle du récepteur β_2 -AR. Le L-748,337 a une sélectivité 90 fois supérieure pour le récepteur β_3 -AR humain par rapport au récepteur β_1 -AR et 45 fois supérieure à celle du récepteur β_2 -AR (Candelore et coll., 1999). Le L-748,337 présente une affinité 100 fois plus faible pour le récepteur β_3 -AR de rat ($K_i = 3.4 \pm 1.0$ nM) que pour le récepteur humain ($K_i = 315 \pm 52$ nM), dans des systèmes de ré-expression hétérologue (Candelore et coll., 1999).

Catécholamines



Agonistes β -ARs non sélectifs ($\beta_1 / \beta_2 / \beta_3$) :

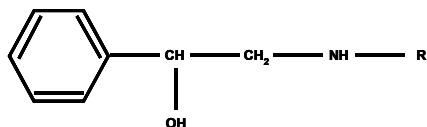
noradrénaline, adrénaline, isoprénaline

R : H : noradrénaline

CH₃ : adrénaline

CH(CH₃)₂ : isoprénaline

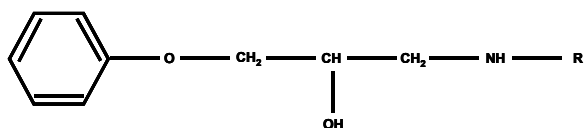
Phényléthanolamines



Agonistes β_3 -ARs préférentiels :

BRL 37344, SR 58611A, CL 316 243

Aryloxypropranolamines



Agonistes β_3 -ARs préférentiels :

L-755,507, ICI 201,651

Agonistes β_3 -ARs partiels :

CGP 12177A, pindolol

Antagonistes β_3 -ARs non sélectifs ($\beta_1 / \beta_2 / \beta_3$) :

bupranolol

Antagonistes β_3 -ARs sélectifs :

L-748,328, L-748,337, SR 59230A

Figure 3 : Structure chimique des agonistes et des antagonistes β_3 -ARs. Représentation des 3 grandes classes chimiques : les catécholamines, les phényléthanolamines et les aryloxypropranolamines.

C. Les récepteurs β_3 -adrénergiques cardiaques

Le système β -AR constitue un des éléments essentiels pour améliorer la performance cardiaque lors d'un stress aigu ou chronique. Jusqu'à cette dernière décennie, il était admis que seuls les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs étaient présents au niveau cardiaque dans un rapport de densité de 80/20 respectivement (Bristow et coll., 1986). Les effets des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs cardiaques sont relativement bien établis chez l'homme et la plupart des mammifères. Leur stimulation est responsable d'un effet chronotrope et inotrope positif. Concernant le récepteur β_1 -AR, on considère classiquement que sa stimulation engendre l'activation de la voie de signalisation G_s -adénylate cyclase-AMPC-PKA. Des études récentes utilisant des récepteurs β -ARs recombinant ou des souris génétiquement déficientes pour les différents récepteurs β -ARs, ont permis d'établir l'existence d'une nouvelle conformation du récepteur β_1 -AR, décrit comme étant une conformation de faible affinité (Granneman, 2001). La stimulation du récepteur β_1 -AR dans cette conformation induit également un effet inotrope positif par activation de la voie de l'AMPC (Sarsero et coll., 2003) (Figure 4).

Les voies de signalisation couplées aux récepteurs β_2 -ARs ne sont pas toutes parfaitement connues. A l'instar du récepteur β_1 -AR, le récepteur β_2 -AR est couplé aux protéines G_s . Dans le cœur humain, il a été rapporté que le récepteur β_2 -AR induit ses effets maximaux ou sub-maximaux (inotrope positif et lusitrope) par son couplage à la voie de signalisation protéine G_s -AMPC-PKA (Kaumann et coll., 1999). Outre les protéines G_s , le récepteur β_2 -AR cardiaque est couplé aux protéines G_i sensibles à la toxine pertussique (Xiao et coll., 1999). C'est par le biais de ces protéines G_i , que le récepteur β_2 -AR active la voie de signalisation phospholipase A_2 cytosolique/acide arachidonique (Pavoine et coll., 1999; Pavoine et Defer, 2005). L'implication de la voie de signalisation récepteurs β_2 -ARs- G_i serait plus importante chez les rongeurs que chez l'homme. Cependant, dans des conditions pathologiques, il a été suggéré qu'au cours de l'insuffisance cardiaque chez l'homme, cette voie de signalisation pourrait se substituer à la voie protéine G_s -adénylate cyclase en cas de déficience de cette dernière (Pavoine et coll., 2003). Enfin, il a été décrit une association directe induite par un agoniste du récepteur β_2 -AR avec l'échangeur Na^+/H^+ de type 3 (Hall et coll., 1998). Cette interaction pourrait avoir un rôle majeur pour une transduction spécifique et rapide du signal depuis le récepteur jusqu'à cet effecteur. Néanmoins, le rôle physiologique d'un tel mécanisme reste à être précisé (figure 4).

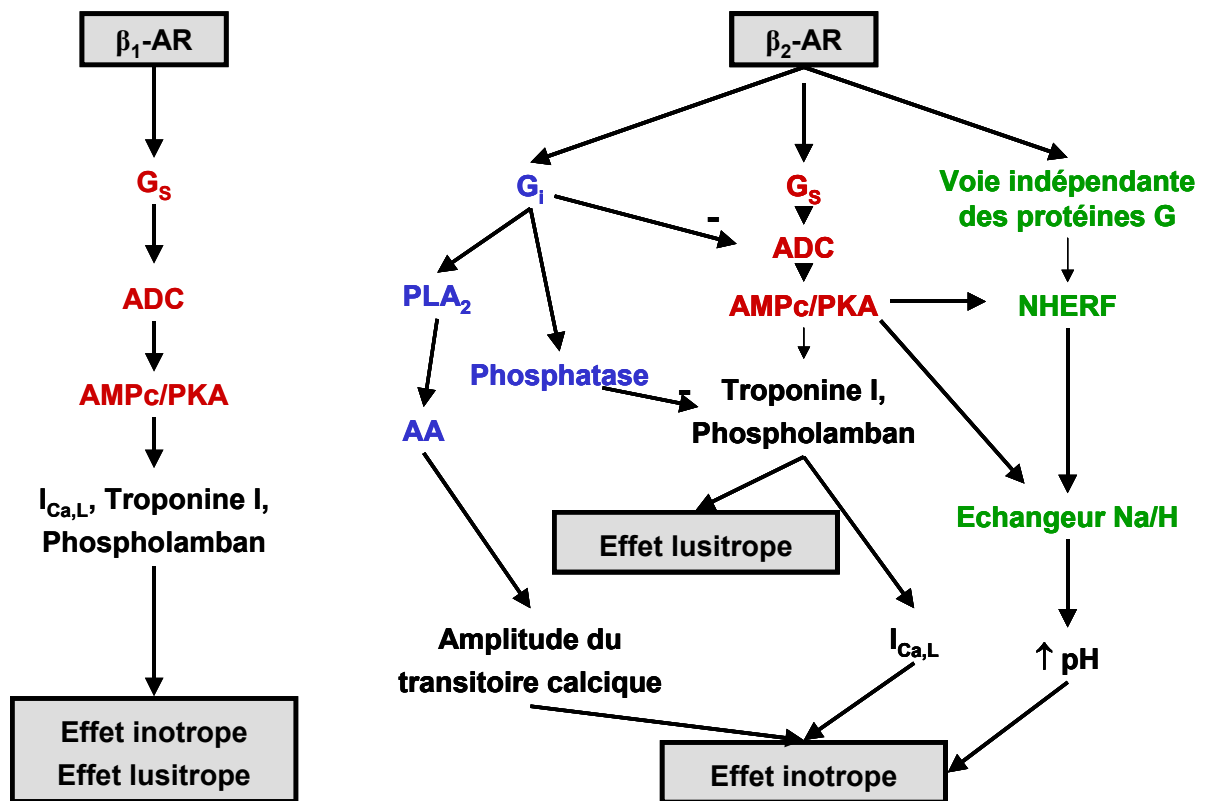


Figure 4 : Représentation schématique des voies de signalisations activées par les récepteurs β_1 et β_2 -ARs dans les cardiomyocytes. ADC : adénylate cyclase ; NHERF : Na^+/H^+ exchanger regulator factor (d'après Steinberg, 1999).

La présence du récepteur β_3 -AR a été décrite dans le cœur humain et dans d'autres espèces. L'activation des récepteurs β_3 -ARs induit une diminution de la contractilité cardiaque (Gauthier et coll., 1996) (Figure 5).

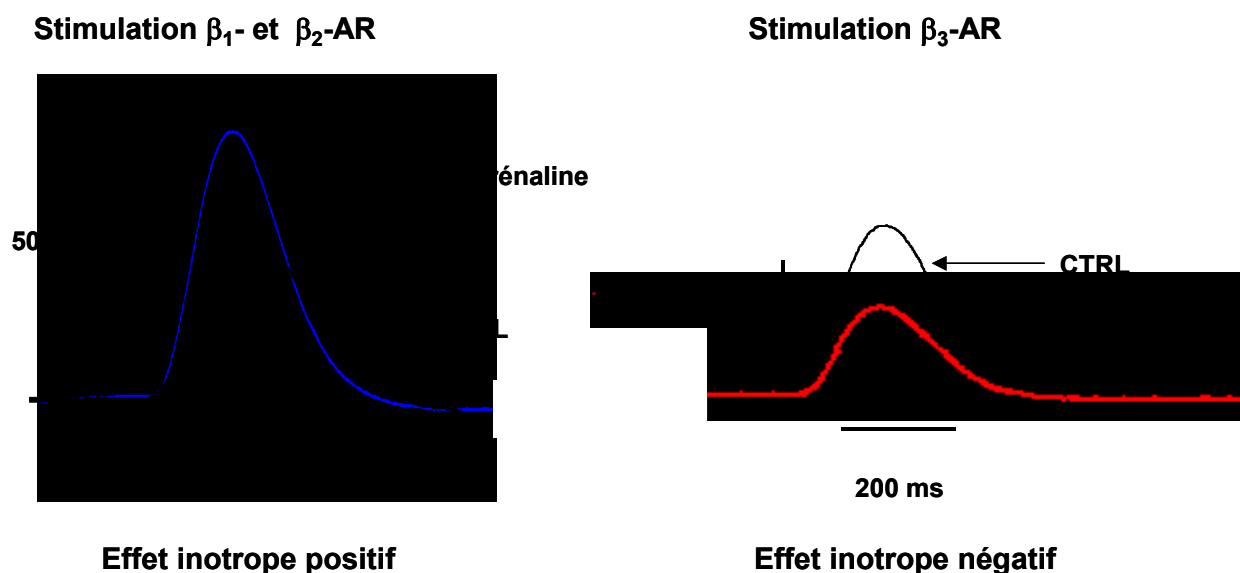


Figure 5 : Effets de la stimulation des différents sous-types de récepteurs β -ARs sur la contractilité de biopsie endomyocardique humaine. (d'après Gauthier et coll., 1996)

1. Effets sur la contractilité

Chez l'homme, des études *in vivo* ont montré que les agonistes β_3 -ARs étaient responsables d'un effet chronotrope positif, qui était inhibé en présence d'antagonistes β_1 - ou β_2 -ARs, et semblait être en rapport avec une activation du baroréflexe secondaire aux effets vasodilatateurs de ces agonistes β_3 -ARs (Wheeldon et coll., 1993; Wheeldon et coll., 1994). Sur des biopsies endomyocardiques humaines obtenues à partir de prélèvements réalisés sur des cœurs transplantés, il a été démontré que l'isoprenaline produit un effet inotrope positif classique. En revanche, en présence de nadolol, un antagoniste β_1 - et β_2 -AR qui présente une faible affinité pour le récepteur β_3 -AR natif ou recombinant (Emorine et coll., 1989; Galitzky et coll., 1993) l'isoprénaline induit un effet inotrope négatif (Gauthier et coll., 1996). Des effets inotropes négatifs similaires ont été obtenus avec plusieurs agonistes β_3 -ARs comme le BRL 37344, le SR 58611A et le CL 316 243. Ces agonistes diminuent la contractilité myocardique dans une gamme de concentrations comprises entre 0,1 nM à 1 μ M avec une puissance de l'ordre du nanomolaire. L'ordre de puissance des agonistes β_3 -ARs obtenu sur le myocarde humain :

BRL 37344 > SR 58611A \approx CL 316 243 >> CGP 12177A (Gauthier et coll., 1996) est similaire à celui retrouvé dans des cellules CHO transfectées avec le récepteur β_3 -AR humain (Pietri-Rouxel et Strosberg, 1995). Le CGP 12177A, un agoniste β_3 -AR partiel est responsable d'un effet dépresseur myocardique qui est plus faible que celui obtenu avec les agonistes β_3 -ARs préférentiels (Gauthier et coll., 1996). En présence d'une association d'antagonistes des récepteurs α_1 -ARs et β_1 -/ β_2 -ARs (telle que l'association de prazosine et de nadolol), la noradrénaline, une des catécholamines endogènes, est responsable d'effets agonistes β_3 -ARs, à des concentrations correspondant à des situations physiopathologiques (Gauthier et coll., 1998). De plus, l'effet inotrope négatif des agonistes β_3 -ARs n'est pas modifié en présence de métoprolol (un antagoniste β_1 -AR) ou de nadolol, mais est inhibé en présence de bupranolol (Gauthier et coll., 1996) qui associe des propriétés antagonistes β_1 -, β_2 - et β_3 -ARs (Langin et coll., 1991 ; Galitzky et coll., 1993). La présence du récepteur β_3 -AR dans des ventricules de cœur humain non insuffisant a été renforcée par la mise en évidence de transcrits codant pour ce récepteur par PCR (Gauthier et coll., 1996) et de la protéine par immuno-empreinte et immunohistochimie (Moniotte et coll., 2001).

Un autre groupe ne retrouve pas cet effet dépresseur myocardique chez l'homme des agonistes β_3 -ARs, dont le BRL 37344, en présence de nadolol, à la fois au niveau auriculaire et ventriculaire (Kaumann et Molenaar, 1997; Molenaar et coll., 1997). De plus, dans l'oreillette humaine, le pindolol qui présente des propriétés agonistes partielles vis-à-vis du récepteur β_3 -AR et du récepteur β_1 -AR de faible affinité, induit un effet inotrope positif qui n'est pas inhibé en présence d'un antagoniste sélectif, le L-748,337 (Joseph et coll., 2003) suggérant que cet effet n'est pas du à l'activation des récepteurs β_3 -ARs. Cependant, par immunohistologie, en utilisant un anticorps monoclonal sélectif dirigé contre le récepteur β_3 -AR (Mab 72c), la présence de ce récepteur a été décrite au niveau de l'oreillette (Chamberlain et coll., 1999) et du ventricule (Moniotte et coll., 2001) humains. Plus récemment, il a été montré que le BRL 37344 induit une augmentation de la contractilité de trabécules provenant de l'oreillette droite humaine. Cet effet est aboli en présence de nadolol, indiquant que le BRL 37344 est responsable d'une activation des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans l'oreillette humaine (Pott et coll. 2003) et n'entraîne pas d'effet inotrope négatif comme dans le ventricule humain (Gauthier et coll., 1996). Ainsi la présence et surtout le rôle du récepteur β_3 -AR au niveau auriculaire doivent être précisés.

Il a été montré que les effets cardiaques de plusieurs agonistes β_3 -ARs préférentiels étaient sujets à une grande variabilité suivant l'espèce considérée et que le profil pharmacologique obtenu sur le myocarde humain ne pouvait pas être extrapolé aux autres

modèles animaux usuels. Par ailleurs, l'utilisation de différentes approches peut engendrer des résultats contradictoires. Ainsi, dans l'oreillette de cobaye, le SR 58611A (Bianchetti et Manara, 1990) et le CL 316 243 (Dolan et coll., 1994) ne modifient pas la contractilité et la fréquence cardiaque, alors que dans des cœurs perfusés par la technique de Langendorff, la stimulation β_3 -AR induit un effet inotrope négatif (Kitamura et coll., 2000).

Chez le chien, l'administration intraveineuse d'agonistes β_3 -ARs entraîne un effet chronotrope positif (Tavernier et coll., 1992). Cette tachycardie n'est pas observée chez l'animal dénervé, et est potentiellement due à une activation du baroréflexe en réponse à la chute de pression artérielle secondaire aux effets vasodilatateurs des agonistes β_3 -ARs (Berlan et coll., 1994; Shen et coll., 1994; Shen et coll., 1996). Cependant, après blocage du système nerveux autonome, le CL 316 243 produit toujours un effet inotrope positif chez le chien conscient, alors que son effet sur la fréquence cardiaque est aboli (Shen et coll., 1996). Les effets chronotropes et inotropes positifs ont également été retrouvés sur des auricules de chien isolées et perfusées avec le sang d'un chien donneur ayant été traité par du BRL 37344. Ces effets ont été attribués à une stimulation β_1 -AR (Takayama et coll., 1993) et pourraient être dus aux catécholamines sécrétées par le chien donneur après activation de son arc baroréflexe. Sur du muscle papillaire de chien, plusieurs agonistes β_3 -ARs induisent un effet inotrope négatif, bien que moins marqué que dans le myocarde humain (30% contre 50% respectivement). Cependant, l'ordre de puissance des agonistes β_3 -ARs observé est bien différent de celui obtenu chez l'homme :

CGP 12177A > BRL 37344 \approx SR 58611A >> CL 316 243 (Gauthier et coll., 1999).

Cet effet inotrope négatif est associé à la détection du transcrit codant pour le récepteur β_3 -AR dans les mêmes tissus (Gauthier et coll., 1999). Dans les cardiomyocytes de chien, le BRL 37344 est responsable d'une diminution concentration-dépendante de la contraction et de la relaxation. Ces effets ne sont pas modifiés par le prétraitement des cardiomyocytes par des antagonistes β_1 -ARs et β_1/β_2 -ARs, confirmant que ces effets ne sont pas dus à l'activation des récepteurs β_1 - et/ou β_2 -ARs. En revanche, ils sont complètement inhibés par le bupranolol, antagoniste β -AR non sélectif et le L-748,337, antagoniste β_3 -ARs, confirmant que l'effet inotrope négatif du BRL 37344 est bien secondaire à l'activation des récepteurs β_3 -ARs. La pertinence de ces résultats a été renforcée par la détection des transcrits du récepteur β_3 -AR et de la protéine chez le chien (Cheng et coll., 2001).

Dans l'auricule de rat, plusieurs agonistes β_3 -ARs préférentiels (CL 316 243, ZD 2079 et SR 58611A), utilisés à des concentrations micromolaires, ne modifient pas l'inotropisme ni le chronotropisme alors qu'à des concentrations plus faibles (de l'ordre du nanomolaire), ils

sont responsables d'une relaxation du muscle lisse digestif (Kaumann et Molenaar, 1996). De même, il n'a pas été observé d'effet de plusieurs agonistes β_3 -ARs sur des préparations d'oreillette (Cohen et coll., 1999) et de ventricule de rat en dehors d'un effet modéré du BRL 37344 (Gauthier et coll., 1999). Ces données fonctionnelles ont été renforcées par l'absence ou le très faible niveau d'expression du récepteur β_3 -AR dans le myocarde de rat (Gauthier et coll., 1999). Dans une autre étude, les transcrits du récepteur β_3 -AR et la protéine ont pourtant été détectés dans le cœur normal de rat (Dincer et coll., 2001). Cependant, cette étude n'excluait pas la possibilité que le récepteur β_3 -AR provienne du tissu adipeux, dans la mesure où aucune évaluation des marqueurs du tissu adipeux, comme l'adipsine, n'était réalisée. Dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés, aucune réponse fonctionnelle n'a été observée, suggérant une absence d'expression de ce récepteur dans ces cellules (Germack et Dickenson, 2006).

Chez la souris sauvage, les agonistes β_3 -ARs ne modifient pas la contractilité myocardique. Cette observation a été renforcée par l'absence de détection de la protéine (Tavernier et coll., 2003). Cependant, la surexpression cardiomyocytaire du récepteur β_3 -AR humain chez la souris, reproduit *ex vivo* l'effet inotrope négatif obtenu après stimulation β_3 -AR dans le ventricule humain (Tavernier et coll., 2003). En revanche, dans une autre étude réalisée sur le même modèle de souris transgénique, l'administration d'un agoniste β_3 -AR, le L-755-507, est responsable d'une réponse inotrope positive (Kohout et coll., 2001). Les différentes approches expérimentales, *ex vivo* vs *in vitro*, et le terrain génétique des souris (respectivement hybride B6D2/F1 vs B6S/F1) pourraient en partie expliquer ces différences. De plus, une seule lignée de souris a été utilisée dans la première étude alors que les données recueillies dans la seconde provenaient d'expériences menées sur plusieurs lignées. Enfin, le choix de l'agoniste β_3 -AR ainsi que les concentrations utilisées, peuvent être sujets à controverse.

2. Les effets électrophysiologiques

Les mécanismes responsables de la diminution de la contractilité myocardique sont loin d'être connus, mais plusieurs travaux suggèrent l'implication d'altération dans le couplage excitation-contraction et les activités de canaux ioniques transmembranaires. Peu de travaux ont évalué les effets électrophysiologiques de la stimulation β_3 -AR. Dans les cardiomyocytes de chien et de rat, ainsi que dans des cœurs battants de cobaye, l'effet inotrope négatif du BRL 37344, est associé à une inhibition des canaux calciques de type L et une diminution d'amplitude du transitoire calcique intracellulaire (Kitamura et coll., 2000; Cheng et coll.,

2001; Zhang et coll., 2005a). Dans des biopsies endomyocardiques humaines, les agonistes β_3 -ARs sont responsables d'une diminution d'amplitude et d'une accélération de la phase de repolarisation du potentiel d'action ventriculaire dans un même ordre de grandeur que la diminution de contractilité (Gauthier et coll., 1996). Ces effets ne sont pas observés dans des prélèvements ventriculaires de cœur de patients porteurs de la mucoviscidose (cystic fibrosis des anglo-saxons) (Leblais et coll., 1999). Cette pathologie est due à des mutations du gène codant pour le régulateur de conductance transmembranaire (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator = CFTR) (Riordan et coll., 1989). Dans la mesure où le CFTR est exprimé dans le cœur humain (Levesque et coll., 1992; Warth et coll., 1996), les différences de résultats obtenus concernant le potentiel d'action ventriculaire des patients porteurs ou non de mucoviscidose, pourraient s'expliquer par la modification de l'activation d'un courant chlore repolarisant. En effet, ce courant n'est pas fonctionnel dans les cardiomyocytes des patients porteurs de la mucoviscidose. Dans un système d'expression hétérologue, co-exprimant le récepteur β_3 -AR humain et le CFTR, les agonistes β_3 -ARs sont responsables d'une activation de CFTR par le biais d'une voie de signalisation indépendante de la voie AMPc-PKA (Leblais et coll. 1999). La modulation de la repolarisation du potentiel d'action par le récepteur β_3 -AR pourrait également résulter de l'action de certains canaux potassiques. Cependant, les données existantes sur l'implication des canaux potassiques sont actuellement contradictoires. Dans un système recombinant, il a été suggéré que la stimulation du récepteur β_3 -AR soit à l'origine d'une activation du canal potassique KvLQT1/MinK (Kathofer et coll., 2000). Cependant, dans cette étude, des agonistes β_3 -ARs préférentiels n'ont pas été utilisés. Dans les cardiomyocytes de cobaye, le BRL 37344 inhibe le courant potassique I_{Ks} conduisant à une augmentation de la durée du potentiel d'action (Bosh et coll., 2002). Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer de façon précise le rôle potentiel du récepteur β_3 -AR dans la régulation de la repolarisation cardiaque.

Concernant la régulation de la fréquence cardiaque par la stimulation du récepteur β_3 -AR, plusieurs études *in vivo* utilisant des agonistes β_3 -ARs préférentiels comme le BRL 37344 et le CL 316 243, ont mis en évidence un effet chronotrope positif chez le chien et le rat (Tavernier et coll., 1992; Shen et coll., 1994; Shen et coll., 1996). Cependant, cet effet est sans doute à mettre en rapport avec des mécanismes réflexes plutôt qu'à une activation directe du récepteur β_3 -AR cardiaque, dans la mesure où il disparaît après dénervation sinoaortique chez le chien (Tavernier et coll., 1992) ou l'utilisation d'antagonistes β_1 - et β_2 -ARs (Shen et coll., 1996). De même, chez l'homme, l'effet chronotrope positif induit par la stimulation β_3 -ARs est inhibé par l'administration d'antagonistes β_1 - et β_2 -ARs et résulte probablement de

l'activation du baroréflexe, secondaire à la vasodilatation induite par l'agoniste β_3 -AR (Wheeldon et coll., 1993; Wheeldon et coll., 1994). Chez les souris sur-exprimant le récepteur β_3 -AR humain, la fréquence cardiaque est significativement augmentée (Tavernier et coll., 2003) alors que dans une autre étude elle n'est pas significativement modifiée (Kohout et coll., 2001). L'augmentation de la fréquence cardiaque rapportée par Tavernier et coll., pourrait être la conséquence de l'activation de KvLQT1 qui est présent dans le système de conduction de la souris (Wang et coll., 1996) ou par la présence de récepteurs β_3 -ARs constitutivement actifs en raison de leur surexpression comme cela a déjà été décrit pour les récepteurs β_2 -ARs (Milano et coll., 1994). Dans la mesure où I_{ks} est absent dans le cœur de souris adulte (Kupersmidt et coll., 1994), ce courant potassique ne peut pas être impliqué dans les effets observés sur la fréquence cardiaque. Enfin, une étude menée sur des oreillettes de rats et de souris, a montré que le ZD 7114, un agoniste β_3 -AR, a un effet chronotrope positif sur ces préparations (Sterin-Borda et coll., 2006). Cet effet, dépendant d'une élévation des taux d'AMPC, serait partiellement contre-balancé et limité par l'activation d'une voie protéine G_i /NO synthase/guanosine 3', 5' monophosphate (GMPc) par le récepteur β_3 -AR. Ces résultats indiquent une action anti-arythmique potentielle de l'activation du récepteur β_3 -AR. Cette propriété pourrait être particulièrement importante en cas d'insuffisance cardiaque, où il existe un risque élevé de troubles du rythme en raison d'un tonus adrénergique élevée. Dans ces conditions, l'augmentation d'expression du récepteur β_3 -AR observée, pourrait être considérée comme un phénomène adaptatif protecteur. Inversement, une étude menée chez des chiens porteur d'une cardiopathie ischémique suggère que l'augmentation de l'expression ventriculaire du récepteur β_3 -AR induite par l'administration de NGF (Nerve Growth Factor) dans le ganglion stellaire gauche pourrait être responsable d'une augmentation d'incidence de troubles du rythme (Zhou et coll., 2005).

3. Les voies de signalisation

Au niveau cardiaque, à la différence des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs, le récepteur β_3 -AR n'est pas couplé aux protéines G_s , mais aux protéines G_i (Figure 6). Le prétraitement de tissu ventriculaire humain de chien et de rat par la toxine pertussique abolit la réponse inotrope négative secondaire à la stimulation β_3 -AR (Gauthier et coll., 1996; Cheng et coll., 2001; Zhang et coll., 2005a). Dans les adipocytes de rongeur, les récepteurs β_3 -ARs sont à la fois couplés aux protéines G_s et aux protéines G_i (Chaudhry et coll., 1994; Begin-Heick, 1995). Récemment, il a été montré dans un système recombinant, que l'isoforme β_{3b} du récepteur β_3 -AR de souris pouvait être couplé à la fois aux protéines G_s et aux protéines G_i , alors que

l'isoforme β_{3a} était couplée uniquement aux protéines G_s (Hutchinson et coll., 2002). La même équipe a émis l'hypothèse, après étude dans un système recombinant du récepteur β_3 -AR muté, que cette différence de couplage aux protéines G pouvait être soit liée à des modifications de la conformation du récepteur β_{3a} induites par des protéines interagissant avec la partie C-terminale du récepteur, soit à une compartimentalisation intracellulaire particulière de ce récepteur secondaire à des interactions protéiques (Sato et coll., 2005). Il convient de souligner qu'à l'heure actuelle, les voies de signalisations activées par la stimulation des récepteurs β_{3a} - et β_{3b} -ARs n'ont jamais été étudiées dans un système cellulaire natif. De même, la présence de ces 2 isoformes au niveau cardiaque n'a pas été démontrée.

Dans le ventricule humain, l'activation des protéines G_i , ne semble pas être responsable d'une inhibition de l'adénylate cyclase, mais plutôt d'une activation de la voie du NO, impliquant notamment la NO synthase endothéliale (Gauthier et coll., 1998) (Figure 6), qui est exprimée dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes (Schulz et coll., 2006). Chez des souris dépourvues du gène codant pour les récepteurs β_3 -ARs (β_3 -KO), la réponse contractile myocardique à l'isoprénaline est augmentée par rapport aux souris contrôles. Cette réponse n'est pas modifiée après inhibition des NO synthases par le N^g-monométhyl-L-arginine monoacétate (L-NMMA) chez les souris β_3 -KO, mais est potentialisée chez les souris contrôles (Varghese et coll., 2000). Comme aucun transcrite pour le récepteur β_3 -AR, ni aucune protéine n'ont été détectés dans le myocarde des souris contrôles, l'effet observé pourrait être secondaire à l'activation des récepteurs β_3 -ARs endothéliaux. De plus, cette étude suggère que la voie de signalisation β_3 -AR-NO pourrait agir comme une boucle de régulation négative s'opposant aux effets inotropes positifs des catécholamines dans le cœur. L'activation de la NO synthase endothéliale peut se faire suivant 2 mécanismes : (i) la translocation, dépendante de sa liaison au complexe calcium-calmoduline (la liaison du complexe calcium-calmoduline à la eNOS lève l'interaction inhibitrice de la cavéoline) (Feron et coll., 1998; Wu, 2002) et (ii) et la phosphorylation de la protéine au niveau du résidu sérine 1177 (Goligorsky et coll., 2002). Chez l'homme, il semble que le premier mécanisme d'activation de la NO synthase endothéliale soit prédominant au niveau auriculaire alors que le second prédomine au niveau ventriculaire gauche (Brixius et coll., 2004). Une étude récente révèle également que le couplage du récepteur pourrait se faire avec des isoformes de NO synthase différentes suivant la cavité cardiaque considérée. En effet, Sterin-Borda et coll., ont mis en évidence un couplage préférentiel du récepteur β_3 -AR à la NO synthase neuronal au niveau auriculaire (Sterin-Borda et coll., 2006). Dans des souris déficientes en gène codant pour la NO synthase endothéliale, l'effet chronotrope positif induit

par la stimulation β_3 -AR sur l'oreillette n'est pas modifié, alors que l'inhibition de la NO synthase neuronale chez ces animaux, entraîne une augmentation de la fréquence en présence d'agoniste β_3 -AR. Dans ce travail, les auteurs soulignent la possibilité d'un couplage du récepteur β_3 -AR à la fois à la voie protéine Gs-adénylate cyclase-AMPc mais aussi à la voie protéine Gi-NO-guanylate cyclase-GMPc .

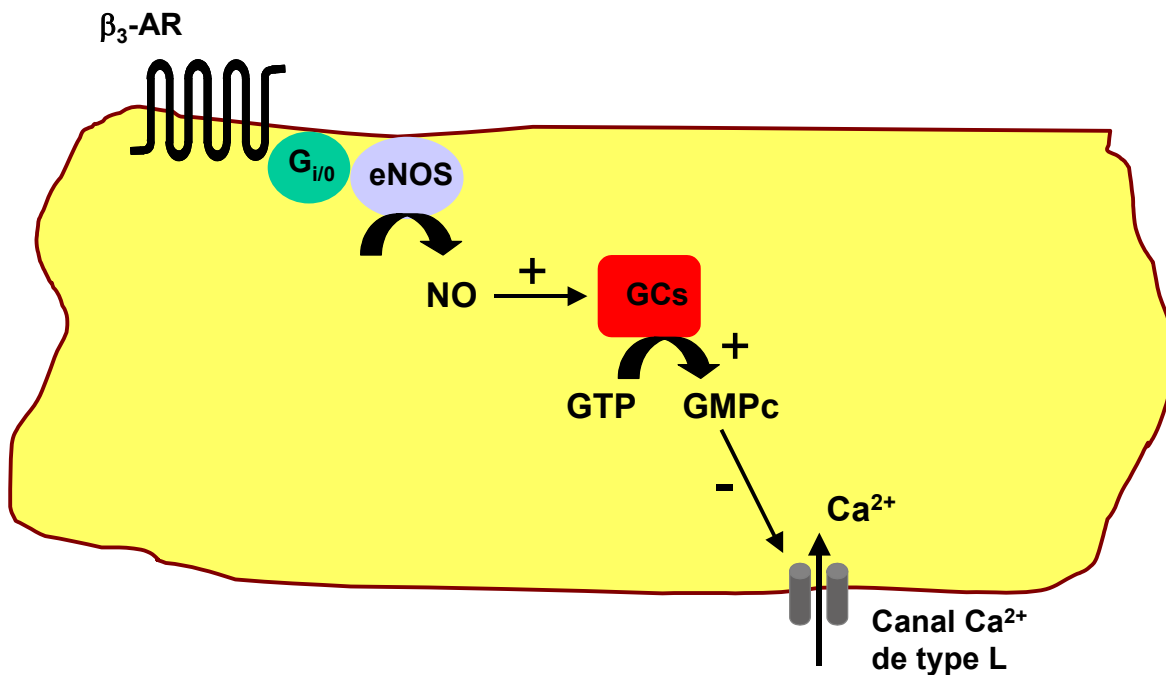


Figure 6 : Voies de signalisation du récepteur β_3 -AR dans les cardiomyocytes ventriculaires humains. Ca^{2+} : calcium ; GTP : guanosine triphosphate ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; GCs : guanylate cyclase soluble ; NO : monoxyde d'azote ; eNOS : NO synthase endothéliale ; $G_{i/o}$: protéine $G_{i/o}$; + : activation ; - : inhibition

La production de NO est responsable d'une activation de la guanylate cyclase soluble entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire de GMPc (Gauthier et coll., 1998). Des résultats similaires démontrant l'implication de la même voie de signalisation ont été obtenus dans les cardiomyocytes de rat et de chien (Cheng et coll., 2001; Zhang et coll., 2005a). L'augmentation de GMPc pourrait agir sur différentes cibles : (i) la protéine kinase dépendante du GMPc, qui diminue le courant calcique *via* la régulation des canaux calciques de type L (Mery et coll., 1991; Wahler et Dollinger, 1995) ou qui diminue la réponse contractile des myofilaments indépendamment des changements de transitoire calcique (Shah et coll., 1994; Goldhaber et coll., 1996; Yasuda et Lew, 1997) et (ii) le GMPc est responsable de l'activation des phosphodiésterases de type II (Beavo, 1995) conduisant à une diminution

des taux d'AMPC intracellulaire (Mery et coll., 1993). Une étude récente met en évidence une compartimentalisation des récepteurs β -ARs, de l'adénylate cyclase et de la phosphodiesterase de type II, renforçant le concept de rétrocontrôle négatif, que pourrait jouer le récepteur β_3 -AR vis-à-vis de la stimulation β_1 -/ β_2 -AR (Figure 7) (Mongillo et coll., 2005). Parallèlement, le NO régule la fonction cardiaque d'une manière GMPc-indépendante par des modifications directes de protéines clés telles que la cytochrome c oxydase (Torres et coll., 1995), la créatine phosphokinase (Gross et coll., 1996) ou les canaux calciques de type L (Campbell et coll., 1996). Cependant, le mécanisme d'inhibition des canaux calciques de type L par la stimulation β_3 -AR dans les cardiomyocytes de chien et de rat reste à préciser (Cheng et coll., 2001; Zhang et coll., 2005a). Il faut en particulier remarquer que chez le rat le faible niveau d'expression du récepteur β_3 -AR au niveau myocardique peut difficilement rendre compte de cette inhibition. Il peut s'agir d'une évolution spontanée connue sous le nom du phénomène dit de « run down » des canaux calciques.

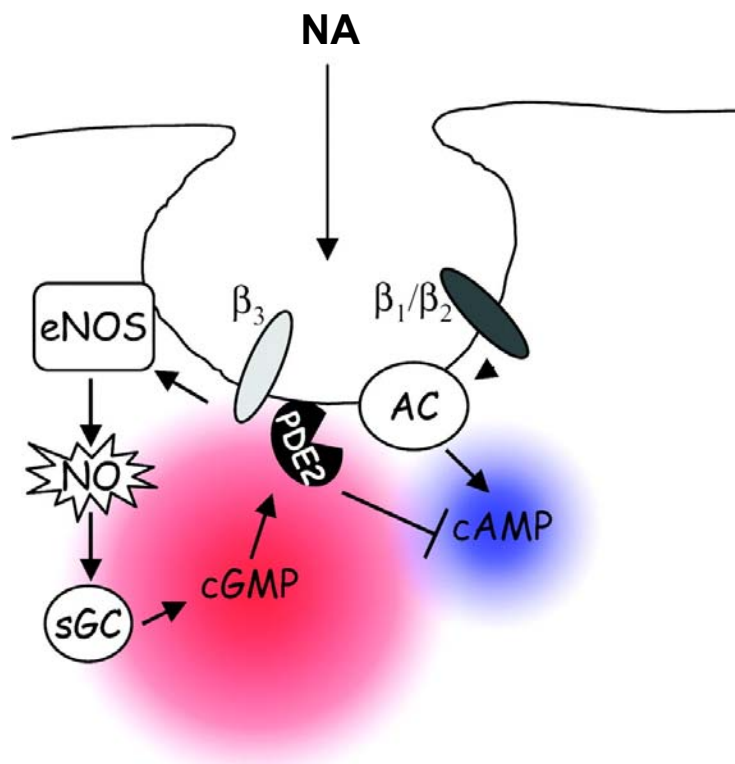


Figure 7 : Représentation schématique de la boucle de rétrocontrôle négatif de la stimulation β_1 -/ β_2 -AR par le récepteur β_3 -AR. Un compartiment cellulaire précis contient les récepteurs β -ARs, un stock spécifique d'adénylate cyclase (AC), la NO-synthase endothéliale (eNOS), et la phosphodiesterase de type II (PDE2). sGC : guanylate cyclase soluble, NA : noradrénaline (d'après Mongillo et coll., 2006)

Dans les trabécules auriculaires humains, le BRL 37344 ne modifie pas la force de contraction par activation du récepteur β_3 -AR. Cependant, cette activation entraîne une augmentation de production du NO par activation de la NO synthase endothéliale (Pott et coll., 2003). Ce résultat indique que le rôle fonctionnel de la stimulation β_3 -AR n'est pas le même suivant la cavité cardiaque considérée. Cela peut s'expliquer par (i) un couplage et/ou des effecteurs du récepteur β_3 -AR différents dans le ventricule et l'oreillette, (ii) un niveau d'expression du récepteur plus faible au niveau de l'oreillette droite par rapport au ventricule et une expression plus importante de la NO synthase endothéliale dans l'oreillette (Bloch et coll., 1999). Il a été proposé que le récepteur β_3 -AR auriculaire pourrait être à l'origine d'un rétrocontrôle négatif prévenant la survenue de tachycardie sinusale et d'arythmies secondaires à une stimulation β_1 -/ β_2 -AR excessive. Cependant, cette hypothèse est en désaccord avec les résultats obtenus avec les souris surexprimant le récepteur β_3 -AR humain spécifiquement dans les cardiomyocytes, chez qui une augmentation de la fréquence cardiaque de base est obtenue (Tavernier et coll., 2003). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les prélèvements d'oreillette droite humaine sont obtenus à partir de patients porteurs de cardiopathies ischémique ou valvulaire nécessitant différents traitements pouvant modifier la réponse β_3 -AR.

Enfin, tout récemment, une équipe a montré la présence de récepteurs β_1 - et β_3 -AR au niveau de la membrane nucléaire de cardiomyocytes de rat et de souris (Boivin et coll., 2006). Ces auteurs montrent que l'application de BRL 37344 est responsable d'une augmentation de la synthèse d'ARN sur des préparations nucléaires de cardiomyocyte. Par ailleurs, il semble que les effets de la stimulation du récepteur β_3 -AR nucléaire soient partiellement inhibés par un prétraitement à la toxine pertussique, soulignant la participation de protéines G_i (présentes également dans les fractions nucléaires) à la transduction du signal. Les auteurs soulignent la possibilité pour les ligands d'atteindre ces récepteurs β_3 -ARs nucléaires grâce à des systèmes de transporteurs tels que l'EMT (extraneuronal monoamine transporter ou OCT3) présents au niveau cardiaque (Jonker et Schinkel, 2004).

D. Les récepteurs β_3 -adrénergiques vasculaires

Au cours des 20 dernières années, les connaissances concernant la physiologie et la pharmacologie vasculaire ont considérablement évolué, avec en particulier la mise en évidence du rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus vasomoteur. L'activation de récepteurs endothéliaux peut être responsable d'une vasodilatation (Furchgott et Zawadzki, 1980) ou d'une vasoconstriction (De Mey et Vanhoutte, 1982).

La stimulation des cellules musculaires lisses par des agonistes vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II, l'endothéline-1, la noradrénaline ou le thromboxane A_2 induit une augmentation rapide de la concentration calcique cytosolique ($[Ca^{2+}]_i$) qui atteint en quelques secondes une valeur maximale (Figure 8). Cette augmentation est consécutive à l'entrée de Ca^{2+} produite par l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel membranaire et à la libération du Ca^{2+} stocké dans le réticulum sarcoplasmique par l'activation des récepteurs-canaux de l'inositol triphosphate.

Le Ca^{2+} cytosolique se lie à la calmoduline (CAM) et forme le complexe Ca^{2+} -CAM qui active la Myosine Light Chain Kinase (MLCK). La MLCK phosphoryle la Myosin Light Chain (MLC). La protéine G monomérique Rho et son effecteur Rho kinase sont capables, par l'inhibition de la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP), de réguler la phosphorylation des chaînes légères de la myosine (MLC) et, par conséquent, d'augmenter la sensibilité de la cellule au calcium intracellulaire.

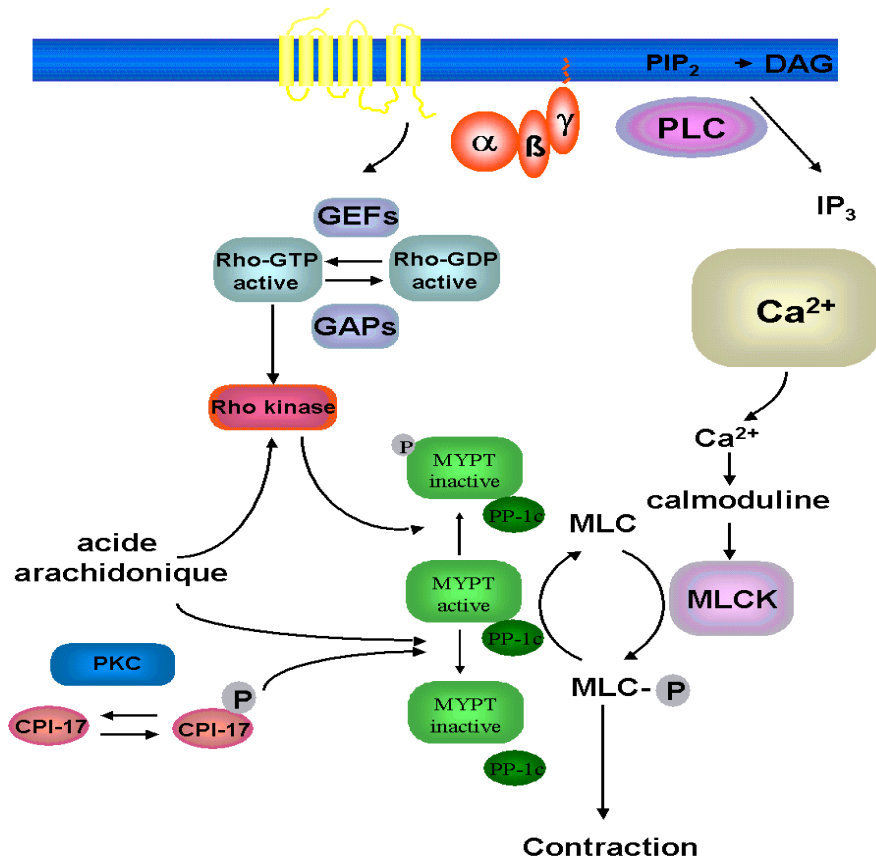


Figure 8 : Signalisation intracellulaire de la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires. L'activation des récepteurs à 7 domaines transmembranaires par un vasoconstricteur produit à la fois l'activation de la MLCK (kinase de la chaîne légère de la myosine) consécutive à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et l'inhibition de la MLCP (phosphatase de la chaîne légère de la myosine). La MLCP est composée de la sous-unité régulatrice MYPT et de la sous-unité catalytique PP1-c. L'inhibition de la MLCP est sous le contrôle de la voie Rho-Rho kinase. Rho est active lorsqu'elle est liée à la guanosine triphosphate (GTP). Les facteurs d'échange des nucléotides guanidiques (GEF) favorisent l'échange de la guanosine diphosphate pour du GTP. Les protéines stimulatrices de l'activité GTPase (GAPs) favorisent la dégradation du GTP en GDP par Rho. Rho, liée au GDP, est inactive. Abréviations : DAG : diacylglycérol, IP_3 : inositol tri-phosphate, MLC : chaîne légère de la myosine, PIP_2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, PKC : protéine kinase de type C, PLCb : phospholipase C de type b (Selon Loirand et Douillon, 2002).

Des travaux récents indiquent de nouvelles perspectives concernant la signalisation β -AR vasculaire, en particulier depuis la description d'un troisième sous-type de récepteur β -AR. La stimulation β -AR est responsable d'une relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires et contrôle ainsi le flux sanguin dans différents organes. Les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs sont tous deux responsables d'une vasodilatation. Classiquement, le récepteur β_2 -AR est considéré comme le récepteur β -AR vasculaire prédominant (Lands et coll., 1967b). Cependant, l'implication de chaque sous-type de récepteur β -AR varie suivant le lit vasculaire et l'espèce considérés (Osswald et Guimaraes, 1983). Par exemple, le récepteur β_1 -AR semble être prédominant au niveau des vaisseaux coronaires et cérébraux (Edvinsson et Owman, 1974 ; O'Donnell et Wanstall, 1985). De plus, Krauss et coll. ont montré que l'amplitude de la réponse β -AR dans les artères coronaires épicaudiques était inversement proportionnelle à la taille du vaisseau (Krauss et coll., 1992). Dans un même modèle, des résultats contradictoires sont parfois observés. Ainsi dans l'aorte de rat, il a été démontré que la réponse vasodilatatrice à l'isoprénaline pouvait être indépendante, partiellement dépendante ou totalement dépendante de l'endothélium (Konishi et Su, 1983, Brawley et coll., 2000). Pour expliquer ces différences, Guimaraes et Moura ont proposé plusieurs hypothèses, suggérant que la vasorelaxation induite par les agonistes β -ARs pouvait varier en fonction : (i) de l'agent précontractant utilisé, (ii) du niveau de précontraction et (iii) du niveau d'expression des récepteurs β -ARs (Guimaraes et Moura, 2001). L'ensemble de ces considérations rend compte de la difficulté à comparer les différentes études traitant du rôle des récepteurs β -ARs sur le tonus vasculaire.

1. Les études *in vivo*

Des études *in vivo* ont été menées dans différents modèles, pour établir les effets d'agonistes β_3 -ARs sur l'hémodynamique systémique et la distribution des flux sanguins régionaux.

Chez des rats conscients, Shen et coll., ont montré que le CL 316 243 et le BRL 37344, 2 agonistes β_3 -ARs, étaient responsables d'une hypotension avec une vasodilatation périphérique qui persistent en présence d'antagonistes β_1 - et β_2 -ARs (Shen et coll., 1994; Shen et coll., 1996). Des microsphères marquées ont été utilisées pour évaluer les effets des agonistes β_3 -ARs sur certains débits sanguins régionaux chez le rat anesthésié. Dans ce travail, ni le CL 316 243, ni le BRL 26880A n'a induit de variation significative de la pression artérielle. Néanmoins, il est constaté une augmentation du flux sanguin au niveau des îlots de Langerhans sous l'action du CL 316 243 (Atef et coll., 1996) et au niveau de la graisse brune

par le BRL 26880A (Takahashi et coll., 1992). De plus, plusieurs agonistes β_3 -ARs (BRL 35135, CL 316 243, SR 58611A) induisent une augmentation du flux sanguin au niveau de l'antré gastrique chez des rats anesthésiés à l'halothane (Kuratani et coll., 1994).

Des techniques d'invalidation de gènes chez la souris ont permis d'évaluer le rôle de chaque sous-type de récepteurs β -ARs. Rohrer et coll. ont observé une augmentation compensatrice de la réponse β_3 -AR vasculaire chez des souris déficientes en récepteurs β_1 - et β_2 -ARs (Rohrer et coll., 1999). Ainsi, chez ces souris anesthésiées, le CL 316 243 induit une réponse hypotensive plus marquée que chez les souris contrôles.

Chez le chien conscient, Tavernier et coll. ont montré que le BRL 37344 était responsable d'une hypotension (Tavernier et coll., 1992). Cette hypotension est conservée chez l'animal ayant subi une dénervation sinoaortique (Berlan et coll., 1994). L'évaluation du flux sanguin cutané par une technique de laser-doppler a révélé une augmentation de la perfusion cutanée. Chez le chien conscient après un blocage pharmacologique du système nerveux autonome, l'évaluation des modifications du flux sanguin régional par microbilles radioactives après traitement par le BRL 37344 a confirmé la baisse de la pression artérielle secondaire à une augmentation de la conductance périphérique et à une vasodilatation au niveau cutané et du tissu adipeux (Shen et coll., 1994). De la même façon, chez le chien normal, l'administration de SR 58611A induit une hypotension par vasodilatation périphérique qui est résistante au blocage β_1 - et β_2 -AR (Donckier et coll., 2001). Comme chez le rat, le CL 316 243 semble être un agoniste β_3 -AR plus spécifique que le BRL 37344 chez le chien (Shen et coll., 1996). Il est important de noter que les effets vasculaires induits par la stimulation β_3 -AR sont plus marqués chez le chien que dans les autres espèces étudiées (Shen et coll., 1996).

De manière plus anecdotique le BRL 37344 est responsable d'une augmentation dose-dépendante du flux sanguin au niveau de la muqueuse nasale (reflet de la capacitance vasculaire) chez le porc anesthésié (Lacroix et coll., 1995).

Peu d'études ont évalué les effets de la stimulation β_3 -AR chez l'homme et les primates non humains. Le CL 316 243 et le BRL 37344 ne modifient aucun paramètre cardiovasculaire chez des singes conscients (Shen et coll., 1996). Chez l'homme, le CGP 12177A, agoniste β_3 -AR partiel, est responsable d'une augmentation modérée du flux sanguin au niveau du tissu adipeux (Barbe et coll., 1996). Chez des volontaires sains, Wheeldon et coll., ont évalué les effets d'un autre agoniste β_3 -AR, le BRL 35315 qui est rapidement transformé *in vivo* en son métabolite dé-estérifié, le BRL 37344 (Wheeldon et coll., 1994). Dans cette étude il semble que les effets observés du BRL 35315 soient abolis par un β -

bloquant non sélectif β_1 - et β_2 -AR. Dans une étude clinique récente portant sur l'intérêt d'un agoniste β_3 -AR, le L-796,568, dans la prise en charge de l'obésité, les paramètres cardiovasculaires ne sont pas significativement modifiés durant les 28 jours de traitement (Larsen et coll., 2002).

2. Les artères de conduction

Dans l'aorte thoracique de rat, le pindolol, un agoniste β -AR non spécifique possédant des propriétés agonistes β_3 -ARs, provoque une vasodilatation résistante au prétraitement du vaisseau par du propranolol suggérant la présence d'un récepteur β -AR atypique (Clark et Bertholet, 1983). Plus tard, plusieurs études montrent que la vasodilatation induite par l'isoprénaline est en partie résistante au blocage des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans l'aorte thoracique et la carotide de rat (Oriowo, 1994; MacDonald et coll., 1999; Trochu et coll., 1999).

Le BRL 37344 induit une vasorelaxation concentration-dépendante d'anneaux d'aorte thoracique de rat précontractés à la phényléphrine (agoniste α_1 -AR) (Oriowo, 1995). Le même effet relaxant est obtenu avec le SR 58611A, sans modification par un prétraitement au nadolol (antagoniste β_1 -/ β_2 -AR), mais inhibé en présence de SR 59230A (antagoniste β_3 -AR) (Trochu et coll., 1999). La désendothélialisation réduit de manière significative la relaxation induite par la stimulation β_3 -AR, suggérant une localisation endothéliale prépondérante du récepteur β_3 -AR (Trochu et coll., 1999). Cette localisation endothéliale a été confirmée par la suite grâce à des approches de biologie moléculaire et des techniques d'immunohistochimie (Rautureau et coll., 2002). Cependant, ces résultats ont été contestés. En effet, dans le même lit vasculaire, Brahmadevara et coll., ont mis en évidence que la relaxation induite par l'isoprénaline présentait une composante résistante au prétraitement par le propranolol, dans des anneaux précontractés à la phényléphrine mais pas sur des anneaux précontractés par le $\text{PGF}_{2\alpha}$ (un dérivé des prostaglandines) (Brahmadevara et coll., 2003). Sur les anneaux précontractés à la phényléphrine, l'antagoniste β_3 -AR, le SR 59230A, n'est pas parvenu à bloquer la relaxation induite par le BRL 37344 et le SR 58611A. De plus, le CL 316 243 n'entraîne pas de relaxation. Sur les anneaux précontractés par le $\text{PGF}_{2\alpha}$, seul le SR 58611A entraîne une relaxation qui n'est pas inhibée par le SR 59230A. Certaines études pharmacologiques tendent à montrer que le récepteur β_3 -AR est présent au niveau de l'aorte thoracique de rat, mais que son effet vasodilatateur est affecté par la nature de l'agent vasoconstricteur utilisé. Le choix de ce dernier, comme le suggèrent certains auteurs (Kozłowska et coll., 2005) doit être fait avec beaucoup de précaution dans le cadre de l'étude

de l'effet vasodilatateur des agonistes β -ARs. Le récepteur β_3 -AR pourrait être également impliqué dans la relaxation β -AR de l'aorte abdominale de rat (Matsushita et coll., 2003). Cependant, ces résultats doivent être pris avec précaution car seul un agoniste β_3 -AR partiel a été utilisé et la désendothélialisation n'a pas été testée.

Dans la carotide de rat, comme au niveau de l'aorte, le propranolol déplace la courbe concentration-relaxation de l'isoprénaline vers la droite sans modifier l'effet maximal obtenu. De plus, le BRL 37344 est également responsable d'une vasodilatation sur des anneaux artériels précontractés par la phényléphrine. Cette relaxation est endothélium-indépendante et n'est pas modifiée par un prétraitement des anneaux par du propranolol (Oriowo, 1994). Des résultats comparables ont été obtenus après précontraction avec un analogue du thromboxane A2 (U-44619) (MacDonald et coll., 1999). Néanmoins, dans cette dernière étude, il a été suggéré que le rôle joué par l'endothélium dans les effets β -ARs classiques et β_3 -ARs, serait différent, avec une moindre implication de l'endothélium dans la relaxation induite par le récepteur β_3 -AR. Dans le tronc de l'artère mésentérique de rat, il a été rapporté la présence d'un récepteur β -AR atypique (Kozłowska et coll., 2003). Au cours de cette étude, plusieurs agonistes β_3 -ARs ont induit une vasorelaxation. Néanmoins, pour ces auteurs, la comparaison détaillée de l'ordre de puissance des agonistes β_3 -ARs semble indiquer la présence d'un récepteur β -AR atypique autre que le récepteur β_3 -AR ou que le récepteur β_1 -AR de faible affinité.

Chez les souris déficientes pour le gène codant pour les récepteurs β_1 - ou β_2 -ARs (β_1 -KO ou β_2 -KO), l'isoprénaline est responsable d'une relaxation d'anneaux artériels provenant de l'aorte thoracique, de la carotide et de l'artère fémorale. Chez les souris déficientes pour les 2 gènes (β_1/β_2 -KO), la relaxation induite par l'isoprénaline est abolie, ce qui semble indiquer une absence de récepteurs β_3 -ARs (Chruscinski et coll., 2001). Dans les mêmes animaux β_1/β_2 -KO, il est intéressant de constater que *in vivo* des effets cardiovasculaires du CL 316 243, sont significativement augmentés (Rohrer et coll., 1999), suggérant donc une compensation de l'absence des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs par une réponse β_3 -AR accentuée.

L'artère de conduction la plus souvent étudiée chez l'homme est l'artère mammaire interne. Les fragments de ce vaisseau permettant de réaliser des études en cuve à organes isolés, sont recueillies lors de la réalisation des pontages aortocoronariens. Sur des anneaux d'artère mammaire interne désendothélialisés et précontractés à la phényléphrine, il a été mis en évidence un effet vasodilatateur du BRL 37344, concentration-dépendant, en rapport avec la stimulation d'un récepteur β -AR atypique, peut être le récepteur β_3 -AR qui serait localisé au niveau des cellules musculaires lisses (Shiafiei et coll., 2001). L'effet tocolytique des

agonistes β_3 -ARs, a conduit certaines équipes à se pencher sur les effets de ces agonistes sur la circulation ombilicale et placentaire. Dans l'artère ombilicale humaine, le BRL 37344 est responsable d'une faible vasodilatation (Dennedy et coll., 2002). Dans des artères placentaires prélevées sur le placenta de femmes ayant eu une grossesse normale ou compliquée d'une pré-éclampsie, le SR 59119A induit une vasodilatation. La présence du récepteur β_3 -AR dans ce lit vasculaire a été confirmée récemment par des techniques de biologie moléculaire et biochimiques (Rouget et coll., 2005).

3. Les artères de résistance

Peu d'études ont été menées concernant la présence et le rôle du récepteur β_3 -AR dans des artères de diamètre compris entre 2 et 300 μm , correspondant aux artères de résistances.

Briones et coll., ont montré que dans les microartères mésentériques, la relaxation β -AR était essentiellement due à la stimulation des récepteurs β_1 -ARs présents dans les cellules musculaires lisses (avec une localisation intracellulaire périnucléaire préférentielle) (Briones et coll., 2005). Dans ce travail, les auteurs présentent des résultats écartant la participation de récepteurs β_2 -ARs ou β_3 -ARs. Ainsi, sur des microartères mésentériques précontractées à la phényléphrine, bien que le salbutamol (agoniste β_2 -AR), le BRL 37344 (agoniste β_3 -AR) et le CGP 12177A (agoniste du récepteur β_1 -AR de faible affinité) entraînent une vasodilatation ceux-ci sont respectivement 144, 100 et 263 fois moins puissants que l'isoprénaline. Le CL 316 243 n'entraîne pas de relaxation. Sur des artères précontractées à la sérotonine ou par un analogue du thromboxane A₂, l'isoprénaline provoque une relaxation concentration-dépendante, alors que le salbutamol, le BRL 37344, le CGP 12177A et le CL 316 243, n'y parviennent pas. De plus, les propriétés vasodilatatrices du BRL 37344 et du SR 59230A pourraient être en rapport avec un effet antagoniste compétitif α_1 -AR (Briones et coll., 2005).

Chez les souris transgéniques, β_1 -KO, β_2 -KO et β_1/β_2 -KO, la vasodilatation β -AR a été évaluée dans plusieurs artères de résistance de différents lits vasculaires (fémoral, épigastrique, mésentérique) (Chruscinski et coll., 2001). Dans ces différents vaisseaux, l'isoprénaline a eu un effet vasodilatateur uniquement dans les artères mésentériques et sans doute par le biais d'une stimulation β_1 -AR. En effet, chez les animaux β_1 -KO, cet effet vasodilatateur est totalement aboli. Cependant, en vidéomicroscopie, il a été montré que le nébivolol (antagoniste β_1 -AR avec des propriétés agonistes β_3 -ARs) entraîne une relaxation dose dépendante de microartères de résistance coronaires de souris précontractées par du PGF₂ α . Cette vasodilatation est inhibée par les antagonistes des NO synthases. De plus, elle n'est pas altérée en présence de nadolol (antagoniste β_1/β_2 -AR), mais est complètement

inhibée par le bupranolol (antagoniste $\beta_1/\beta_2/\beta_3$ -AR). De plus, le nébivolol n'entraîne pas de vasodilatation de ces mêmes microartères coronaires issues de souris déficientes en gène codant pour le récepteur β_3 -AR (Dessy et coll., 2005).

Dans des microartères coronaires humaines, il a été mis en évidence la présence du transcrite codant pour le récepteur β_3 -AR et la protéine. Sur des vaisseaux précontractés par de l'endothéline-1, le BRL 37344 et le nébivolol, produisent une vasodilatation confirmant la présence d'un récepteur β_3 -AR fonctionnel. Cette relaxation n'est pas affectée par un prétraitement par le nadolol (éliminant par-là même une implication des récepteurs β_1 - et /ou β_2 -ARs) mais est complètement inhibée par le bupranolol (Dessy et coll., 2004; Dessy et coll., 2005).

4. La circulation pulmonaire

La circulation pulmonaire diffère de la circulation systémique par de nombreux aspects, le plus remarquable étant l'existence d'une vasoconstriction pulmonaire secondaire à l'hypoxie. Les mécanismes sous-jacents à cette vasoconstriction-hypoxique sont loin d'être parfaitement connus. Les effets vasodilatateurs de trois agonistes β_3 -ARs sélectifs sur la vasoconstriction hypoxique ont été évalués dans un modèle de poumons de rat, isolés et perfusés (Dumas et coll., 1998). Les trois agonistes β_3 -ARs ont entraîné une vasodilatation concentration-dépendante. Le SR 59230A (antagoniste β_3 -AR) a inhibé l'effet vasodilatateur du SR 59104A mais pas celui du SR 59119A et du SR 58611A, comme cela est le cas du propranolol. En se basant sur ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse de la présence d'un récepteur β -AR atypique dans la circulation pulmonaire de rat. Dans la même espèce, sur des artères intralobaires isolées précontractées avec de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, l'isoprénaline entraîne une vasodilatation qui n'est pas totalement inhibée en présence de nadolol. Cependant la relaxation résiduelle persiste même en présence de SR 59230A. De plus, le BRL 37344, le SR 58611A et le CGP 12177 n'induisent pas de vasodilatation, suggérant l'absence de récepteur β_3 -AR dans ce lit vasculaire (Pourageaud et coll., 2005). Néanmoins, en fonction de la taille des vaisseaux, les sous-types de récepteurs β -ARs pourraient être très différents comme cela est suggéré par le fait que la relaxation β -AR est principalement NO-dépendante dans les grosses artères pulmonaires, alors qu'elle est largement NO-indépendante, dans les artères de plus petit calibre (Priest et coll., 1997).

Dans des anneaux d'artères pulmonaires de chien précontractés à la phényléphrine, le CL 316 243 et le BRL 37344 sont capables d'induire une vasorelaxation, mais avec une

moindre puissance que l'isoprénaline et le salbutamol, suggérant ainsi la présence de récepteurs β_3 -ARs dans ce lit vasculaire (Tagaya et coll., 1999).

5. Le système veineux

Sur des segments de veine porte de rat, le BRL 37344 inhibe les contractions induites électriquement, d'une manière concentration-dépendante. Cette inhibition n'est pas levée par un prétraitement au propranolol des préparations. De plus, il semble, selon ces auteurs, que le BRL 37344 inhibe la transmission adrénérgique dans ces vaisseaux par le biais d'un récepteur β -AR atypique préjonctionnel, autre que le récepteur β_3 -AR (Youssif et Oriowo, 2002).

Dans les veines digitées de cheval, plusieurs agonistes β_3 -ARs (SR 58611A, ZD 2079 et ZM 215001) sont capables d'induire une relaxation endothélium-dépendante. La relaxation induite par le SR 58611A n'est pas modifiée par le nadolol, mais elle est réduite de manière significative en présence de ZM 215001 (2 μ M), utilisé comme un antagoniste β_3 -AR. De même, la désendothélialisation et le prétraitement par les inhibiteurs des NO synthases inhibent cette relaxation, suggérant une localisation endothéliale et une voie de signalisation dépendante du NO (Mallem et coll., 2003). Le rôle du récepteur β_3 -AR dans ce lit vasculaire reste à préciser.

6. Corps caverneux

Dans le corps caverneux humain, des récepteurs β_3 -ARs ont été localisés essentiellement au niveau des muscles lisses. Leur activation par le BRL 37344 entraîne une relaxation de bandelettes longitudinales de corps caverneux. Cette relaxation est inhibée de façon sélective par le SR 59230A (Cirino et coll., 2003). Le récepteur β_3 -AR pourrait donc être impliqué dans les phénomènes vasculaires de l'érection et constituer une cible thérapeutique.

7. Voies de signalisations au niveau vasculaire

Peu de travaux ont tenté de déterminer avec précision les voies de signalisations impliquées dans l'activation du récepteur β_3 -AR. Comme nous l'avons vu, la localisation cellulaire du récepteur β_3 -AR varie en fonction du lit vasculaire considéré, de la taille du vaisseau et de l'espèce. Dans l'aorte thoracique de rat, les récepteurs β_3 -ARs sont principalement situés dans les cellules endothéliales, ils agissent de concert avec les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs pour induire une vasodilatation par le biais d'une activation de la voie du NO et l'augmentation consécutive de GMPc (Figure 9) (Trochu et coll., 1999). Dans le même modèle, Rautureau et coll., ont démontré que les effets induits par la stimulation du récepteur β_3 -AR, à la différence

de ce qui se passe au niveau cardiaque, étaient indépendants de l'activation de protéines G sensible à la toxine pertussique (Rautureau et coll., 2002). Dans ce lit vasculaire, la vasodilatation β_3 -AR implique l'activation de plusieurs canaux potassiques (Figure 9). Le prétraitement des anneaux aortiques par l'iberiotoxine, le glibenclamide, la tolbutamide ou la 4-aminopyridine, diminue de façon significative la relaxation β_3 -AR-dépendante. Ces résultats indiquent donc, que la vasodilatation β_3 -AR résulte respectivement de l'activation des canaux potassiques dépendants du calcium de grande conductance (B_{Kca}), ATP-dépendant (K_{ATP}) et voltage-dépendant (K_v) (Figure 9). Cependant, l'inhibition n'est pas complète dans chaque condition expérimentale, ce qui tend à démontrer la participation de plusieurs classes de canaux pour obtenir un effet global. La participation des canaux potassiques dans les effets relaxants des agonistes β_3 -AR a également été rapportée dans les préparations de poumons isolés-perfusés de rat. Les agonistes β_3 -ARs induisent la vasodilatation pulmonaire en partie par l'activation des canaux potassiques dépendants du calcium de grande (B_{Kca}) ou de petite (S_{Kca}) conductance et la synthèse de NO (Dumas et coll., 1999). Dans la veine porte de rat, l'activation des récepteurs β_3 -ARs stimule les canaux calciques de type L, *via* la stimulation par une protéine G_s de la voie AMPc/PKA responsable de la phosphorylation de ces canaux (Viard et coll., 2000). Cependant, il faut remarquer que dans cette étude, aucun agoniste β_3 -AR préférentiel n'a été testé, seulement le CGP 12177A qui associe des propriétés agonistes pour le récepteur β_3 -AR et le récepteur β_1 -AR de faible affinité.

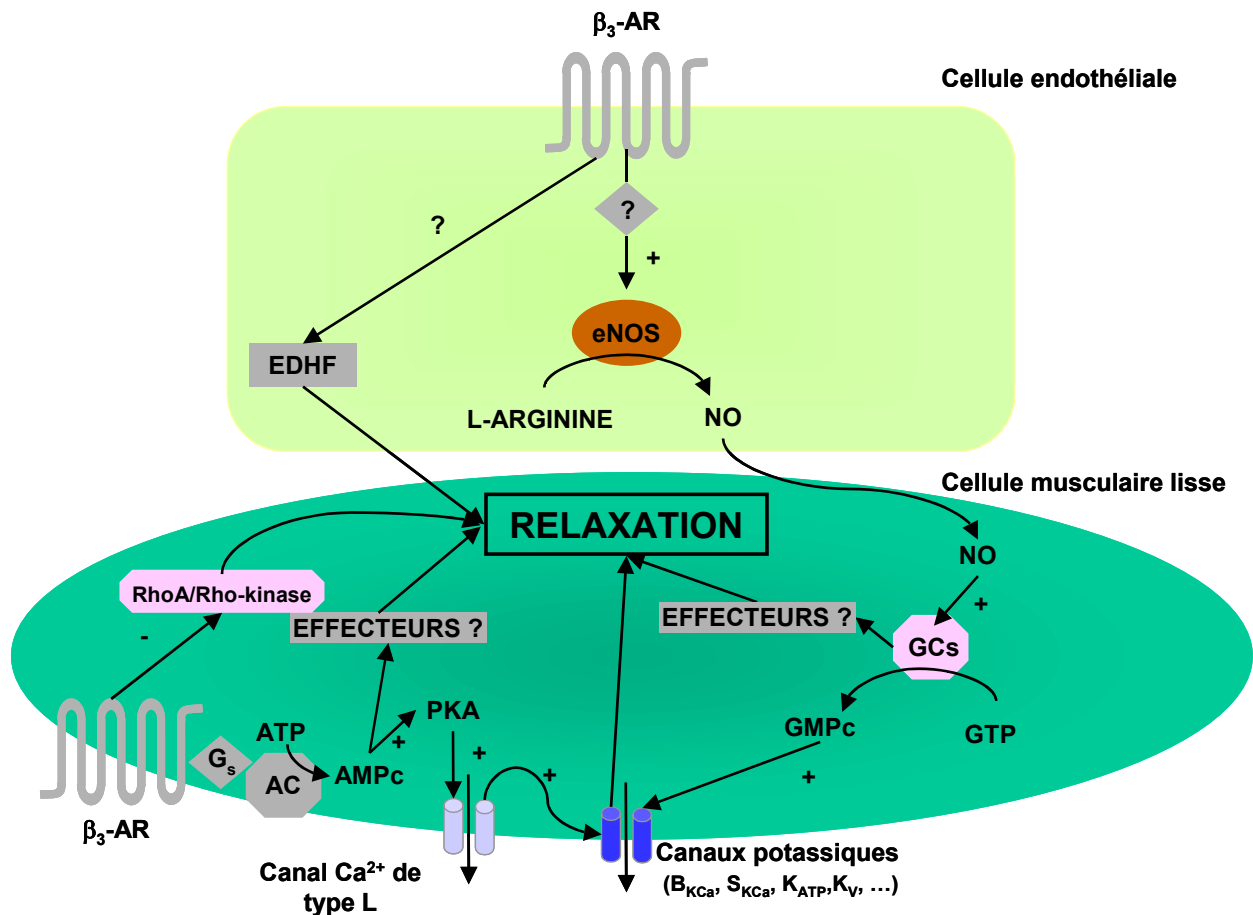


Figure 9 : Principales voies de signalisation du récepteur β_3 -AR au niveau vasculaire. EDHF : endothelial-derived hyperpolarising factor ; eNOS : NO synthase endothéliale ; NO : monoxyde d'azote ; GCs : guanylate cyclase soluble ; GTP : guanosine triphosphate ; GMPCc : guanosine monophosphate cyclique ; B_{KCa} : canaux potassiques dépendants du calcium de grande conductance ; S_{KCa} : canaux potassiques dépendants du calcium de petite conductance ; K_{ATP} : canaux potassiques ATP-dépendant ; K_V : canaux potassiques voltage-dépendant ; PKA : protéine kinase dépendant de l'AMPc ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; AC : adénylate cyclase ; G_s : protéine G_s ; + : activation ; ? : éléments à clarifier.

La voie de signalisation de l'AMPc serait également impliquée dans la signalisation β_3 -AR dans l'artère pulmonaire de chien. Dans ce vaisseau, l'effet vasodilatateur du CL 316 243 est endothélium-indépendant et entraîne une augmentation de l'AMPc dans les cellules musculaires lisses (Tamaoki et coll., 1998).

Dans des microcoronaires humaines précontractées par du KCl (ce qui prévient l'hyperpolarisation), la relaxation induite par le BRL 37344 est diminuée, et totalement inhibée par un inhibiteur des NO synthases (Dessy et coll., 2004). La relaxation NO-indépendante est totalement inhibée par les inhibiteurs des canaux potassiques dépendant du

calcium, l'apamine et la charybdotoxine. Cette observation serait en faveur d'une réponse de type EDHF, d'autant plus que la mesure du potentiel de membrane confirme cette hyperpolarisation secondaire à la stimulation β_3 -AR. Dans les artères placentaires humaines, le SR 59119A est responsable d'une vasodilatation endothélium-indépendante secondaire à une élévation des concentrations intracellulaires d'AMPc sans modification des taux de GMPc (Rouget et coll., 2005)

Dans les corps caverneux humains, la relaxation β_3 -AR est dépendante du GMPc mais indépendante du NO. Par ailleurs, l'activité du récepteur β_3 -AR est liée à l'inhibition de la voie Rho/Rho kinase (Cirino et coll., 2003)

E. Implication des récepteurs β_3 -adrénergiques dans les pathologies cardiovasculaires

1. L'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque chez l'homme est caractérisée par une forte activation du système nerveux sympathique. Les taux de catécholamines très élevés permettent à court terme de maintenir la performance cardiaque, en augmentant la contractilité et la fréquence. Initialement bénéfique, ce tonus adrénergique soutenu peut à long terme être délétère pour le myocarde.

Dans tous les modèles étudiés, l'expression des récepteurs β_3 -ARs est augmentée, dans le cœur humain (Moniotte et coll., 2001) aussi bien que dans les cardiomyocytes issus de chien insuffisant cardiaque (Morimoto et coll., 2004). Cependant, les changements dans la réponse contractile ne sont pas strictement parallèles aux modifications du niveau d'expression du récepteur β_3 -AR. Chez l'homme, l'effet inotrope négatif induit par le BRL 37344 est diminué dans le myocarde provenant de patients insuffisants cardiaques par rapport aux prélèvements pratiqués sur des cœurs sains (Moniotte et coll., 2001) (Figure 10). Dans les modèles animaux, l'augmentation d'expression du récepteur β_3 -AR est corrélée avec une augmentation de l'effet inotrope négatif induit par les agonistes β_3 -ARs (Cheng et coll., 2001; Morimoto et coll., 2004; Zhang et coll., 2005a). Ces différences peuvent s'expliquer par la variabilité interspèce de la réponse β_3 -AR, par les degrés divers d'insuffisance cardiaque, et par la prise de différents traitements chez le patient insuffisant cardiaque. Dans le modèle d'insuffisance cardiaque développé chez le rat où ce phénomène est étudié, la mortalité est de 40 à 48% durant la période étudiée (4 mois), sans précision concernant la gravité de l'insuffisance cardiaque développée (Zhang et coll., 2005a). Ce taux est supérieur à ce que

l'on retrouve dans une population de patients insuffisants cardiaques. De plus, dans les modèles de rat et de chien, les auteurs examinent un cardiomyocyte isolé, issu de cœur défaillant après traitement par isoprénaline chez le rat (Zhang et coll., 2005a) ou par tachycardie-entraînée chez le chien (Morimoto et coll., 2004). Au contraire, Moniotte et coll., font une évaluation sur des muscles papillaires ventriculaires obtenus chez des patients présentant une insuffisance cardiaque ischémique ou dilatée (Moniotte et coll., 2001). D'un point de vue fonctionnel, dans un modèle d'insuffisance cardiaque ischémique chez le rat, une équipe a mis en évidence le renforcement du contrôle par le récepteur β_3 -AR d'un courant activé par l'hyperpolarisation (I_f) qui est fortement augmentée dans le cas de l'insuffisance cardiaque ischémique (Sartiani et coll., 2006). Il est également important de noter que l'insuffisance cardiaque est caractérisée par une altération de la vasomotricité conduisant à une altération de la vasodilatation et à une vasoconstriction inadaptée. Ces effets sont dus à l'activation des systèmes neurohumoraux et à une dysfonction endothéliale. Il est donc capital de prendre en compte le rôle des cellules endothéliales dans la réponse cardiaque.

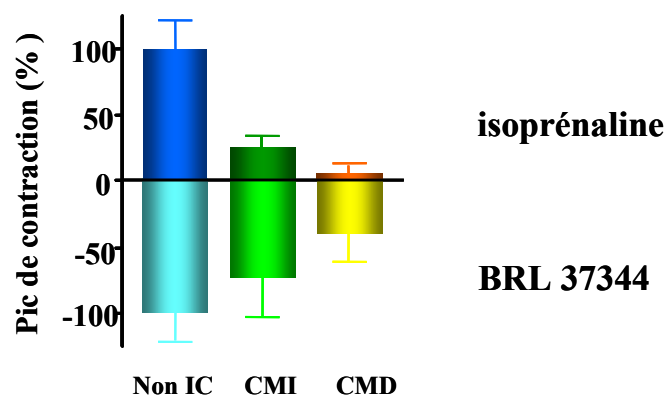


Figure 10 : Atténuation des réponses inotropiques à l'isoprénaline, un agoniste non sélectif des récepteurs β -adrénergiques, et au BRL 37344, un agoniste préférentiel des récepteurs β_3 -adrénergiques dans l'insuffisance cardiaque. Non IC : non insuffisant cardiaque, CMI : cardiomyopathies ischémiques, CMD : cardiomyopathies dilatées (d'après Moniotte et al., 2001).

La comparaison de l'expression des différents sous-types de récepteurs β -ARs, a montré que dans le cas de l'insuffisance cardiaque, il y a une augmentation relative de l'expression des récepteurs β_2 -ARs en raison d'une diminution importante de l'expression des récepteurs β_1 -ARs, sans modification de la densité globale des récepteurs β_2 -ARs. Dans ce contexte, l'importance des récepteurs β_3 -ARs dans le développement de l'insuffisance cardiaque s'appuie sur plusieurs arguments : (i) les récepteurs β_3 -ARs sont couplés aux

protéines $G_{i/0}$ dont l'expression est augmentée durant l'insuffisance cardiaque (El-Armouche et coll., 2003) ; (ii) le récepteur β_3 -AR est relativement résistant à la désensibilisation secondaire à l'activation par un agoniste (Strosberg, 1997) ; (iii) le récepteur β_3 -AR est également résistant au phénomène de désensibilisation hétérologue en raison de l'absence de séquences consensus nécessaire à la phosphorylation par la PKA et la kinase des récepteurs β -AR (β -ARK : β -adrenergic receptor kinase) (Strosberg, 1997) ; (iv) le récepteur β_3 -AR est activé par des concentrations de catécholamines plus élevées que pour les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs (Pietri-Rouxel et Strosberg, 1995) et enfin (v) l'expression du récepteur β_3 -AR au niveau cardiaque est augmentée à la phase terminale de la maladie (Moniotte et coll., 2001). Par conséquent, au cours de l'insuffisance cardiaque, pathologie au cours de laquelle le tonus sympathique est fortement augmenté, il est vraisemblable que la réponse β_3 -AR soit préservée alors que les réponses β_1 - et β_2 -ARs sont diminuées (Moniotte et Balligand, 2002). La régulation de la contractilité myocardique par les catécholamines au cours de l'insuffisance cardiaque, repose donc sur des modifications compensatoires entre les récepteurs β_1 -/ β_2 -ARs et les récepteurs β_3 -ARs. Plusieurs études ont également rapporté des modifications similaires des récepteurs β -ARs mais en dehors de l'insuffisance cardiaque. Kohout et coll., ont mis en évidence un niveau d'expression plus faible des récepteurs β_1 -ARs chez des souris transgéniques surexprimant le récepteur β_3 -AR humain (Kohout et coll., 2001). Inversement, chez les souris dont le gène codant pour le récepteur β_3 -AR a été invalidé, une augmentation des taux d'ARN messager des récepteurs β_1 -ARs est observée dans le tissu adipeux blanc et brun (Susulic et coll., 1995). Récemment, il a été démontré une augmentation de l'expression et des effets des récepteurs β_3 -ARs dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés exposés de manière prolongée à la noradrénaline, alors que l'expression des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs était diminuée (Germack et Dickenson, 2006).

Les changements opposés d'abondance des récepteurs β_1 -ARs par rapport aux récepteurs β_3 -ARs (augmentation par un facteur de 2 à 3) au cours de l'insuffisance cardiaque, avec le déséquilibre entre leurs effets sur la contractilité, pourraient être à l'origine de la dégradation de la fonction cardiaque. Cependant, à un stade plus précoce de la maladie, l'augmentation d'expression du récepteur β_3 -AR pourrait être considérée comme un mécanisme compensatoire, limitant les lésions cardiomyocytaires. Chez les souris surexprimant le récepteur β_3 -AR humain, les études histologiques ne rapportent pas d'hypertrophie cardiomyocytaire, ni de développement de fibrose (Tavernier et coll., 2003), suggérant que l'activation du récepteur β_3 -AR ne serait pas à l'origine de lésions cardiomyocytaires. *A contrario*, Engelhardt et coll. ont montré que la stimulation β_1 -AR

prolongée est responsable d'une hypertrophie, d'une fibrose interstitielle et d'une insuffisance cardiaque chez les souris surexprimant le récepteur β_1 -AR (Engelhardt et coll., 2002). Il semble donc que la surexpression du récepteur β_3 -AR protège des altérations induites par les taux élevés de catécholamines au stade initial de la pathologie. Les effets protecteurs de la stimulation β_3 -AR pourraient résulter de (i) la diminution de l'activation des canaux calciques de type L et donc de la surcharge calcique, (ii) d'une meilleure fonction diastolique due à l'augmentation de production de NO, (iii) du maintien des stocks énergétiques (ATP et créatine phosphate) et enfin (iv) de l'effet vasodilatateur (la vasorelaxation artériolaire et veineuse en diminuant respectivement post- et pré-charge, améliore le rapport apport d'oxygène/consommation d'oxygène). De la même manière, dans le cœur sain, l'effet inotrope négatif de la stimulation β_3 -AR pourrait jouer le rôle de « soupape de sécurité » lors des activations intenses du système sympathique (stress, effort physique important...). Inversement, au cours de l'évolution de l'insuffisance cardiaque vers ses stades ultimes, l'activation des récepteurs β_3 -ARs pourrait être délétère, en raison de son effet inotrope négatif persistant. Chez le rat insuffisant cardiaque, les agonistes β_3 -ARs aggravent de façon notable la fonction cardiaque et favorisent l'apoptose cardiomyocytaire. Ainsi, si la densité de récepteurs β_3 -ARs est trop élevée, ils pourraient contribuer à la perte de la fonction cardiaque et constituer la base de la dégradation fonctionnelle observée (Kong et coll., 2004). Des expériences utilisant des approches complémentaires (*in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*) sur des modèles animaux appropriés sont donc nécessaires pour préciser le rôle des récepteur β_3 -ARs aux stades précoces et tardifs de l'insuffisance cardiaque.

Les effets potentiellement bénéfiques de la stimulation β_3 -AR ont également été suggérés par des résultats récents concernant l'utilisation de β -bloquants de troisième génération dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Ainsi, bien qu'il ait été prouvé que l'utilisation des β -bloquants augmente la survie des patients insuffisants cardiaques, le mécanisme responsable est mal connu. Ces effets bénéfiques pourraient être en partie liés aux effets vasculaires de ces produits. En effet, les β -bloquants de troisième génération sont caractérisés par des propriétés vasodilatatrices (Toda, 2003) et pourraient être plus efficaces que les β -bloquants dépourvus de cette propriété. L'utilisation de tels produits semble particulièrement appropriée pour améliorer la tolérance chez les patients insuffisants cardiaques âgés qui présentent une réserve vasodilatatrice endothéliale limitée, un remodelage fibreux avec l'âge du nœud sinusal, un risque plus élevé de bradycardie et d'hypotension. Des études récentes concernant ces populations sont particulièrement encourageantes (Flather et coll., 2005). Par ailleurs, les patients avec une hypertrophie ventriculaire gauche semblent être

particulièrement sensibles aux actions bénéfiques du NO sur la fonction diastolique (Matter et coll., 1999). Des essais chez des patients avec une dysfonction ventriculaire ont montré une amélioration plus importante des paramètres de fonction diastolique associée à une meilleure tolérance à l'effort, lors de l'administration de nébivolol comparativement aux β -bloquants des générations précédentes (Nodari et coll., 2003). Tous les β -bloquants susceptibles d'induire la production de NO et de chélater les radicaux libres possèdent potentiellement des atouts supplémentaires comme la capacité d'inhiber l'apoptose, la nécrose et/ou la prolifération de cellules myocardiques. De plus, certains de ces β -bloquants, comme le bucindolol et le nébivolol, ont été décrits comme étant des agonistes β_3 -ARs potentiels, avec des propriétés vasodilatatrices endothélium-dépendantes (Gosgnach et coll., 2001; De Groot et coll., 2003). Un essai clinique (BEST) évaluant l'intérêt du bucindolol dans le traitement de l'insuffisance cardiaque à un stade avancé n'a pas permis de trouver un effet bénéfique sur la survie globale et a été abandonné (Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial Investigators, 2001). Cependant, il est difficile de tirer des conclusions définitives sur l'absence de bénéfice de l'utilisation du bucindolol dans l'insuffisance cardiaque. En effet, dans cet essai la population étudiée présentait des différences notamment en terme de critère d'exclusion (concernant l'âge, la pression artérielle et la fréquence cardiaque) et de sélection raciale, par rapports aux autres études concluant à l'intérêt de l'utilisation des bêta-bloquants dans l'insuffisance cardiaque (CIBIS-II, COPERNICUS et MERIT-HF). En tenant compte de ces critères afin d'obtenir un sous-groupe dans l'étude BEST comparable aux populations des 3 autres essais, une étude conclue à une réduction significative de la mortalité chez les patients traités par bucindolol (Domanski et coll., 2003).

2. Hypertension artérielle systémique

L'hypertension résulte essentiellement d'un déséquilibre entre des mécanismes vasodilatateurs et vasoconstricteurs, en partie en rapport avec des anomalies du système nerveux sympathique au niveau pré- et post-synaptique (De Champlain, 2001). Il est reconnu qu'au cours de l'hypertension artérielle systémique, il existe une diminution de la réponse β -AR chez l'homme (Michel et coll., 1990) et dans différents modèles animaux (Feldman, 1987; Michel et coll., 1990; Doggrell et Surman, 1995). Les principaux éléments connus de cette dysfonction sont : la diminution d'expression des récepteurs β -ARs, la diminution des protéines G et des anomalies de couplage β -AR-protéine G-effecteurs (Werstiuk et Lee, 2000). Cependant, certaines études ont rapporté que la relaxation β -AR de l'aorte thoracique de rat et d'artères mésentériques de rats hypertendus n'était pas modifiée (Borkowski et coll.,

1992; Boonen et coll., 1993) voire augmentée (Carvalho et coll., 1987) par rapport aux rats normotendus. Il y a plusieurs explications à ces résultats contradictoires concernant la vasorelaxation β -AR au cours de l'hypertension artérielle. Ainsi, la relaxation β -AR va dépendre : (i) du niveau d'hypertension (Borkowski et coll., 1992), (ii) de l'agent utilisé pour précontracter les vaisseaux (Konishi et Su, 1993; Carvalho et coll., 1987) et (iii) du niveau de précontraction (Konishi et Su, 1993; Carvalho et coll., 1987). Il est important de remarquer que dans toutes ces études, la relaxation β -AR était étudiée en utilisant l'isoprénaline, un agoniste β -AR non spécifique et que la participation de chaque sous-type de récepteurs β -ARs à cette vasodilatation n'était pas évaluée. Il existe peu de données concernant le rôle potentiel du récepteur β_3 -AR vasculaire dans l'hypertension. Dans un modèle d'hypertension périméphritique chez le chien, il a été établi que la stimulation β_3 -AR avait un effet bénéfique (Donckier et coll., 2001). En effet, chez ces animaux hypertendus, le SR 58611A est responsable d'une diminution de la pression artérielle supérieure à celle observée chez les animaux normotendus. Chez les chiens hypertendus uniquement, de la contractilité myocardique est augmentée en présence de cet agoniste β_3 -AR. Chez des rats spontanément hypertendus âgés de 12 semaines, l'expression du récepteur β_3 -AR est augmentée mais n'est pas corrélée à une augmentation de la vasodilatation induite par les agonistes β_3 -ARs (Mallem et coll., 2004).

Concernant la place des β -bloquants dans le traitement de l'hypertension, le nébivolol, qui présente des propriétés agonistes β_3 -ARs, semble être un des β -bloquants les plus prometteurs pour la prise en charge de l'hypertension modérée (Czuriga et coll., 2003). De plus, seul le nébivolol avec ses propriétés NO-dépendantes, a pu démontrer un effet bénéfique sur la dysfonction endothéliale (Thuillez et Richard, 2005).

Une mutation ponctuelle du gène β_3 -AR, correspondant à la substitution du tryptophane par une arginine en position 64 (mutation W64R) a été décrite (Walston et coll., 1995; Widen et coll., 1995; Clement et coll., 1995). Cette mutation naturelle est en fait un polymorphisme qui est associé à plusieurs états morbides : (i) insulino-résistance (Widen et coll., 1995) à la fois chez l'adulte (Clement et coll., 1995; Kurabayashi et coll., 1996; Mitchell et coll., 1998) et l'enfant (Endo et coll., 2000) ; (ii) hyperinsulinisme (Xiang et coll., 1998), (iii) une augmentation de la tendance à la prise de poids (Clement et coll., 1995) ; (iv) une augmentation des taux de lipoprotéines de haute densité (Thomas et coll., 2000) et (v) une augmentation de la glycémie (Corella et coll., 20001). Ce polymorphisme a également été associé au développement de l'hypertension artérielle systémique (Tableau 1) (Tonolo et coll., 1999; Ringel et coll., 2000; Hao et coll., 2004). Une étude clinique menée dans une large

population du sud de l'Italie, a permis de mettre en évidence une association entre le polymorphisme W64R, la prise de poids abdominale et une élévation de pression artérielle (Strazzullo et coll., 2001). Dans un essai randomisé, en double aveugle, contre placebo, une équipe a comparé l'effet de l'administration de noradrénaline chez 8 patients normotendus non diabétiques présentant le polymorphisme W64R avec 8 patients ne présentant pas ce polymorphisme. Le polymorphisme semble conférer une plus grande sensibilité en terme d'élévation de la pression artérielle à la phényléphrine (Melis et coll., 2002). Ce polymorphisme semble donc faciliter la survenue d'une hypertension en cas d'élévation du tonus adrénergique. Néanmoins, il faut prendre beaucoup de précaution concernant l'association du polymorphisme d'un seul gène et d'une pathologie multifactorielle comme l'hypertension artérielle. Il faut notamment prendre en compte les éléments environnementaux et d'éventuels polymorphismes associés synergiques, qui peuvent expliquer des résultats contradictoires. L'hypertension est un désordre génétique complexe secondaire aux interactions entre plusieurs gènes (hérédité dans environ 30% des cas) et des facteurs environnementaux. La plupart des études sur la génétique de l'hypertension utilisent l'approche du gène candidat et les deux conclusions les plus souvent faites sont: (i) qu'il n'y a pas d'association avec le gène considéré, ou (ii) que le phénotype associé à l'hypertension est hétérogène et que l'association de certains polymorphismes avec des sous-groupes de patients hypertendus ne peut être faite en raison d'un bruit de fond important. Il semble bien que cette dernière conclusion corresponde le mieux à la réalité (Agarwal et coll., 2005).

Pour illustrer ces considérations, dans le cas de la pré-éclampsie, certains auteurs estiment qu'il n'y a pas de lien entre le polymorphisme W64R du récepteur β_3 -AR et cette pathologie (Malina et coll., 2004), alors qu'une autre équipe évoque un lien complexe, tenant compte d'autres éléments environnementaux ou génétiques (Zhang et coll., 2005b). Enfin *in vitro*, il a été décrit une altération de la réponse vasculaire β_3 -AR chez des femmes présentant une pré-éclampsie au cours de leur grossesse (Rouget et coll., 2005).

Population	Nombre de sujets / détails sur la population	Association	Commentaires	Références
Caucasienne (Hongrie)	147 enfants sains / 295 enfants obèses	Oui	Bien que la prévalence du polymorphisme soit similaire chez les enfants, il semble y avoir une association avec la prise de poids et une élévation des taux d'insuline	Erhardt et coll., 2005
Japonaise	160 hommes non obèses normotendus	Oui	Augmentation de la pression artérielle après 5 ans	Masuo et coll., 2005
Européenne	121 adolescents normotendus, 54 adolescents hypertendus	Non	Le polymorphisme pourrait favoriser la prise de poids	Porto et coll., 2004
Japonaise	1685 issus de la cohorte de la Funagata Diabetes Study	Non	Le génotype Arg/Arg est associé avec l'obésité et le diabète de type II	Oizumi et coll., 2001
Caucasienne (Espagne)	87 hypertendus	Non	Polymorphisme associé avec une modification de la composition lipidique des membranes et du contre-transport Na/Li érythrocytaire	Pamies-Andreu et coll., 2000
Caucasienne (Allemagne)	417 diabétiques de type II	Oui chez les hommes	Pas d'association avec des complications vasculaires	Ringel et coll., 2000
Chinoise	802	Non	Aucun lien avec le développement de diabète, d'hypertension, ou de dyslipidémie, mais association avec le développement de l'obésité	Thomas et coll., 2000
Sarde	494	Oui	Association avec des taux de triglycérides élevés	Tonolo et coll., 1999
Japonaise	83 diabétique de type II	Non		Baba et coll., 1998
Caucasienne (Allemagne)	6450	Non	Pas d'association avec l'obésité, le diabète de type II, les dyslipidémies	Buettner et coll., 1998)
Caucasienne (Finlande)	375	Non	Pas d'association avec l'obésité abdominale, l'augmentation d'oxydation des lipides, ni la survenue précoce d'un diabète de type II	Rissanen et coll., 1997
Japonaise	173	Non	Pas d'association avec la sensibilité à l'insuline ou le taux de catécholamine chez les patients hypertendus	Fujisawa et coll., 1997

Tableau 1 : Polymorphisme W64R du récepteur β_3 -ARs et hypertension.

3. Obésité et diabète

L'obésité est devenue dans nos sociétés occidentales un sujet majeur de recherche pour le développement de nouveaux traitements, non seulement pour agir sur l'obésité elle-même,

mais également sur les pathologies qui lui sont associées comme le diabète et les pathologies cardiovasculaires. Parmi les produits étudiés, les agonistes β_3 -ARs font parti des agents qui permettent une augmentation de la dépense énergétique. Par ailleurs, le diabète est une pathologie fréquente avec des complications vasculaires souvent associées comme la microangiopathie et l'athérosclérose. Bien que les mécanismes de la dysfonction vasculaire ne soient pas totalement élucidés, plusieurs études ont suggéré qu'il existe des altérations de la réponse vasculaire aux agents vasoactifs. De plus, des travaux menés chez l'animal (Turner et White, 1996) et chez l'humain (Johnstone et coll., 1993) ont révélé une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante en cas de diabète. Chez le rat diabétique, les effets des agonistes β -ARs sur la pression artérielle diastolique sont abolis (Gallego et coll., 2002). Par ailleurs, il a été montré, comme dans l'insuffisance cardiaque, une diminution de densité des récepteurs β_1 -ARs associée à une augmentation des récepteurs β_3 -ARs dans les cœurs de rats porteurs d'un diabète ancien (Dincer et coll., 2001). Il a été suggéré que l'administration prolongée d'agonistes β_3 -ARs aurait un effet antidiabétique puissant dans des modèles de diabète chez les rongeurs (Arch et Wilson, 1996).

La rétinopathie diabétique est la première cause de cécité chez l'adulte entre 20 et 74 ans (Klein, 1996). Cette complication du diabète implique notamment une prolifération vasculaire anormale. Une dysfonction du système nerveux sympathique au cours du diabète pourrait en partie expliquer ces anomalies. Dans ce contexte, des récepteurs β_3 -ARs ont été mis en évidence dans les cellules endothéliales rétiniennes, leur activation étant responsable d'une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire, qui sont deux éléments fondamentaux dans les phénomènes d'angiogenèse (Steinle et coll., 2003; Steinle et coll., 2005).

La mutation ponctuelle W64R du récepteur β_3 -AR semble favoriser la survenue de l'obésité, de l'insulinorésistance et du diabète de type II (Tableau 1 et Tableau 2). Ce polymorphisme semble être associé à la survenue précoce de diabète de type II (Walston et coll., 1995), de rétinopathie et de néphropathie diabétiques chez des patients japonais porteurs d'un diabète de type II (Sakane et coll., 1997; Sakane et coll., 1998). Plus récemment, il a été montré que la mutation W64R homozygote était associée avec la survenue de diabète (Xiu et coll., 2004).

4. Coronaropathie

La mise en évidence du récepteur β_3 -AR au niveau des microartères coronaires chez l'homme indique son rôle potentiel au cours de la coronaropathie (Dessy et coll., 2004). De plus, le

nébivolol est susceptible d'entraîner un effet pro-angiogénique par le biais de ses propriétés agonistes β_3 -ARs (Dessy et coll., 2005). Cependant, le rôle précis des récepteurs β_3 -ARs dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion n'est pas connu. De même, l'intérêt dans la protection myocardique de la stimulation β_3 -AR reste à déterminer. Néanmoins, il est probable que l'effet vasodilatateur couplé à un effet inotrope négatif, aboutisse à une amélioration du rapport apport/consommation d'oxygène au niveau myocardique.

Les études concernant l'association de la mutation W64R du récepteur β_3 -AR avec la survenue d'une coronaropathie sont encore une fois contradictoires (Tableau 2). Une étude, portant sur une large population de patients bien caractérisés sur le plan phénotypique a montré que la présence de cette mutation ne constituait pas un facteur de risque majeur pour la survenue de lésions coronaires significatives (Stangl et coll., 2001). De même, ce polymorphisme ne serait pas un facteur prédictif d'athérosclérose coronaire, ni d'accidents coronaires dans une population blanche nord américaine (Morrisson et coll., 199). En revanche, si la présence de cette mutation ne constitue pas un facteur prédictif indépendant de coronaropathie, son association avec d'autres facteurs de risque de coronaropathie en fait un marqueur potentiel de la survenue d'atteintes coronariennes dans une population arabe (Abu-Amero et coll., 2005).

Population	Nombre de sujets / détails sur la population	Association	Commentaires	Références
Arabe	495	Pas de lien direct	Association en cas de présence de facteur de risque de coronaropathie	Abu-Amero et coll., 2005
Caucasienne (Allemagne)	1000 patients coronariens 1000 patients sains	non	Pas d'association en fonction du sexe et des facteurs de risque d'athérosclérose	Stangl et coll., 2001
Indo-mauritienne	338 coronariens 148 sujets contrôles	Pas de lien direct	Le polymorphisme est associé avec une modulation des effets des β -bloquants sur les concentrations de triglycérides et de cholestérol	Manraj et coll., 2001
Caucasienne (USA)	271 coronariens 700 sujets contrôles	Non	Le polymorphisme n'est pas un facteur prédictif d'athérosclérose	Morrisson et coll., 1999
Caucasienne (Finlande)	185 coronariens non diabétiques 119 coronariens diabétiques de type II	Non	Pas de liaison significative avec l'insulino-résistance	Pulkkinen et coll., 1999
Japonaise	428	Non		Tamaki et coll., 1999
Chinoise	137 coronariens 188 patients sains	Non	Pas d'association avec le syndrome d'insulino-résistance	Sheu et coll., 1999

Tableau 2 : Polymorphisme W64R du récepteur β_3 -ARs et coronaropathie.

II. Angiogenèse

A. Vasculogenèse-Angiogenèse-Artériogenèse

Le fonctionnement normal d'un tissu dépend d'un apport adéquat de nutriments et d'oxygène. La diffusion de l'oxygène est rapidement limitée au sein d'un tissu (100-200 μm), ce qui rend nécessaire la mise en place d'un réseau vasculaire capable de subvenir à la vie cellulaire. Le développement de vaisseaux dépend de phénomènes indispensables à la croissance et l'homéostasie appelés : vasculogenèse, angiogenèse et artériogenèse (Figure 11).

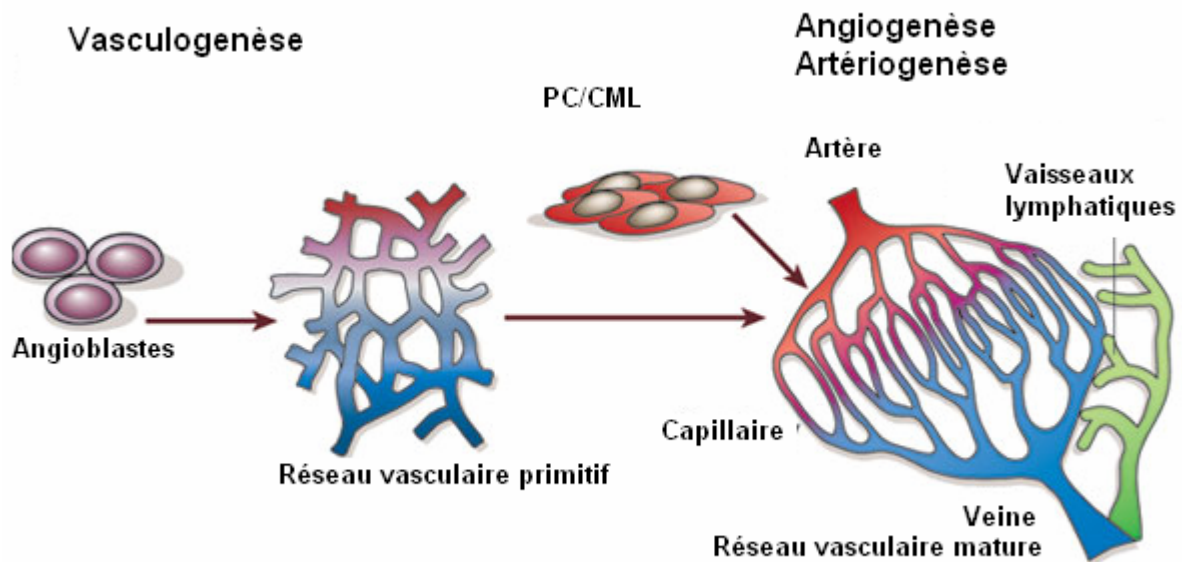


Figure 11 : Formation du réseau vasculaire. Durant la vasculogenèse, des cellules progénitrices vont donner naissance à un réseau vasculaire primitif. Puis au cours de l'angiogenèse, le réseau se développe, les péricytes (PC) et des cellules musculaires lisses (CML) couvrent les canaux endothéliaux et des réseaux vasculaires organisés apparaissent. Les vaisseaux lymphatiques se constituent par transdifférenciation (d'après Carmeliet, 2005).

Au cours de l'embryogenèse, il y a différenciation de cellules mésenchymateuses embryonnaires (précurseurs endothéliaux ou angioblastes) pour former, localement, des tubules de cellules endothéliales qui se réunissent eux-mêmes en plexus vasculaires peu ou pas organisés (Flamme et coll., 1997). Il faut noter que les précurseurs endothéliaux partagent une origine commune avec les cellules progénitrices hématopoïétiques : les hémangioblastes.

Ce lien étroit entre les cellules sanguines et le système vasculaire est très important tout au long de la vie (Carmeliet, 2005). Ensuite, ce réseau primitif va être le siège d'une croissance et d'un remodelage (Carmeliet, 2000). Il s'agit là véritablement d'angiogenèse, alors qu'initialement ce terme était uniquement utilisé pour décrire la croissance de bourgeons endothéliaux à partir de veinules. En parallèle, des précurseurs des cellules musculaires lisses et des péricytes vont au cours d'une phase dite d'artériogenèse, recouvrir les tubes endothéliaux naissant et ainsi stabiliser les vaisseaux (inhibition de la prolifération endothéliale, production de matrice extracellulaire) et permettre la régulation de la perfusion des vaisseaux (Carmeliet, 2005). La dernière étape de la maturation est la spécialisation de la paroi des vaisseaux et de leur réseau suivant le tissu ou l'organe considéré (Jain, 2003). Au cours de cette phase, des phénomènes de régression, de ramification ainsi que de formation de jonctions intercellulaires (homotypiques, hétérotypiques, gap-junction) se produisent.

Longtemps, il a été considéré qu'en période postnatale, seuls des phénomènes d'angiogenèse pouvaient rendre compte de la néovascularisation et que la vasculogenèse était limitée à la vie embryonnaire. Cependant, des cellules progénitrices endothéliales ont été mises en évidence dans la moelle osseuse et le sang périphérique (Carmeliet, 2000). Ces cellules peuvent être recrutées par des sites de néo-angiogenèse (Ashara et coll., 1999). Les cellules endothéliales sont en grande majorité à l'état quiescent mais elles possèdent une capacité de « réactivation » sous l'effet de stimuli divers comme l'inflammation pour les vaisseaux lymphatiques et l'hypoxie pour les vaisseaux sanguins (Carmeliet, 2003). Dans des conditions physiologiques, les vaisseaux adultes sont dans un état quiescent et des phénomènes d'angiogenèse sont uniquement identifiables lors des processus de cicatrisation et au niveau de l'appareil génital féminin (ovulation, cycle menstruel, implantation embryonnaire, grossesse) (Carmeliet, 2005).

B. Régulateurs de l'angiogenèse

La formation de néovaisseaux consiste en une série d'événements régulés au cours du temps:

- Une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité capillaire qui favorisent l'adhésion et la migration, facilitée par un réseau de fibrine, des cellules endothéliales (Van Hinsbergh et coll., 2001) ;
- La stimulation des cellules endothéliales par des facteurs de croissance comme le facteur de croissance endothelial vasculaire (VEGF : vascular endothelial growth factor) (Thomas, 1996) ;
- La dégradation par protéolyse de la membrane basale résultant de la sécrétion et l'activation des métalloprotéinases (MMP) en réponse à des signaux exogènes tels que des cytokines, des facteurs de croissance et des interactions cellule-matrice (Kalebic et coll., 1983) ;
- Migration et prolifération des cellules endothéliales dans la matrice extracellulaire sous l'effet de facteurs de croissance, métalloprotéinases et des intégrines (Cornelius et coll., 1995; Senger et coll., 1996) ;
- Formation et maturation de nouveaux tubes capillaires impliquant la différenciation des cellules musculaires lisses et des péricytes (Doherty et Canfield, 1999) ;
- Remodelage vasculaire par le biais de phénomènes apoptotiques.

L'initiation de la réponse angiogénique est dépendante d'une balance dynamique entre des stimuli endogènes et exogènes (facteurs pro-angiogéniques) et d'inhibiteurs (facteurs anti-angiogéniques) agissant dans l'environnement proche des cellules endothéliales (Tableau 3 et Tableau 4) (Figure 12). Lorsque la balance « penche » du côté pro-angiogénique, le processus d'angiogenèse se déclenche (angiogenic switch des anglosaxons).

Facteurs pro-angiogéniques	Facteurs anti-angiogéniques
VEGF	VEGFR-1 soluble
Fibroblast growth factor (FGF)	Angiostatine
Angiogénine	Endostatine
Angiopoïétine-1	Angiopoïétine-2
Récepteur Tie-2	Facteur 4 plaquettaire
Epidermal growth factor (EGF)	Fragments de la prolactine
Hepatocyte growth factor (HGF)	IL-10, IL-4, IL-12, IL-18
IL-8	TIMP (tissue inhibitor metalloproteinase)
Placenta growth factor (PlGF)	Interférons α , β , γ
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Protamine
Transforming growth factor- β (TGF- β)	TGF- β
Tumor necrosis factor- α (TNF- α)	Trombospondine-1
Activateurs du plasminogène	Thromboxane
NO synthase	Endothéline
Cyclo-oxygénase de type 2	
Bradykinine	
Angiotensine II	

Tableau 3 : Liste non exhaustive de quelques facteurs pro- et anti-angiogéniques (d'après Silvestre et Levy, 2002).

Facteurs pro-angiogéniques		Facteurs anti-angiogéniques	
Facteurs	Activités biologiques	Facteurs	Activités biologiques
Famille des VEGF	Perméabilité ↑, activateurs du plasminogène ↑, collagénase ↑, prolifération CE, apoptose CE ↓, migration CE, angiogenèse in vivo	Angiostatine	Prolifération CE ↓, apoptose CE ↑, migration CE ↓, formation de tubes ↓, angiostatique <i>in vivo</i>
Famille des FGF	Prolifération CE, activateurs du plasminogène ↑, intégrine $\alpha 5\beta 3$ et autres molécules d'adhésion ↑, migration CE, angiogenèse in vivo	Endostatine	Prolifération CE ↓, migration CE ↓ (?), migration CE ↓ (?), inhibition des métalloprotéinases, angiostatique <i>in vivo</i>
Angiopoïétine 1	Bourgeonnement CE, stabilisation vaisseaux	Angiopoïétine-2	Déstabilisation vasculaire par inhibition angiopoïétine-1, apoptose CE ↑
Angiopoïétine 2	Prolifération CE, migration CE, bourgeonnement CE seulement en présence de VEGF	TGF- β	Prolifération CE ↓, migration CE ↓, activateurs du plasminogène ↓, TIMPs ↑, migration CE ↓
PDGF-BB	Prolifération CML et péricytes, stabilisation vaisseaux	TNF- α	Inhibition de la prolifération CE induite par FGF <i>in vitro</i> , apoptose CE ↑
TGF- β	Formation de tubes in vitro (faibles concentrations), angiogenèse in vivo dans un contexte inflammatoire	Chémokines sans le motif ELR	Inhibition de la liaison du FGF et du VEGF avec leurs récepteurs, angiostatique <i>in vivo</i>
TNF- α	Migration CE formation de tubes in vitro, angiogenèse in vivo	Thrombospondine 1 et 2	Migration CE ↓, apoptose CE ↑, angiostatique <i>in vivo</i>
EGF	Prolifération CE, angiogenèse in vivo	Métalloprotéinases	Formation d'angiostatine
CSFs	Prolifération CE, migration CE	PEDF	Migration CE ↓, prolifération CE ↓, angiostatique <i>in vivo</i>
Angiogenin	Prolifération CE		
Angiotropin	Migration CE, formation de tubes, angiogenèse in vivo		
Chémokines avec le motif ELR	Prolifération CE, migration CE, angiogenèse in vivo		
IGF1	Prolifération CE, apoptose CE ↓, induction VEGF, activateurs du plasminogène ↑		
HGF	Migration et prolifération CE et CML, angiogenèse in vivo		
PECAM-1	Agrégation CE, formation de tube, migration CE, stabilisation vaisseaux, essentielle lors angiogenèse par FGF		
Intégrines	Adhésion CE, migration CE, apoptose CE ↓, essentielle lors angiogenèse par FGF		
VE-cadhérine	Stabilisation vaisseaux, apoptose CE ↓, essentielle lors angiogenèse in vivo		
Métalloprotéinases	Dégradation matrice extracellulaire		
Erythropoïétine	Prolifération CE, angiogenèse in vivo		

Tableau 4 : Les principales fonctions des facteurs pro et anti-angiogéniques. CE : cellule endothéliale ; CML : cellule musculaire lisse ; CSF : colony stimulating factor ; IGF : insulin like growth factor ; HGF : hepatocyte growth factor, PDGF : platelet derived growth factor ; PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule ; PEDF pigment epithelial derived factor. (d'après Distler et coll., 2003)

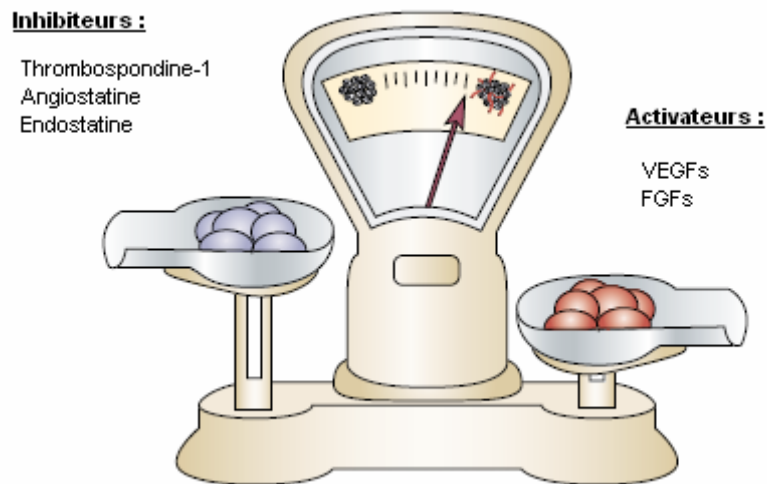


Figure 12 : La balance angiogénique (d'après Bergers et Benjamin, 2003)

1. Les métalloprotéinases

Ces métalloprotéinases agissent non seulement pour libérer de l'espace pour les cellules endothéliales migrantes mais aussi pour libérer des facteurs de croissance (VEGF, FGF).

Il existe plus de 25 protéines appartenant à la famille des métalloprotéinases, qui ont des domaines fonctionnels et des mécanismes de régulation en commun (Bellon et coll., 2004) (Figure 13). Ce sont des endopeptidases dépendantes du zinc qui sont actives à un pH neutre (Vu et Werb, 2000). Selon leur structure et leur substrat, les métalloprotéinases sont divisées en plusieurs sous-groupes : les collagénases (actives sur le collagène sous forme fibrillaire), les gélatinases (actives sur les collagènes dénaturés), les stromélysines (actives sur les composants autres que le collagène des matrices extracellulaires), les métalloélastases, la matrylysine et les métalloprotéinases de type membranaire (Bellon et coll., 2004).

Classiquement les métalloprotéinases sont constituées de plusieurs domaines (Figure) :

- un pré-domaine correspondant à un peptide signal pour la sécrétion
- un pro-peptide dont le clivage permet l'activation de la métalloprotéase par protéolyse
- un domaine catalytique contenant un ion zinc
- un domaine hemopexine-like carboxyterminal, contenant le site de fixation pour les TIMPs (Tissue Inhibitors MétalloProtéinases)

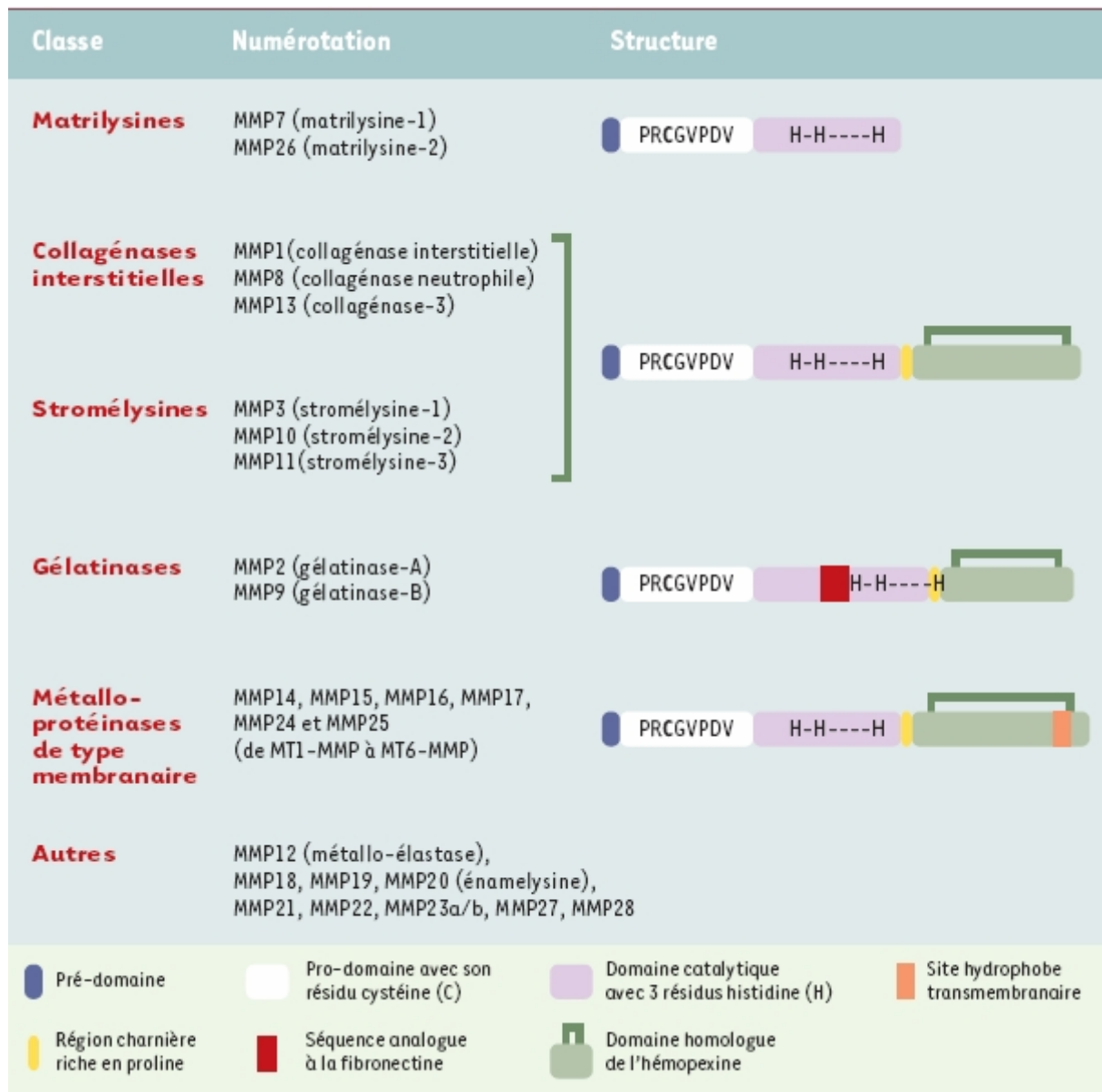


Figure 13 : Structure et classification des métalloprotéinases. Elles sont groupées en six classes en fonction de leur structure. Chaque métalloprotéinase est dénommée par un numéro ou par un nom descriptif en rapport avec ces différentes classes (d'après .

Les métalloprotéinases sont impliquées dans divers processus physiologiques et pathologiques comme le remodelage des tissus, la morphogenèse, la polyarthrite rhumatoïde, les ostéoarthrites, la cicatrisation, l'athérosclérose, la croissance tumorale, l'angiogenèse (Nelson et coll., 2000).

L'activité des métalloprotéinases est contrôlée de trois manières :

- la régulation transcriptionnelle et la stabilisation de leur ARN messager par les facteurs de croissance, les cytokines (Bond et coll., 1998) ;

- le clivage par protéolyse de leur prodomaine ;
- la régulation par les TIMPs (Brew et coll., 2000).

2. Les facteurs pro-angiogéniques

Il existe plusieurs dizaines de facteurs pro-angiogéniques (Tableau 3). Les trois principaux groupes de facteurs pro-angiogéniques sont les VEGF, les FGF et les angiopoïétines. En raison de son rôle crucial tant dans l'angiogenèse physiologique et pathologique, nous allons nous focaliser sur une des principales familles de facteurs pro-angiogéniques : les VEGF (Ferrara, 2004).

(a) Structure et régulation de l'expression du VEGF

Le VEGF est une glycoprotéine, sécrétée sous forme dimérique d'environ 40 kDa. La famille des VEGF comporte 5 membres : VEGF-A, B, C, D, E. Le VEGF-A possède 4 isoformes dont la plus abondante est l'isoforme VEGF₁₆₅ qui est composée de 165 acides aminés (Figure 14). La capacité de liaison à l'héparine et à la matrice extracellulaire permettent de déterminer la capacité de diffusion du VEGF. C'est une propriété biologique importante du VEGF variable selon l'isoforme considérée. L'isoforme VEGF₁₆₅ possède des capacités de diffusion intermédiaire, elle peut être sécrétée, mais une partie non négligeable reste liée aux cellules endothéliales et à la matrice extracellulaire (Grunstein et coll., 2000). En plus de ces 5 facteurs de croissance, le PlGF est un facteur de croissance très proche de la famille des VEGF qui active le récepteur R1 du VEGF (Luttun et coll., 2002).

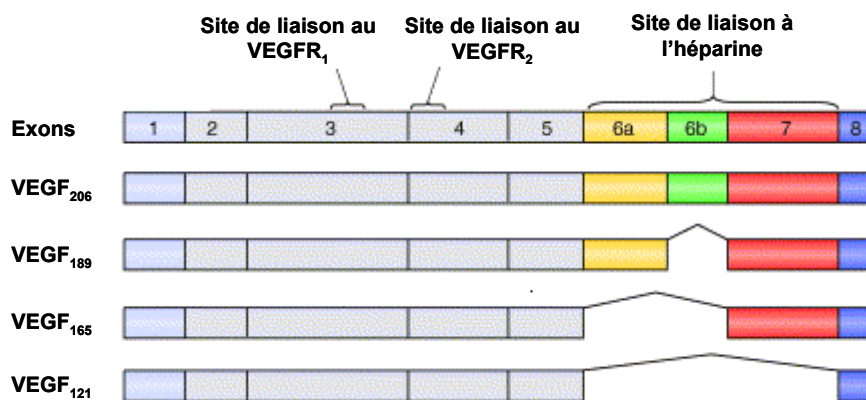


Figure 14 : Structure des isoformes du VEGF-A (d'après Crosset coll., 2003).

La distribution du VEGF-A dans l'organisme est très large. Il est possible de l'isoler dans les cardiomyocytes, la glande pituitaire, le rein, le foie et l'ovaire (Ferrara, 2004). Le VEGF-A est aussi exprimé par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les monocytes/macrophages, les fibroblastes, les chondrocytes, les adipocytes, et plusieurs autres cellules (Ferrara, 2004).

L'expression du VEGF est régulée par de très nombreux facteurs, notamment des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones. Plusieurs facteurs de croissance augmentent l'expression du VEGF comme l'EGF, le TGF- α , le TGF- β , l'IGF-I, le FGF et le PDGF (Ferrara, 2004). Parmi les cytokines, l'IL-1 β et l'IL-6, augmentent la production de VEGF (Ferrara, 2004) alors que l'IL-13 et l'IL-10 l'inhibent (Matsumoto et coll., 1997). Enfin, certaines hormones, telles que la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) et l'ACTH (AdrenoCorticoTropin Hormone) peuvent augmenter l'expression du VEGF (Ferrara et coll., 2004). Cependant, il convient de souligner le rôle majeur de l'hypoxie dans la régulation de la production du VEGF (Shweiki et coll., 1992). L'hypoxie va induire la transcription de l'ARN messenger du VEGF par la fixation de HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) sur un site du promoteur du VEGF (Levy et coll., 1995).

(b) Fonctions du VEGF

Le VEGF a des effets bien connus sur la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Ferrara, 2004). Mais ces effets s'accompagnent d'autres actions qui *in fine* favorisent l'effet pro-angiogénique.

Le VEGF augmente la survie des cellules endothéliales par son action anti-apoptotique (Gerber et coll., 1998). Il augmente la perméabilité vasculaire (il était initialement désigné comme étant le VPF, vascular permeability factor) (Dvorak et coll., 1995). Cet effet est essentiellement NO-dépendant (Parenti et coll., 1998) et implique la NO synthase endothéliale (Fukumura et coll., 2001). Au niveau de la coagulation, il module l'activité fibrinolytique des cellules endothéliales (Prager et coll., 2004). Par ailleurs, le VEGF induit une vasodilatation endothélium-dépendante (Wei et coll., 2004). L'injection chez le rat est responsable d'une hypotension, d'une tachycardie et d'une baisse du débit cardiaque (Yang et coll., 1996). Ces effets sont attribués à une vasodilatation NO-dépendante, prédominante au niveau veineux (Yang et coll., 1996). Enfin, le VEGF permet une mobilisation des cellules progénitrices endothéliales vers les sites d'angiogenèse (Ashara et coll., 1999).

D'autres cellules peuvent être la cible du VEGF, il a été décrit notamment un effet neuroprotecteur du VEGF, en particulier sur les neurones dopaminergiques impliqués dans la maladie de Parkinson (Yasuhara et coll., 2005).

(c) Voies de signalisation du VEGF

Le VEGF exerce ses différentes fonctions par le biais de récepteurs appartenant à la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK). La famille des récepteurs au VEGF comprend 3 membres : (i) VEGFR1 ou Flt-1, (ii) VEGFR2 ou KDR/Flk-1 et (iii) VEGFR3 ou Flt-4. Le VEGFR2 est le récepteur responsable de la majeure partie des effets physiologiques et physiopathologiques du VEGF. Il régule en effet la prolifération, la différenciation et la migration des cellules endothéliales mais aussi la perméabilité vasculaire et la vasodilatation. Le rôle de VEGFR1 est sujet à de nombreuses controverses et les effets observés après son activation semblent varier suivant le type cellulaire et le stade de développement (Ferrara, 2004). Le VEGFR3 a un rôle essentiel dans le développement des vaisseaux lymphatiques (Olsson et coll., 2006).

Ces protéines possèdent un domaine extracellulaire de sept sous-unités présentant des analogies avec les chaînes d'immunoglobuline et responsable de la liaison des ligands, un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique portant l'activité tyrosine kinase. La liaison de VEGF à ces récepteurs provoque la dimérisation de ces derniers, ce qui déclenche l'activité catalytique et conduit ainsi à la phosphorylation de résidus tyrosine présents sur le récepteur lui-même et sur les substrats cytoplasmiques (Cèbe-Suarez et coll., 2006).

Après dimérisation et auto-phosphorylation de différents sites du récepteur VEGFR2, de multiples voies de signalisation sont activées (Figure 15).

- *Le VEGFR2 active la PLC γ (PhosphoLipase C γ) et la PI3K.*

La PLC γ se lie au résidu Tyr1175 phosphorylé et active la cascade MAPK/ERK1/2 et la prolifération des cellules endothéliales (Takahashi et coll., 2001). La PLC γ active la PKC (Protein Kinase C) par le biais de la formation de diacylglycérol et l'augmentation de calcium intracellulaire. En outre, le même résidu Tyr1175 est responsable de l'activation de PI3K induite par le VEGF (Dayanir et coll., 2001). La sérine/thréonine kinase AKT/PKB est ensuite activée par la PI3K et favorise la survie des cellules endothéliales (Fujio et Walsh, 1999). AKT/PKB régule l'activité de la production de NO par phosphorylation et l'activation de la NO synthase endothéliale. Le VEGF est responsable de l'activation de Ras qui est couplée à un phénotype angiogénique des cellules endothéliales (Meadows et coll., 2001).

- *Facteurs impliqués dans la migration cellulaire*

Le site de phosphorylation Tyr951 est un site de liaison et d'activation de la protéine VRAP (VEGF receptor associated protein encore appelée TSAAd pour T-cell-specific adaptor), qui régule la migration des cellules endothéliales (Matsumoto et coll., 2005). La phosphorylation du résidu Tyr1212 du VEGFR est impliquée dans la réorganisation du réseau d'actine par le biais de l'activation de la MAPK p38 (Lamalice et coll., 2005). De plus, l'activation de la MAPK p38 entraîne la phosphorylation de la HSP27, une molécule qui favorise la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par le VEGF et la migration (Rousseau et coll., 1997). Par ailleurs, des molécules comme FAK et son substrat, la paxilline, sont impliquées dans le « turnover » des complexes d'adhérence durant la migration cellulaire (Le Bœuf et coll., 2004). La mobilité cellulaire est aussi régulée par une molécule partenaire du VEGFR2, IQGAP1, qui se lie et active Rac1 par inhibition de son activité intrinsèque GTPasique (Yamaoka-Tojo., 2004).

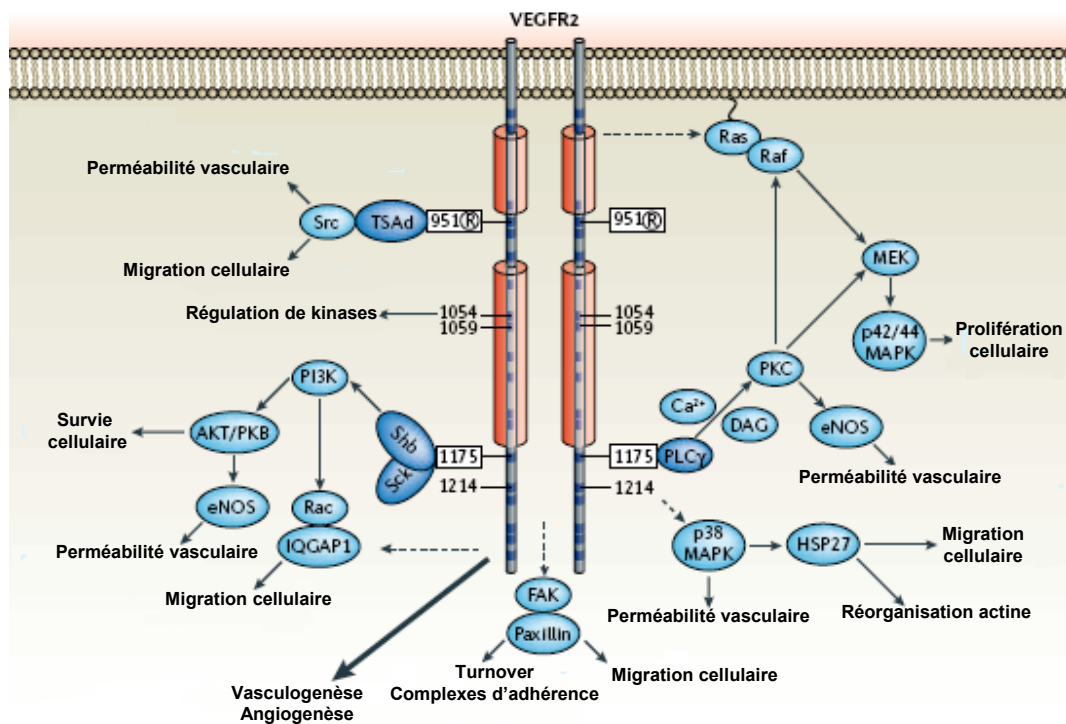


Figure 15 : Sites de phosphorylation du VEGFR2 et principales voies de signalisation. DAG : diacylglycerol ; eNOS : NO synthase endothéliale ; FAK : focal adhesion kinase; HSP2 : heat-shock protein-27; IQGAP1 : IQ motif containing GTPase activating protein 1 ; MAPK : mitogen-activated protein kinase; MEK : kinase de MAPK et de ERK; PI3K : phosphatidylinositol 3' kinase; PKC : protein kinase C; PLC γ : phospholipase C- γ ; Shb, SH2 and β -cells; TSAd, T-cell-specific adaptor (d'après Olsson et coll., 2006)

3. Facteurs anti-angiogéniques

Tout comme pour les facteurs pro-angiogéniques, plusieurs dizaines de facteurs anti-angiogéniques ont été décrits dans la littérature. Ils sont divisés en 4 groupes : les interférons, les fragments protéolytiques, les interleukines et les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases.

(a) Les interférons

Ces glycoprotéines ont été initialement caractérisées par leur effet anti-viral. Il en existe trois classes : α , β et γ . Ces protéines exercent des effets inhibiteurs directs et/ou indirects de l'angiogenèse. L'interféron- α , par exemple, est capable d'inhiber la mobilité cellulaire (Brouty-Boye et Zetter, 1980) mais également l'expression du VEGF (Wu et coll., 2005).

(b) Les interleukines

Actuellement plus d'une trentaine d'interleukines ont été identifiées. Ce sont des protéines sécrétées par les leucocytes (cytokines) qui sont responsables d'actions très nombreuses et variées : prolifération, activation et différenciation cellulaire notamment.

Certaines de ces interleukines sont dotées d'activité anti-angiogénique. Par exemple, l'IL-12, en diminuant l'expression de facteurs pro-angiogéniques (FGF, VEGF) et en augmentant la sécrétion de facteurs anti-angiogéniques (interféron γ), diminue la densité du réseau vasculaire (Duda et coll., 2000).

Il est à noter que les propriétés anti- ou pro-angiogéniques d'une cytokine sont liées respectivement à l'absence ou la présence d'un résidu de 3 acides aminés (un motif Glutamine-Leucine-Arginine, ELR) situé à la partie N-terminale de la cytokine (Strieter et coll., 2005). A titre d'exemple, l'IL-8 qui présente ce résidu a des propriétés pro-angiogéniques, alors que l'IL-4 qui ne possède pas de séquence ELR à la partie N-terminale inhibe l'angiogenèse.

(c) Fragments protéolytiques

De nombreux agents anti-angiogéniques sont en fait des fragments protéolytiques de certaines protéines. Ces fragments sont généralement issus de protéines constitutives de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine ou d'enzymes comme le plasminogène. Les 2 inhibiteurs de l'angiogenèse les plus connus de ce groupe sont l'angiostatine et l'endostatine.

- Angiostatine

L'angiostatine est un facteur circulant anti-angiogénique dérivé du plasminogène (qui ne possède pas de propriété anti-angiogénique lui-même). Plusieurs métalloprotéinases en dégradant le plasminogène sont capables de générer de l'angiostatine : MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12 (Cornelius et coll., 1998; O'Reilley et coll., 1999; Pozzi et coll., 2000). Les métalloprotéinases sont donc au centre d'un système de régulation complexe : elles favorisent la migration cellulaire par la dégradation de la matrice extracellulaire, mais dans le même temps par la génération d'angiostatine, elles produisent un effet angiostatique. L'angiostatine bloque la prolifération, la migration, la différenciation des cellules endothéliales ainsi que la formation de tubes endothéliaux (Claesson-Welsh et coll, 1998). Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés. L'angiostatine pourrait inhiber les ATPases

situées à la surface cellulaire et limiter l'apport énergétique nécessaire à la prolifération des cellules endothéliales (Moser et coll., 1999). Elle pourrait également agir par le biais d'une liaison à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (facteur pro-angiogénique) et perturber cette voie de signalisation de l'angiogenèse (Tarui et coll., 2001).

- Endostatine

L'endostatine est un autre exemple d'agent angiostatique obtenu par digestion enzymatique d'un précurseur dépourvu d'effet sur l'angiogenèse. L'élastase et la cathepsine L, mais pas les métalloprotéinases, sont capables de générer de l'endostatine par digestion du collagène XVIII (Felbor et coll., 2000). L'endostatine bloque la prolifération et la migration des cellules endothéliales, tout en activant les voies de l'apoptose (Boehm et coll., 1997). De plus, elle inhibe l'angiogenèse induite par le FGF et le VEGF (Yamaguchi et coll., 1999).

(d) Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases

Pour inhiber la croissance d'un vaisseau sanguin, il est important d'agir sur la croissance cellulaire et la migration, mais l'inhibition de la protéolyse des constituants de la matrice extracellulaire est également un objectif clé (Distler et coll., 2003). Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) jouent donc un rôle important dans l'inhibition du remodelage de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, certains TIMPs présentent des propriétés indépendantes de leurs effets sur les métalloprotéinases et notamment sur la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Lambert et coll., 2004).

(e) Autres molécules angiostatiques

Plusieurs autres facteurs anti-angiogéniques ont été décrits (Tableau 3). Parmi ceux-ci, il faut citer les thrombospondines 1 et 2 (Iruela-Arispe, 2004). Ces glycoprotéines exercent un effet angiostatique endogène. En se liant à son récepteur, le CD36, elles modulent l'adhésion, la migration et la prolifération des cellules endothéliales et activent des voies pro-apoptotiques.

4. Le NO : un facteur angiogénique

Il est maintenant bien établi que le NO joue un rôle majeur dans l'angiogenèse. Il s'agit d'un facteur de survie cellulaire inhibant l'apoptose (Dimmeler et coll., 1999a; Rossig et coll., 1999) et augmentant la prolifération des cellules endothéliales (Ziche et coll., 1997). De plus, le NO augmente les phénomènes de migration cellulaire (Ziche et coll., 1994; Murohara et coll., 1998a), que certains auteurs ont décrit sous le terme de « podokinesis » (Noiri et coll., 1998). Le NO augmente également les interactions matrice extracellulaire-cellules

endothéliales en induisant l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Murohara et coll., 1998a). Il faut souligner que l'effet vasodilatateur du NO peut jouer un rôle dans son action angiogénique. L'augmentation du flux sanguin et des forces de cisaillement (shear stress) au niveau de la microcirculation pourrait être à l'origine d'une augmentation de la prolifération cellulaire (Hudlicka, 1998). Le NO augmente la dégradation de la matrice extracellulaire par augmentation d'expression dépendante du bFGF d'activateurs du plasminogène de type urokinase (Ziche et coll., 1997).

La régulation de la croissance capillaire est complexe en raison des effets à la fois angiogéniques et angiostatiques du NO (Lau et Ma, 1996 ; RayChaudhury et coll., 1996, Ziche et coll., 1994). Il a été récemment démontré que sur des cellules endothéliales microvasculaires gastriques, de faibles concentrations de NO induisent la formation de tubes capillaires et la migration cellulaire par l'activation de la PKC, et de la phosphorylation de ERK et de c-Jun, alors que de fortes concentrations de NO inhibent cette réponse angiogénique (Jones et coll., 2004).

Le NO joue également un rôle important dans les voies de signalisations sous-jacentes à la prolifération des cellules endothéliales induites par le VEGF. Cependant, la place exacte du NO dans cette voie de signalisation (en amont ou en aval) est sujet à controverse (Milkiewicz et coll., 2006). Le VEGF induit l'expression de la NO synthase endothéliale et la production de NO par l'activation de la cascade des MAPK (Papapetropoulos et coll., 1997 ; Parenti et coll., 1998). L'inhibition de la NO synthase par le L-NAME inhibe l'angiogénèse induite par le VEGF (Ziche et coll., 1997). Chez les souris déficientes en NO synthase endothéliale, la réponse angiogénique lors d'une ischémie du membre postérieur est altérée (révélant par la même le rôle prépondérant de cette isoforme de NO synthase). L'administration de VEGF ne permet pas d'améliorer la perfusion (Murohara et coll., 1998b). La NO synthase endothéliale est également impliquée dans les phénomènes de recrutement des cellules progénitrices endothéliales (Yu et coll., 2005). Parallèlement, il y a de plus en plus de preuves que le NO augmente l'expression du VEGF (Dulak et coll., 2000; Zhang et coll., 2003). Selon les études le NO augmente ou diminue la production de VEGF par modulation de l'expression de HIF-1. Des auteurs rapportent que le NO est responsable d'une suppression de la production de VEGF dépendante de l'hypoxie dans les cellules musculaires lisses par diminution des capacités de liaison de HIF à l'ADN (Huang et coll., 1999; Sogawa et coll., 1998), alors que d'autres équipes décrivent une augmentation de cette capacité dans les cellules musculaires lisses de rat (Dulak et coll., 2000).

C. Rôle des catécholamines dans l'angiogenèse

Bien que des taux élevés de catécholamines soient retrouvés dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (insuffisance cardiaque, hypertension artérielle) et que bon nombre de leurs traitements ont pour cibles les récepteurs adrénergiques, les effets des catécholamines sur l'angiogenèse sont relativement mal connus.

De nombreuses études ont été menées concernant le remodelage vasculaire en particulier dans le cadre de l'athérosclérose ou de la resténose. La stimulation des récepteurs α_1 -ARs exerce une activité équivalente à un facteur de croissance sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Blaes et Boisel, 1983; Chen et coll., 1995) et sur les fibroblastes de la paroi vasculaire (Faber et coll., 2001). Cet effet est indépendant des phénomènes hémodynamiques rencontrés au cours des études *in vivo* et où le remodelage de la paroi vasculaire peut être associé aux effets hémodynamiques des agonistes et antagonistes utilisés (Erami et coll., 2002). Cet effet sur les cellules musculaires lisses et les fibroblastes semble dépendant de la production de radicaux libres (Bleeke et coll., 2004). En effet, la stimulation α_1 -AR sur les cellules musculaires lisses entraîne la production NADPH-oxydase dépendante de radicaux libres, la sécrétion d'HB-EGF (heparin binding epidermal growth factor-like growth factor), la transactivation des récepteurs à l'EGF et la stimulation de ERK1/2 (Bleeke et coll., 2004; Zhang et coll., 2004). De plus, l'inhibition des récepteurs α_1 -ARs est responsable d'une diminution de la synthèse de l'ADN de l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses (van Kleef et coll., 1992) et d'une inhibition des phénomènes d'athérosclérose (Makaristis et coll., 1998). L'inhibition des autres sous-types de récepteurs ARs (α_2 et β -AR) ne modifie pas cette réponse (Erami et coll., 2002; Zhang et Faber, 2001). Il a également été rapporté que les catécholamines *via* l'activation de récepteurs β -AR, pouvaient moduler la croissance des cellules musculaires lisses par le biais d'un mécanisme endothélium-dépendant (Damon, 2000).

Dans la littérature, quelques études suggèrent un rôle potentiel des catécholamines sur les phénomènes d'angiogenèse. Dans un travail mené sur un modèle d'ischémie du membre postérieur chez des souris transgéniques dont le gène codant pour la dopamine- β -hydroxylase (enzyme nécessaire à la synthèse des catécholamines) est invalidé (Souris DBH-/-), Chalothorn et coll. mettent en évidence l'implication des catécholamines dans le remodelage de la circulation collatérale mais aussi dans l'angiogenèse induite par l'ischémie (Chalothorn et coll., 2005). En effet, si l'étude des flux sanguins cutanés ne leur permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les souris transgéniques et leurs contrôles, l'étude

histologique révèle que l'augmentation de densité capillaire du membre ischémique est inhibée chez les souris DBH^{-/-}. Les modifications observées ne semblent pas être en rapport avec les conditions hémodynamiques systémiques qui sont similaires chez les 2 souches d'animaux. En revanche, l'augmentation des taux de dopamine (qui possède un effet anti-angiogénique (Chakroborty et coll., 2004), secondaire à l'inhibition de la dopamine- β -hydroxylase, peut être en partie responsable de ce défaut d'angiogénèse.

Chez des patients atteints de cancer de la prostate, le traitement par α_1 -bloqueur (prescrit pour ses effets sur le syndrome obstructif vésical) est responsable d'une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales ainsi que d'une diminution de la vascularisation de la lésion (Keledjian et coll., 2001). Cet effet anti-angiogénique des antagonistes α_1 -ARs dérivés de la quinazoline a été confirmé par ces mêmes auteurs. En présence de ces agents, ils ont mis en évidence dans des cellules endothéliales humaines une diminution de l'adhérence et de la migration cellulaire, ainsi qu'une inhibition des effets pro-angiogéniques du VEGF et du FGF (Keledjian et coll., 2005). Cependant, ces résultats sont à considérer avec prudence. En effet, au niveau endothélial, il est classiquement admis que les récepteurs α -ARs prépondérants sont de type α_2 (Guimaraes et Moura, 2001). De plus, l'utilisation des antagonistes α_1 -ARs peut être responsable d'un effet pro-angiogénique indirect par augmentation des forces de cisaillement (van Gieson et Skalak, 2001).

Une équipe a récemment démontré que les récepteurs β_2 -ARs étaient impliqués dans la régulation de la néoangiogénèse en réponse à une ischémie chronique chez le rat (Iaccarino et coll., 2005). Dans ce modèle d'ischémie du membre postérieur, les auteurs ont démontré l'effet bénéfique sur le flux sanguin de l'expression du récepteur β_2 -AR humain (par transfert adénoviral de gène) au niveau de l'endothélium de l'artère fémorale. Les analyses histologiques ont confirmé l'augmentation de la densité capillaire. L'étude, *in vitro*, des voies de signalisation a révélé que le récepteur β_2 -AR régule la prolifération des cellules endothéliales par activation directe de la voie de ERK mais aussi par l'induction de la sécrétion de VEGF. Dans ce travail, il est également fait état des actions à la fois pro- et anti-apoptotiques de la stimulation β_2 -AR sur les cellules endothéliales. Ce résultat permet d'expliquer les effets apparemment opposés sur la survie cellulaire dépendants de l'intensité et de la durée de la stimulation adrénergique (Iaccarino et coll., 2005).

Quelques travaux rapportent un rôle potentiel du récepteur β_3 -AR dans l'angiogénèse. Dans des cellules endothéliales rétiniennes humaines, Steinle et coll., ont montré qu'un agoniste β_3 -AR était capable de stimuler la prolifération et la migration (Steinle et coll.,

2003). Le nébivolol, un β -bloquant qui possède des propriétés agonistes β_3 -AR, augmente la réponse angiogénique sur des anneaux d'aorte de souris placés dans un gel de collagène (Dessy et coll., 2005). Cet effet est dépendant de la présence des récepteurs β_3 -ARs et des NO synthases endothéliales. En effet, l'action pro-angiogénique de ce produit est abolie sur les anneaux d'aorte d'animaux transgéniques déficients en récepteur β_3 -AR ou en NO synthase endothéliale.

Indirectement, le système adrénergique peut agir sur la réponse angiogénique suivant un mode de sécrétion paracrine. En effet, il est maintenant établi que sous l'effet des catécholamines, un certain nombre de types cellulaires est capable de sécréter des agents modulant la réponse angiogénique. Au niveau cardiaque, la noradrénaline augmente l'expression du VEGF par les cardiomyocytes par le biais d'un mécanisme paracrine, probablement en favorisant la sécrétion de TGF- β par des cellules non-myocytaires (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisse) (Weil et coll., 2003). Ces données sont en accord avec une étude qui montre qu'en l'absence de gène codant pour le VEGF dans les cardiomyocytes, la densité de microvaisseaux est diminuée (Giordano et coll., 2001). L'interleukine-18, une molécule anti-angiogénique peut également être sécrétée par les cardiomyocytes et les cellules endothéliales cardiaques par le biais d'une stimulation β_2 -AR (Chandrasekar, 2004). Il a également été démontré que l'activité du système sympathique régulait l'expression du VEGF dans la graisse brune (Tonello et coll., 1999). La noradrénaline peut augmenter de manière dose- et temps-dépendants le niveau d'expression de ce facteur de croissance. Il a été souligné, le rôle important des récepteurs β_3 -ARs (Frederiksson et coll., 2000). Les macrophages sous l'effet d'agonistes β_2 -ARs sont susceptibles de sécréter du VEGF qui pourrait également être responsable de phénomènes angiogéniques (Verhoeckx et coll., 2006).

D. Angiogenèse : implications pathologiques et thérapeutiques

Des anomalies de l'angiogenèse ont été décrites dans plus de 70 pathologies différentes, et la liste ne cesse de s'allonger (Carmeliet, 2005). Dans de nombreuses maladies, les stimuli responsables de l'activation des phénomènes d'angiogenèse s'avèrent excessifs et la balance angiogénique « penche » vers les facteurs pro-angiogéniques entraînant le déclenchement de cascades signalétiques. Ces anomalies ont été largement décrites dans le cancer, de nombreuses pathologies oculaires et dans les phénomènes inflammatoires mais également dans plusieurs autres processus morbides : obésité, asthme, diabète, cirrhose, endométriose, SIDA, infections bactériennes et les pathologies auto-immunes (Tableau 5)

Organe	Pathologies
Tous	Cancer et métastases, pathologies infectieuses (bactérie, HIV), pathologies autoimmunes (sclérodémie, maladie de Sjögren)
Vaisseaux	Malformations vasculaires (hémangiomes, lymphangiomes), athérosclérose, artériopathie post-transplantation
Tissu adipeux	Obésité
Peau	Psoriasis, dermite allergique, cicatrices chéloïdes, sarcome de Kaposi
Yeux	Rétinopathies (diabétique, prématurés), dégénérescence maculaire
Poumon	Hypertension artérielle pulmonaire primitive, asthme, polypes nasaux, rhinites, mucoviscidose
Tube digestif	Pathologies inflammatoires (colite) , cirrhose, ascites
Appareil génital	Endométriose, métrorragies, pathologies ovariennes (kystes)
Os-articulation	Arthrite, ostéomyélite, formation ostéophyte,
Rein	Néphropathie diabétique

Tableau 5 : Exemples de pathologies associées à un excès d'angiogenèse. (d'après Carmeliet, 2003)

Inversement, l'angiogenèse est insuffisante dans d'autres pathologies, notamment la cardiopathie ischémique ou la pré-éclampsie, qui se caractérisent par des dysfonctions endothéliales, des malformations ou involutions vasculaires, des défauts de revascularisation ou de régénération (Tableau 6).

Organe	Pathologies
Système nerveux	Maladie d'Alzheimer, accidents vasculaires cérébraux, neuropathie diabétique, sclérose latérale amyotrophique
Vaisseaux	Diabète, hypertension, athérosclérose, resténose, lymphoedème
Tube digestif	Maladie de Crohn, ulcère gastrique
Peau	Alopécie, lupus, télangiectasies
Appareil génital	Pré-éclampsie
Poumon	Fibrose pulmonaire, syndrome de détresse respiratoire néonatal
Rein	Néphropathies (liées à l'âge, syndrome métabolique), glomérulosclérose
Os	Ostéoporose, défaut de cicatrisation et de consolidation de fractures
Cœur	Cardiopathie ischémique, insuffisance cardiaque

Tableau 6 : Exemples de pathologies associées à un défaut d'angiogènes. (d'après Carmeliet, 2003)

Depuis près d'une dizaine d'années, de nombreuses équipes ont étudié la possibilité de développer des stratégies thérapeutiques permettant d'augmenter la vascularisation dans les tissus ischémiques ou, au contraire, d'inhiber l'angiogénèse au cours du cancer, et de certaines pathologies oculaires, ostéo-articulaires et cutanées.

Actuellement, les traitements anti-angiogéniques sont utilisés en clinique, il s'agit essentiellement d'inhibiteurs de la voie du VEGF. Leurs indications sont reconnues pour le traitement du cancer et de la dégénérescence maculaire dégénérative (Ferrara et Kerbel, 2005). Néanmoins, d'autres recherches, tant sur le plan expérimental que clinique, sont en cours d'une part pour connaître l'intérêt d'inhibiteurs d'autres voies de signalisation et d'autre part pour optimiser ces traitements. En effet, il apparaît que des traitements « combinés » (association d'agents anti-angiogéniques et d'agents anti-mitotiques) permettent d'obtenir de meilleurs résultats (Gasparini et coll., 2005). Encore faut-il mettre en évidence les meilleures associations suivant le type de tumeur et la séquence d'administration des traitements (Ferrara et Kerbel, 2005). Il ne faut pas perdre de vue les effets secondaires potentiels de ces traitements qui s'expliquent pour la plupart par le déséquilibre de la balance angiogénique créé : thrombose, hypertension artérielle, décompensation d'une pathologie ischémique sous-jacente.

La possibilité que des traitements pharmacologiques des pathologies ischémiques soient un jour disponibles est particulièrement attrayante, dans la mesure où il n'existe pas actuellement d'alternative aux procédures de revascularisation interventionnelles ou

chirurgicales. De nombreux facteurs pro-angiogéniques ont été testés avec succès dans des modèles animaux (Ferrara et Alitalo, 1999). Sur les bases de ces données pré-cliniques, plusieurs facteurs angiogéniques (VEGF-A, VEGF-C, FGF-1, FGF-2, FGF-4) ont été testés chez des patients porteurs de cardiopathie ischémique ou d'artériopathie des membres inférieurs (Simons, 2005). Bien que les premiers résultats obtenus lors d'essais préliminaires semblaient prometteurs, aucune étude clinique rigoureuse n'a permis d'obtenir de résultats convaincants (Lederman et coll., 2002; Henry et coll., 2003). Une explication possible tient au fait que la réponse pro-angiogénique peut être satisfaisante chez un animal jeune et sain alors qu'un individu porteur d'athérosclérose étendue est réfractaire aux facteurs pro-angiogéniques (Lederman et coll., 2002; Henry et coll., 2003). Récemment, il a été montré que l'utilisation de régulateurs clefs situés en amont de la réponse angiogénique (comme HIF), est plus efficace que l'utilisation d'un seul facteur angiogénique (Heinl-Green et coll., 2005). L'administration de facteurs de croissance peut-être à l'origine d'effets secondaires. L'hypotension est le plus fréquent, en particulier avec le VEGF et dans une moindre mesure avec le FGF (Simons et Ware, 2003). L'administration de VEGF induit la constitution d'un œdème. Il existe en théorie un risque de constitution ou d'aggravation des pathologies associées à une angiogenèse en particulier au niveau oculaire. Il n'y a pas, pour le moment, de preuve d'un tel effet indésirable (Simons, 2005). De même, l'administration de facteurs de croissance doit faire impérativement rechercher chez un patient l'existence d'un cancer, au risque de voir la croissance de ce dernier s'accélérer. Cependant, il n'a pas été rapporté d'apparition de néoplasie *de novo*.

La transplantation de cellules d'origine médullaire ou de sang périphérique, pour le traitement des pathologies ischémiques, constitue une alternative qui suscite actuellement beaucoup d'intérêts (Rafii et Lyden, 2003). Dans une étude préliminaire, 22 patients, porteurs d'une artériopathie sévère des membres inférieurs, ont bénéficié de l'injection intramusculaire de cellules autologues mononuclées d'origine médullaire (Tateishi-Yuyama et coll., 2002). Ce traitement a permis d'améliorer de façon notable la situation clinique de ces patients en augmentant la perfusion des membres inférieurs. Des essais cliniques de transplantation cellulaire ont également montré une amélioration de la perfusion myocardique (Henry et coll., 2003). Des essais doivent être menés avec de plus grands effectifs de patients, randomisés contre placebo, afin de confirmer cette tendance à plus long terme.

III. Le choc septique

A. Définitions et épidémiologie

Du grec Σήψις (putréfaction), le sepsis se définit comme la réaction systémique d'un hôte à une infection par des germes pathogènes. En 1879-80, Louis Pasteur a montré, pour la première fois, la présence de bactéries dans le sang de patientes atteintes de fièvre puerpérale. Depuis lors, le sepsis est associé à la présence de bactéries dans le flux sanguin (bactériémie) et les termes sepsis et septicémie sont souvent confondus en clinique. Il a fallu attendre les dernières décennies pour voir apparaître des définitions précises de ce tableau clinique. En 1989, Bone et coll. ont établi une définition simple du syndrome septique, basée sur des symptômes cliniques spécifiques et incluant l'existence d'un foyer infectieux connu (Bone et coll., 1989). Les signes cliniques du sepsis sont, cependant, retrouvés chez des patients pour qui une bactériémie n'est pas mise en évidence, comme chez ceux présentant une pancréatite aiguë (Goris et coll., 1985) ou encore des traumatismes sévères (Nuytinck et coll., 1988). Ces discordances ont été prises en compte dans une conférence de consensus en 1992 (Society of Critical Care Medicine and the American College of Chest Physicians). Au cours de cette conférence, il a été établi que le terme de « SIRS » (Systemic Inflammatory Response Syndrome, ou syndrome de réponse inflammatoire systémique) désignerait ces circonstances où l'infection bactérienne n'est pas avérée (pancréatites, grands brûlés, traumatisme sévère) (Bones et coll., 1992) (Figure 16). De même, les termes de sepsis sévère et de choc septique ont été à l'occasion introduits pour différencier les différents stades de la pathologie (Tableau 7).

Cependant, au cours d'une conférence de consensus plus récente, si la valeur et l'intérêt des définitions du SIRS, sepsis, choc septique et SDMV ont été reconnus, leurs limites apparaissent pour établir le pronostic de la réponse de l'hôte à l'infection (Levy et coll., 2003). Au cours de cette même conférence, outre la mise à jour des critères cliniques et biologiques pour le diagnostic du SIRS et du sepsis, il a été proposé un nouveau système de classification prenant modèle sur celui utilisé pour le cancer, le système PIRO : Prédisposition (spécialement les facteurs génétiques), Infection (type d'infection, agent responsable, etc...), Réponse (réponse de l'hôte, SIRS, sepsis, recherche de marqueurs comme l'interleukine 6, la protéine C, le TNF), Organ dysfunction. Ce modèle devrait permettre de mieux caractériser ce syndrome sur la base de facteurs prédisposants et d'états prémorbides, la nature de l'infection

sous-jacente, les caractéristiques de la réponse de l'hôte et l'étendue des dysfonctions d'organes résultantes.

SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)	Au moins 2 des manifestations suivantes : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Température > 38° ou < 36°C ▪ Fréquence cardiaque > 90 battements/min. ▪ Fréquence respiratoire > 20 cycles/min. ou PaCO₂<32 mmHg ▪ Leucocytes sanguins > 12000/ ou < 4000/ mm³ ou présence de plus de 10% de formes immatures de neutrophiles.
Sepsis	SIRS + présence d'un foyer infectieux documenté
Sepsis sévère	Sepsis + défaillance d'organe, hypoperfusion ou hypotension associée à une acidose lactique, une oligurie, une encéphalopathie aiguë, une hypoxémie inexpliquée, une coagulopathie.
Choc septique	Hypotension secondaire au sepsis (pression artérielle systémique < 90 mmHg ou diminution de plus de 40 mmHg par rapport aux valeurs habituelles) malgré un remplissage vasculaire adéquat, avec persistance des anomalies de perfusion incluant l'acidose lactique, l'oligurie ou l'encéphalopathie aiguë. Les patients traités par des agents vasopresseurs ou inotropes peuvent ne pas être hypotendu au moment de l'examen.
SDMV = MOF Syndrome de défaillance multiviscérale = Multiple Organ Failure	Deux ou plusieurs dysfonctions d'organe chez un patient de réanimation dans une situation telle que l'homéostasie ne peut être maintenue sans intervention thérapeutique.

Tableau 7 : Définition clinique du sepsis (d'après Bone et coll., 1992)

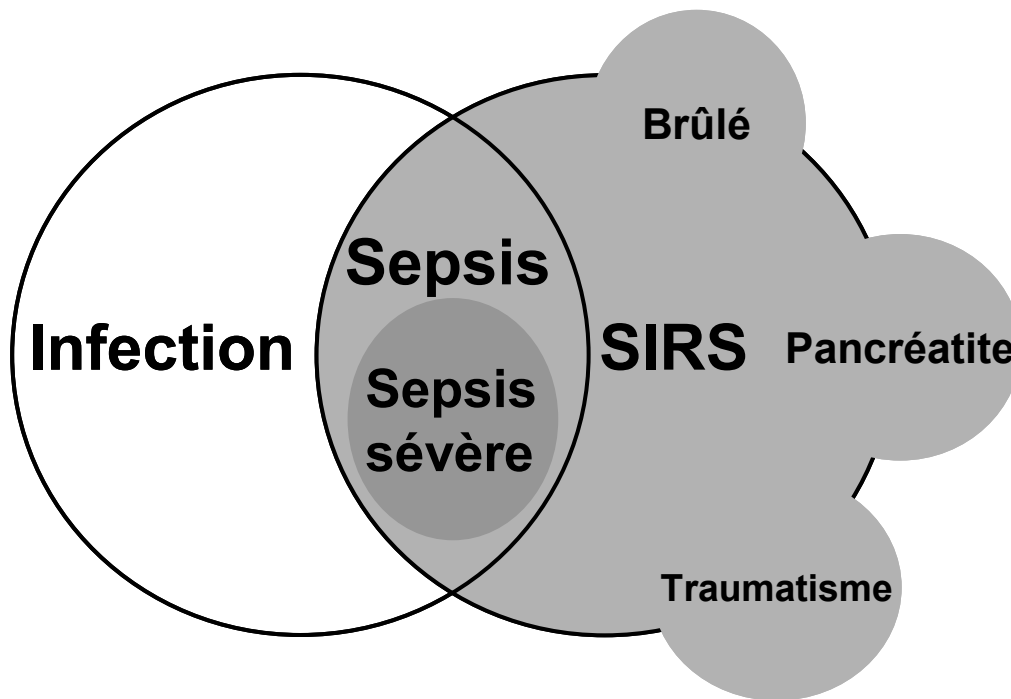


Figure 16 : Le concept de SIRS (adapté d'après Bone et coll., 1992)

Ces discussions autour des définitions du sepsis associées à l'hétérogénéité des tableaux cliniques rencontrés, rendent compte de la difficulté à comparer les études épidémiologiques menées pour déterminer l'incidence, la prévalence, la morbidité, la mortalité et les coûts de cette pathologie dans les populations générales ou de réanimation de différents pays. Une étude rétrospective menée sur 22 ans aux USA dans 500 hôpitaux prenant en compte des critères définis par l'ICD-9-CM (International Classification of Diseases, Ninth revision, Clinical Modification) a identifié plus de 10 millions de sepsis sévères parmi 750 millions d'hospitalisations au cours de cette période, avec une incidence de 83 pour 100 000 en 1979 et de 240 pour 100 000 en 2001, soit une augmentation annuelle de 8,7%. Les auteurs retrouvent une diminution de la mortalité intra-hospitalière qui passe de 27,8% pendant la période 1979-1984 à 17,9% pendant la période 1995-2000 (Martin et coll., 2003). Le risque relatif de survenue d'un sepsis sévère est plus élevé chez les hommes que chez les femmes (risque relatif annuel moyen de 1,28 (intervalle de confiance à 95%, 1,24 à 1,32). Une étude plus ancienne (1995) a estimé que 751 000 cas de sepsis sévère étaient diagnostiqués par an aux USA, avec un taux de mortalité de 28,6% et un coût moyen de 22 100 \$ par patient. La mortalité augmente avec l'âge pour passer de 10% chez l'enfant à 38,4% à plus de 85 ans. Selon ce travail, en 1995, aux USA, le nombre de décès liés au sepsis sévère était équivalent au nombre de décès après infarctus du myocarde (Angus et coll., 2001). Alberti et coll. ont étudié 14 364 patients de réanimation de 8 pays différents (Europe, Israël,

Canada) en utilisant les critères de la conférence de consensus de 1992. Ils ont trouvé une incidence de sepsis sévère de 21% avec des taux de mortalité pouvant atteindre 56% chez les patients de réanimation porteurs d'une infection nosocomiale (Alberti et coll., 2002). En France, l'étude EPISEPSIS menée pendant 15 jours dans 206 services de réanimation a mis en évidence une incidence de 14,6% d'épisodes de sepsis sévère sur les 3738 patients hospitalisés en réanimation avec une mortalité à 30 jours de 35% (Brun-Buisson et coll., 2004). Le coût global d'un patient présentant un tel syndrome a été estimé, dans une étude prospective, à environ 19 000 Euros (Brun-Buisson et coll., 2003). Globalement, les études épidémiologiques sont trop hétérogènes pour permettre une comparaison entre pays. Cette comparaison pourra être faite si : (i) les études prennent la même définition du sepsis, (ii) si les populations sont comparables (type d'établissement, de services), (iii) si les pratiques cliniques sont identiques.

L'isolement microbiologique de l'agent infectieux est obtenu dans environ 60 à 70% des cas de sepsis (Bernard et coll. 2001 ; Vincent et coll., 2006). La répartition des agents infectieux responsables de sepsis sévère semble évoluer au cours du temps. Effectivement, alors que les bactéries Gram négatif étaient prédominantes avant les années 70-80, actuellement les bactéries Gram positif sont prépondérantes (Martin et coll., 2003 ; Vincent et coll., 2006). De plus, il a été rapporté, durant la même période, une augmentation de 200% du taux d'infections fongiques (Martin et coll., 2003). Les sepsis sévères sont dus à des infections polymicrobiennes dans 16 à 55% (Angus et coll., 2001 ; Brun-Buisson et coll., 2004 ; Alberti et coll., 2003 ; Vincent et coll., 2006). Les localisations des foyers infectieux les plus fréquentes sont pulmonaires (40 à 60% des cas) et abdominales (10 à 30% des cas) (Brun-Buisson et coll., 1995 ; Angus et coll., 2001 ; Alberti et coll., 2003 ; Vincent et coll., 2006).

B. Physiopathologie

Le sepsis implique des voies de signalisation et des cascades immunologiques extrêmement nombreuses et complexes.

Plusieurs étapes caractérisent le sepsis. A la phase initiale, de fortes concentrations d'antigènes de micro-organismes pathogènes apparaissent dans le flux sanguin (il peut s'agir de micro-organismes entiers ou de certains de leurs composants ou sécrétions), ce qui survient lorsque la population microbienne d'un foyer infectieux atteint un seuil. L'étape suivante est la reconnaissance par le système immunitaire de ces différents antigènes. La concentration de ces molécules nécessaires pour une activation importante des monocytes/macrophages va

dépendre du type d'infection, de son importance et de sa localisation. Une fois activé, le système monocyttaire/macrophagique va produire et sécréter de nombreux facteurs solubles qui vont à leur tour activer différentes fonctions (immunitaire, coagulation, cellules endothéliales). Les facteurs les mieux caractérisés sont des peptides avec des activités pro-inflammatoires : le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6. Ces cytokines, directement ou indirectement, sont responsables d'altérations cellulaires, tout d'abord au niveau vasculaire et immunitaire, puis dans tout l'organisme (Fantuzzi, 2000). Les lymphocytes T (CD4+) vont alors reconnaître les antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA : macrophages, monocytes, cellules endothéliales...). Ils vont proliférer et se différencier. Les lymphocytes CD4+ activés peuvent dans ce cas prendre plusieurs orientations fonctionnelles : (i) « type 1 Helper T cells » où elles vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Interleukine-12, Interféron- γ) qui amplifient encore la réponse inflammatoire ; (ii) « type 2 Helper T cells » où elles vont produire des cytokines de type anti-inflammatoire (IL-4 et IL 10) ; (iii) l'anergie (absence de prolifération ou de sécrétion) (Hotchkiss et Karl, 2003). Les facteurs déterminant le type de réponse ne sont pas encore identifiés mais il semble que le type d'agent pathogène, la taille de l'inoculum et la localisation de l'infection soient déterminants.

1. Signaux et récepteurs

Le système immunitaire reconnaît des éléments spécifiques produits par les micro-organismes (Anderson 2000). Ces éléments sont appelés PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Parmi ces PAMP, le mieux caractérisé est l'endotoxine ou lipopolysaccharide bactérien (LPS). La présence d'endotoxine au niveau sanguin est connue sous le nom d'endotoxémie. Les lipopolysaccharides sont les composants majeurs de la membrane externe des bacilles à Gram négatif, comme *Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurium* (Figure 17). Les lipopolysaccharides sont des complexes macromoléculaires toxiques présents de manière constitutive dans la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif. Sur le plan structural, les lipopolysaccharides (LPS) sont constitués d'un lipide A et d'une partie polysaccharidique débordant la membrane externe. Le lipide A est doué de propriétés toxiques. La fraction polysaccharidique constitue l'antigène O et elle est responsable de la spécificité antigénique O permettant de décrire des sérovars au sein d'une même espèce bactérienne (Caroff et Karibian, 2003). La chaîne O spécifique est la partie la plus variable du LPS. Elle est constituée de chaînons répétitifs comprenant chacun 3 à 8 sucres et dont le nombre varie de 20 à 40 chez les salmonelles. Le premier de ces chaînons peut avoir une

structure légèrement différente de celle des autres chaînons. Les sucres constituant ces chaînons sont des hexoses « classiques » (glucose, galactose, mannose...) mais aussi des sucres plus particuliers comme le tyvélose, le paratose, l'abéquose, le colitose (Whitfield et coll., 2003). Entre le lipide A et l'antigène O, se trouve un polysaccharide central, le noyau ou le core avec une partie externe vers l'antigène O constitué d'un nombre variable de résidus d'hexoses ou d'hexosamines et une partie interne qui contient deux sucres inhabituels, l'heptose et l'acide désoxy-manno-octulosonique (KDO), vers le lipide A (Figure 18) (Raetz et Whitfield, 2002). D'autres molécules peuvent être responsables de l'activation du système immunitaire, tel que l'acide lipoteichoïque présent dans la paroi des bactéries Gram positif ou les ergostérols dérivés de la membrane des levures.

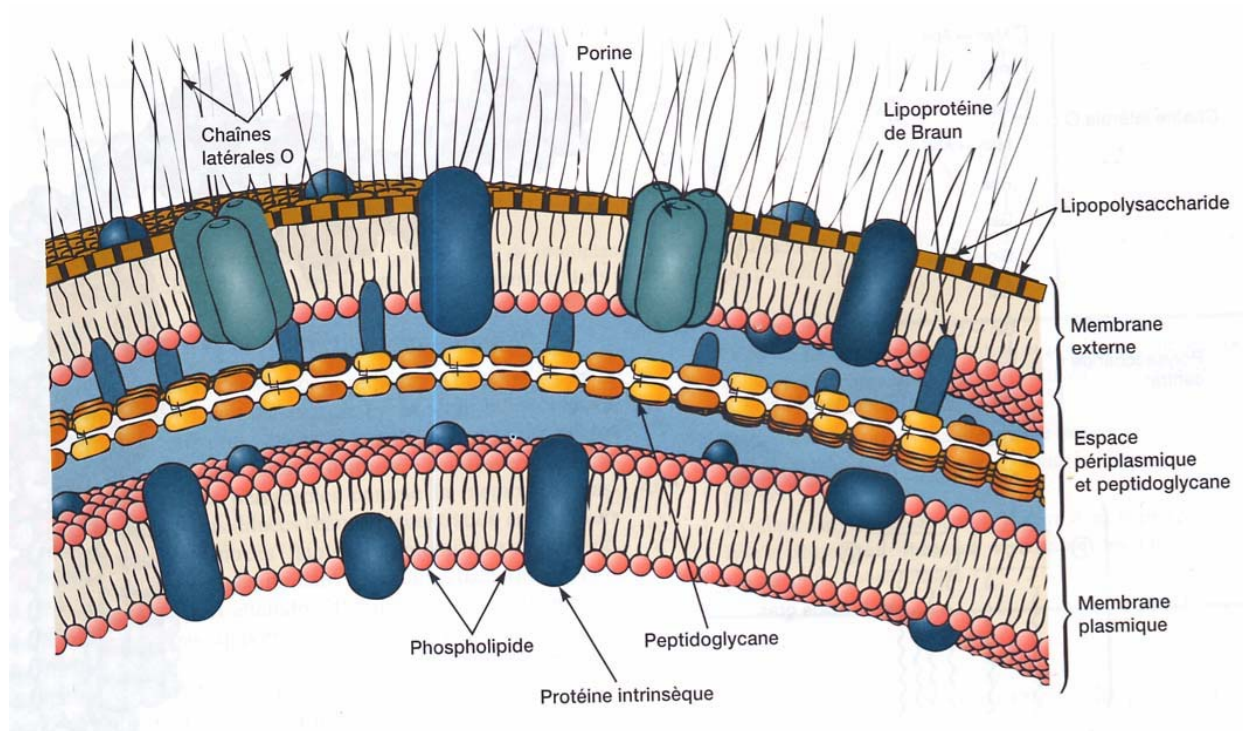


Figure 17 : Structure des parois des bactéries Gram négatives (d'après Raetz et Whitfield, 2002).

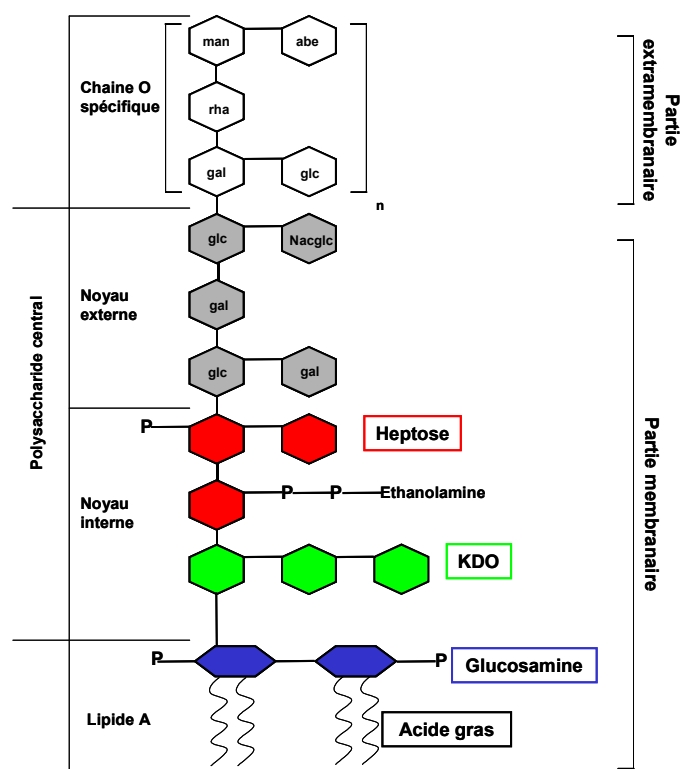


Figure 18 : Structure de l'endotoxine (*Salmonella typhi murium*). Abe : abequoise ; Gal : galactose ; Glc : glucose, rha : rhamnose, Nacglc : N-acétyl-glucosamine ; KDO : acide déoxy-manno-octulosonique (d'après Raetz et Whitfield, 2002).

Les récepteurs les plus importants et les mieux caractérisés pour la reconnaissance des antigènes bactériens (notamment des endotoxines) sont les récepteurs de la famille « toll-like receptor ». La protéine toll est considérée comme une molécule essentielle au développement de l'axe dorsoventral de l'embryon de la drosophile. Les TLR (Toll-like receptors) sont les homologues de cette protéine chez les mammifères et ils sont exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Ces cellules sont rapidement activées par les micro-organismes qui lient un ou plusieurs membres de la famille des TLR de façon très spécifique. Leur domaine extracellulaire possède plusieurs motifs riches en leucine, tandis que leur domaine cytoplasmique est très semblable à la portion cytoplasmique du récepteur de type I de l'interleukine 1 (IL-1RI), communément appelé domaine TIR (Toll/IL-1R) (Akira et coll., 2001). Des TLR distincts reconnaissent les principaux PAMP produits par les bactéries à Gram négatif ou à Gram positif. Actuellement, une dizaine de représentants de ces récepteurs sont connus et la liste de leurs ligands va en augmentant (Yamamoto et coll., 2004). TLR2 reconnaît de façon très stricte les éléments produits par les bactéries à Gram positif et TLR4 lie les PAMP des bactéries à Gram négatif (Figure 19).

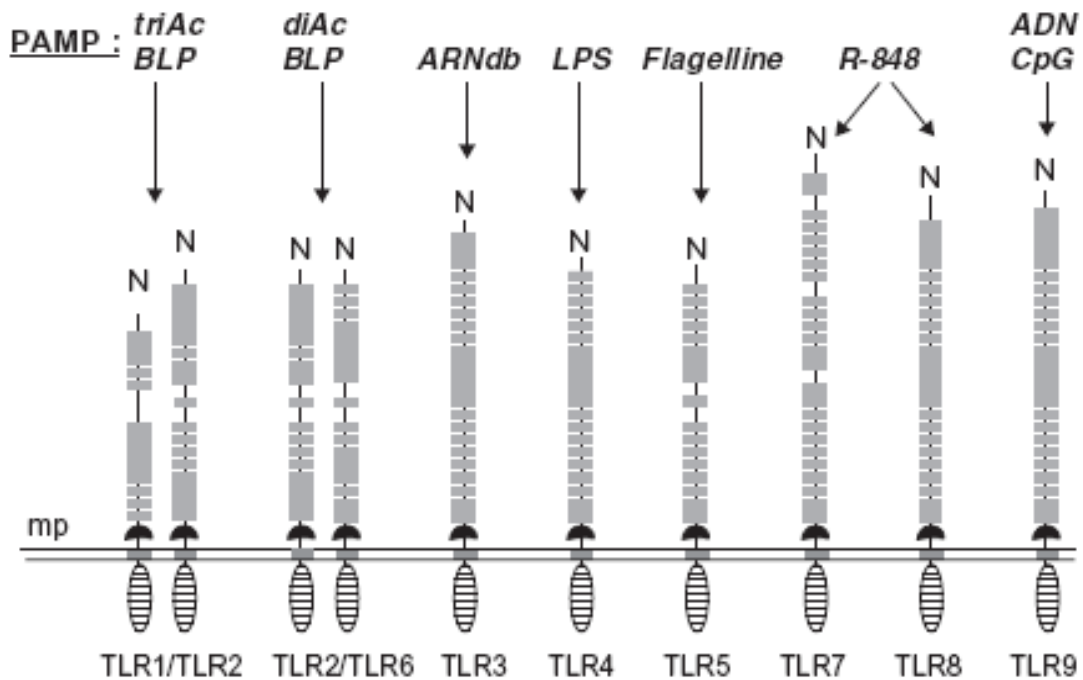


Figure 19 : La famille des toll-like receptors (TLR) chez les mammifères. Les TLR sont des protéines membranaires (mp : membrane plasmique) dont les ectodomains sont composés de motifs LRR (rectangles) et de motifs flanquants riches en cystéine (demi-cercles). Leur domaine intracellulaire, le domaine TIR, est similaire à celui du récepteur de l'IL-1 (ovale). Les TLR sont activés sélectivement par différents types de PAMP, parmi lesquels des lipopeptides bactériens (BLP) di- ou triacylés, des lipopolysaccharides (LPS), des acides nucléiques (ARN double brin ou motif CpG d'ADN) ou des protéines (flagelline). TLR7 et TLR8 sont activés par des molécules de la famille des imidazoquinolines, comme le resiquimod ou R-848 (d'après Akira et Sato, 2003)

Dans le sang, les endotoxines se fixent à une protéine de transport, la « LPS Binding Protein » ou LBP, une glycoprotéine de 60 kDa. Il s'agit d'une protéine de la phase aiguë synthétisée par le foie. Le complexe formé par LPS et LBP va interagir avec CD14 (une glycoprotéine de membrane de 55 kDa qui est présente dans de nombreuses cellules du système immunitaire). Ce complexe agit de concert avec les récepteurs toll, responsables de la transduction du signal. Le domaine TIR des TLR et de l'IL-1R1 interagit avec MyD88 (Myeloid differentiation protein 88). Cette protéine adaptatrice possède un domaine de mort (death domain) amino-terminal qui s'associe à IRAK (IL-1R-associated kinase), ainsi qu'à une sérine kinase qui active une autre molécule adaptatrice, TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6). Le recrutement de TRAF6 mène à l'activation de la protéine kinase IKK (I κ B kinase), qui est composée de deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) et d'une sous-unité régulatrice (IKK γ /NEMO) (Chu et coll., 1999). IKK γ est nécessaire pour l'activation de NF- κ B (nuclear factor of the kappa chain of immunoglobulins in B cells) par plusieurs *stimuli*, bien que seule la sous-unité IKK β soit essentielle pour l'activation de ce facteur de transcription par les cytokines et les PAMP. En effet, IKK β est la cible des signaux en amont produits par les stimulus pro-inflammatoires qui mènent à la phosphorylation et à la dégradation d'I κ B (Delhase et coll., 1999 ; Hu et coll., 1999). Le recrutement du complexe MyD88/IRAK/TRAF6 dans le domaine cytoplasmique du récepteur peut aussi activer la voie des kinases MAPK (mitogen-activated protein kinase), en particulier la voie de signalisation de la kinase JUN avec l'activation du facteur de transcription AP-1 (activator protein 1). L'activation de la transcription de la grande majorité des gènes qui prennent part à la réponse immunitaire innée est attribuable à la translocation nucléaire d'AP-1 (Figure 20).

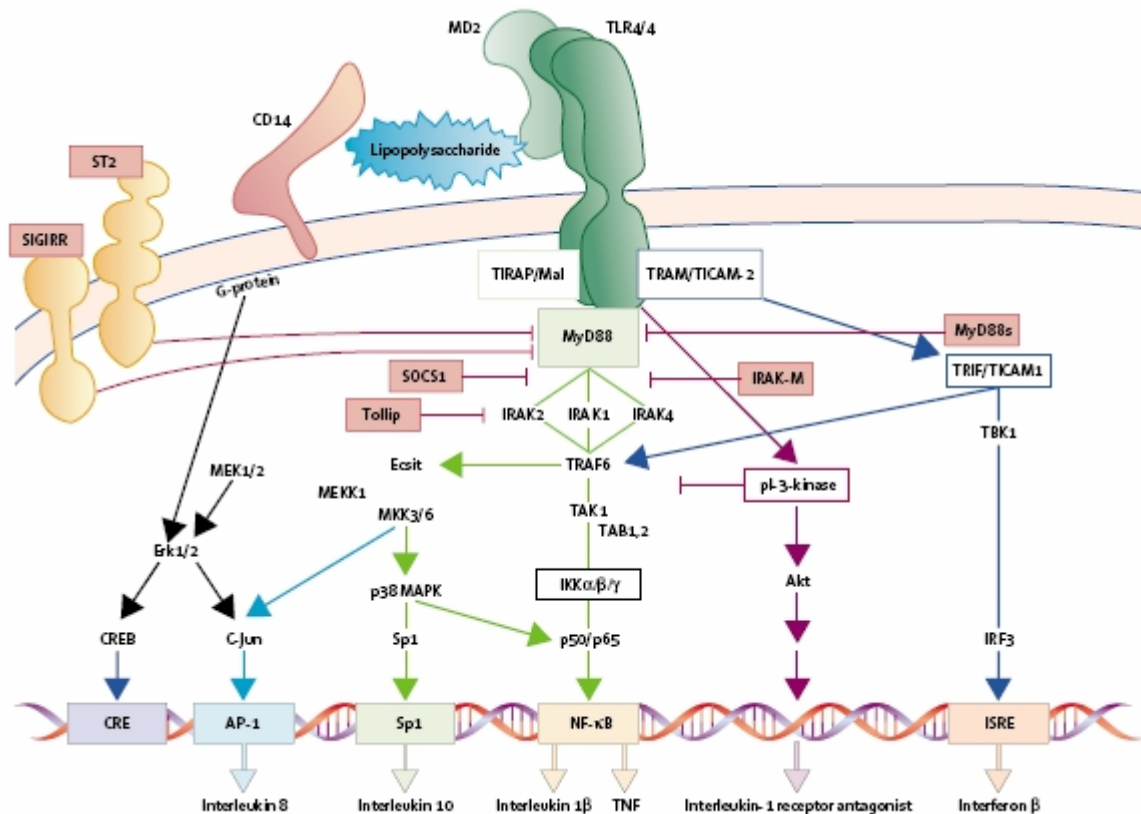


Figure 20 : Voies de signalisation intracellulaires induite par le LPS. CRE : cyclic AMP-responsive element ; CREB : CRE binding protein ; Ecsit : evolutionarily conserved signalling intermediate in toll pathways ; MD2 : myeloid differentiation 2 ; AP-1 : activator protein-1 ; erk : extracellular signal-regulated kinase ; IKK2 : I kappa B kinase 2 ; IRF : interferon regulatory factor ; ISRE : interferonstimulated responsive element ; IRAK : interleukin-1 receptor-associated kinases ; MAPK : mitogen activated protein kinase ; MEKK : mitogen-activated protein kinase/ERK kinase ; MyD88 : myeloid differentiation protein 88 ; Mal : MyD88 adaptor-like ; MyD88s : MyD88 short ; NF-κB : nuclear factor-κB ; pI : phosphoinositide ; SIGIRR : single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule ; Sp1 : stimulating protein 1 ; SOCS : suppressor of cytokine signalling ; TANK : TRAF-associated NF-κB kinase ; TBK : TANK-binding kinase ; TRIF : TIR (toll/interleukin-1 receptor) domain-containing adaptor protein inducing interferon β ; TICAM : TIR-containing adaptor molecule ; TIRAP : TIR domain-containing adaptor protein ; Tollip : toll-interacting protein ; TLR : toll-like receptor ; TRAF : tumour necrosis factor receptor-associated factor ; TRAM : TRIF-related adaptor molecule. (D'après Annane et coll., 2005)

2. Le rôle de NF- κ B

NF- κ B est un des principaux facteurs transcriptionnels impliqué et étudié dans la réponse immunitaire dans le sepsis. NF- κ B joue un rôle primordial au cours du développement du choc septique et en particulier dans deux étapes majeures qui sont d'une part l'activation du système monocytaire/macrophagique avec comme conséquence la sécrétion rapide de fortes concentrations de cytokines et d'autre part l'activation des cellules endothéliales (Caamano et coll., 2002).

Dans les conditions de base, NF- κ B est situé dans le cytoplasme associé à la protéine inhibitrice I κ B. Son activation se fait globalement en trois phases. Au cours de la première, IKK (I κ B kinase), un complexe multiprotéique de haut poids moléculaire (700-900 kDa) est activé. Dans un second temps, IKK phosphoryle deux résidus sérine spécifiques sur I κ B, provoquant son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome, ceci permet la libération de NF- κ B qui rejoint le noyau (Karin et Ben Neriah, 2002). Dans le noyau, NF- κ B se lie à des séquences d'ADN spécifiques localisées dans des régions promotrices et participe à l'activation de nombreux gènes de cytokines, chemokines, protéines de la phase aiguë, peptides antimicrobiens et antiapoptotiques (Karin et Lin, 2002).

Il existe une famille de récepteurs NF- κ B dont au moins 5 membres ont été retrouvés chez les mammifères (p50, p65, Relb, C-Rel et p52). Ils présentent des propriétés de répression ou d'activation de gènes variables en fonction de leur homo ou hétérodimérisation (Gilmore, 1999). De même, leurs différentes organisations dimériques rend compte d'interactions avec des membres de la famille des I κ B qui sont sensibles à divers stimuli extracellulaires (Chen et coll., 1999).

NF- κ B joue également un rôle dans de nombreuses pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde, le cancer, l'asthme, l'athérosclérose et l'infection par le virus HIV (Lavon et coll., 2000 ; Yamamoto et Gaynor, 2001 ; Baldwin, 2001).

L'importance de ce facteur transcriptionnel dans le développement du choc septique a été mise en évidence par de multiples approches expérimentales chez l'animal et *in vitro*. Des inhibiteurs spécifiques de NF- κ B comme la pyrrolidine dithiocarbamate, un agent anti-oxydant, protège des souris d'une dose létale de LPS, sans modifier la production d'IL-1 β ou d'IL-6 (Lauzurica et coll., 1999). D'autres études *in vivo* ont montré que cet inhibiteur diminuait l'expression des gènes de protéines pro-inflammatoires (TNF- α , COX-2, ICAM-1) en bloquant la translocation de NF- κ B vers le noyau (Liu et coll., 2000). La création d'animaux génétiquement modifiés a confirmé que la réponse immunitaire induite par le LPS était dépendante de NF- κ B. En effet, une souris transgénique surexprimant la sous-unité p50 de

NF- κ B dont l'hétérodimérisation inhibe la réponse transcriptionnelle, présente une tolérance au LPS. Cette tolérance serait notamment liée à une baisse de la production de TNF- α et à une faible activation des cellules endothéliales (Bohuslav et coll., 1998).

Il est intéressant de noter que le LPS peut activer les cellules endothéliales en y induisant la translocation de NF- κ B, de façon équivalente aux cytokines pro-inflammatoires produites par le système monocytaire/macrophagique.

3. Les cytokines pro-inflammatoires

Une fois activés, les macrophages ont un rôle sécrétoire fondamental dans le système immunitaire. Plus d'une centaine de produits de sécrétion des macrophages ont été identifiés, avec des poids moléculaires très variés : de 32 Da pour l'ion superoxyde jusqu'à 400 kDa pour la fibronectine (Tak et Firestein, 2001).

Durant presque une quinzaine d'années, des expériences démontrant l'effet protecteur des cytokines vis-à-vis des infections ont été menées en utilisant des cytokines recombinantes (comme le TNF, l'IL-1 et l'interféron- γ), des anticorps dirigés contre ces cytokines et avec des souris génétiquement modifiées dont un gène codant pour une cytokine ou son récepteur était invalidé. Ces expériences permettent de conclure aux effets létaux du TNF, de l'IL-1 β , l'IL-12, IL-18, de l'interféron- γ , du GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), du MMIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor), de l'interféron- β et de HMGB1 (High Mobility Group Box 1). Chez l'homme, les cytokines sont produites en grande quantité, détectables au niveau plasmatique où elles sont normalement absentes (Cavaillon et coll., 2003). Cependant, ces cytokines circulantes ne sont que « la partie émergée de l'iceberg » (Cavaillon et coll., 1992), une sécrétion paracrine des cytokines peut être identifiée, sans qu'elle soit détectable au niveau plasmatique (Munoz et coll., 1991).

Le sepsis est associé à une augmentation des concentrations plasmatiques d'histamine provenant des mastocytes et/ou des polynucléaires basophiles après activation de la voie du complément avec une augmentation de l'expression des anaphylatoxines C3a et C5a (Brackett et coll., 1990). Alors que l'histamine exogène et les agonistes spécifiques des récepteurs de type H₂ à l'histamine ont un effet protecteur au cours du choc endotoxémique (Nakamura T et coll., 1997), les anaphylatoxines augmentent la perméabilité vasculaire, la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires, et ont un effet chemoattractant pour les leucocytes. De plus, les souris déficientes pour le gène codant pour C5 présentent une élévation moins importante de TNF ainsi qu'une réponse de moindre sévérité après endotoxémie. De même,

les anticorps anti-C5a ou anti-récepteurs au C5a réduisent la mortalité liée au sepsis (Fisher et coll., 1997).

Les cytokines pro-inflammatoires induisent la synthèse de la phospholipase A2, de la cyclo-oxygénase inductible, de la 5-lipo-oxygénase et de l'acétyltransférase qui contribuent à la synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) et du Platelet Activating Factor (PAF). Ces facteurs agissent par le biais de récepteurs couplés aux protéines G et ils amplifient la réponse inflammatoire, altèrent les réponses vasomotrices et augmentent la perméabilité vasculaire. Les souris déficientes en récepteur de la phospholipase A2 sont résistantes à un choc endotoxémique (Hanasaki et coll., 1997).

L'anion superoxyde produit par la NADPH-oxydase, est responsable d'oxydation et d'altération de protéines et des acides gras insaturés des phospholipides. Cependant, des phospholipides oxydés peuvent prévenir la réponse inflammatoire due au sepsis en bloquant l'interaction entre les lipopolysaccharides et CD14 (Bochkov et coll., 2002).

Les souris déficientes en NO synthase inductible présentent une hypotension moins sévère après injection d'une dose létale d'endotoxine (Laubach et coll., 1995). Chez l'homme, les endotoxines ou certaines cytokines pro-inflammatoires sont responsables de la sécrétion de grandes quantités de NO par la NO synthase inductible au niveau tissulaire (Annane et coll., 2000a ; Sharshar et coll., 2003). Cette surproduction de NO peut être tenue pour responsable du développement d'altérations microcirculatoires, de l'hyporéactivité vasculaire et de la dysfonction d'organe, probablement par induction de l'apoptose (Sharshar et coll., 2003).

4. Les cytokines anti-inflammatoires

Des cytokines anti-inflammatoires et des récepteurs solubles sont produits en grande quantité durant le sepsis. Ils diminuent la production de cytokines pro-inflammatoires et protègent donc l'individu du sepsis et du choc endotoxinique. Ces effets sont clairement démontrés pour l'IL-10 (bien que les effets de cette cytokine varient en fonction du temps, de sa concentration et de son site d'expression), pour le Transforming Growth Factor β (TGF- β), l'interféron- α , l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-13. Plus récemment, l'antagoniste du récepteur de l'IL-1, la LBP et le CD-14 soluble ont été identifiés comme des protéines de la phase aiguë. L'IL-6 induit la synthèse de protéines de la phase-aiguë qui limitent l'inflammation (comme la protéine C-réactive), mais dans le même temps cette interleukine pourrait induire une dépression myocardique, comme dans la méningococcémie (Pathan et coll., 2004). Bien que des taux circulants élevés d'antagoniste du récepteur de l'IL-1 et de récepteurs solubles au TNF ont été

rapportés au cours du sepsis, il n'est pas clairement démontré que ces taux soient suffisants pour contrecarrer les effets des cytokines pro-inflammatoires (Cavaillon et coll., 2003).

Des neuromédiateurs jouent également un rôle majeur dans le contrôle de la réponse inflammatoire. La substance P augmente la production de cytokines. L'histamine sécrétée lors de la dégranulation des polynucléaires basophiles et des mastocytes diminue l'adhésion leucocytaire, le chemotactisme et la perméabilité vasculaire. Les catécholamines interfèrent avec la production de cytokines de diverses manières. La noradrénaline, par le biais des récepteurs α_2 -ARs augmente la production de TNF (Spengler et coll., 1990), alors que l'adrénaline en activant les récepteurs β_2 -ARs diminuent cette production *in vitro* (Severn et coll., 1992) et *in vivo* chez des volontaires ayant reçu du LPS, où en outre elle augmente la production d'IL-10 (van der Poll et coll., 1996). De plus, l'adrénaline augmente la production d'IL-8 (van der Poll et Lowry, 1997) et bloque la production de NO par les macrophages (Zinyama et coll., 2001). Les effets anti-inflammatoires des agonistes β -ARs sont secondaires à une diminution de la dégradation de I κ B (Farmer et Pugin, 2000). Le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) et le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide) sont deux neuropeptides anti-inflammatoires qui inhibent la production de cytokines (Delgado et coll., 1999 ; Martinez et coll., 2002). Chez des rats traités avec du LPS, la stimulation vagale atténue l'hypotension et réduit les concentrations de TNF plasmatiques et hépatiques (Borovikova et coll., 2000). Enfin, l' α MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone), un autre neuro-médiateur peut diminuer la réponse inflammatoire par inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (Delgado et coll., 1999).

Les interactions entre les cytokines et les neuro-hormones constituent un élément essentiel dans la restauration de l'homéostasie au cours d'un stress (Chrousos, 2000). La production et la sécrétion de vasopressine et d'hormone corticotrope (CRH) sont augmentées par le TNF, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-2 circulants, par le NO et l'IL-1 β sécrétés localement et par les fibres afférentes vagales. De plus, la synthèse du cortisol est modulée par l'expression locale d'IL-6 et de TNF- α . Les hormones dont l'expression est augmentée permettent de maintenir l'homéostasie cardiovasculaire et le métabolisme cellulaire. L'altération des réponses endocrines au cours du sepsis pourraient être due aux cytokines, à l'apoptose neuronale, aux anomalies métaboliques et ischémiques au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire et des glandes surrénales ainsi qu'aux traitements administrés (Prigent et coll., 2004). L'insuffisance surrénalienne et l'altération de la production de vasopressine sont retrouvées respectivement dans la moitié et le tiers des cas de choc septique, contribuant à l'hypotension et la mortalité liées à ce tableau (Annane et coll., 2000b ; Landry et coll., 1997).

D'autres anomalies endocriniennes ont été constatées durant le sepsis mais dont les mécanismes et les conséquences restent à préciser : système rénine/angiotensine/aldostérone, hormones thyroïdiennes, insuline, hormones de croissances...

C. Le système cardiovasculaire au cours du choc septique

Le profil hémodynamique du choc est caractérisé par l'association à des degrés variables de composantes hypovolémique, obstructive, cardiogénique, distributive ou cytotoxique. Ce profil est modifié par une restauration volémique, mais la persistance d'une hypotension signe le choc septique. Même si le débit cardiaque semble normal, voire élevé, il existe des preuves de l'altération des propriétés contractiles du myocarde (Gibot et coll., 2004). D'une manière très schématique, le tableau clinique cardiovasculaire au cours d'un choc septique peut se résumer le plus souvent comme une dysfonction vasculaire associée à une myocardiopathie compensée.

1. Dysfonction cardiaque au cours du sepsis

(a) Historique

Avant l'utilisation des techniques invasives de mesures hémodynamiques, il était décrit deux phases au cours du choc septique : une phase hyperkinétique (« choc chaud » avec un débit cardiaque élevé) observée au stade initial, puis une phase hypokinétique avec un bas débit cardiaque (« choc froid »), cette seconde phase étant attribuée principalement à une dépression myocardique sévère avec des résistances vasculaires systémiques élevées. Néanmoins, Wilson et coll. démontrèrent que le choc septique chez l'homme était associé à un débit cardiaque normal associé à des résistances vasculaires basses (Wilson et coll., 67). L'avènement des mesures hémodynamiques par cathéter artériel pulmonaire (cathéter de Swan-Ganz) permit de confirmer que chez les patients ayant bénéficié d'un remplissage initial, le profil hémodynamique était de type hyperkinétique avec un haut débit cardiaque et des résistances vasculaires systémiques basses (Winslow et coll., 1973), même chez les patients qui ne survivaient pas (Parker et coll., 1987). Néanmoins, l'idée d'une altération myocardique persistait. Confirmant cette hypothèse, Parker et coll. ont rapporté une baisse de la fraction d'éjection ventriculaire malgré un débit cardiaque normal ou élevé chez des patients en choc septique (Parker et coll., 1984). Ces résultats furent confirmés par des études cliniques (Ellrodt et coll., 1985) et expérimentales (Natanson C et coll., 1989). Il est maintenant clairement démontré qu'il existe une détérioration de la fonction systolique

pendant la phase précoce du choc septique chez l'homme, et notamment par les études échocardiographiques (Monsalve et coll., 1984). La question de l'altération de la fonction diastolique est moins clairement élucidée. La réduction de la compliance ventriculaire gauche se manifestant comme une diminution de la vitesse de remplissage a été décrite chez des patients en choc septique (Jafri et coll., 1990 ; Poelaert J et coll., 1997). L'altération de la relation précharge-volume d'éjection systolique de Franck-Starling, va également dans le sens d'une atteinte diastolique (Ognibene et coll., 1988). L'atteinte du ventricule droit est aussi très fréquente en cas de sepsis ou de choc septique (Parker et coll., 1990 ; Dhainaut et coll., 1997). Cette dysfonction peut être associée à la dysfonction ventriculaire gauche ou être isolée (Vieillard Baron et coll., 2001). L'ensemble des données de ces études hémodynamiques permet de décrire l'histoire naturelle de la dysfonction myocardique. Chez des patients en choc septique ayant reçu un remplissage vasculaire adéquat, se développe un état hyperkinétique caractérisé par une augmentation du débit cardiaque avec une dilatation biventriculaire associée à une diminution des résistances vasculaires systémiques. Paradoxalement, le débit cardiaque normal ou élevé est associé à une diminution de la fraction d'éjection des deux ventricules. Ces anomalies se normalisent en 7 à 10 jours chez les patients survivants. A partir des années 1990, des recherches ont porté sur l'étude des mécanismes impliqués dans cette dysfonction myocardique intrinsèque au cours du choc septique.

(b) Hypoperfusion coronaire

Une des premières hypothèses proposées pour expliquer la dysfonction myocardique au cours du choc septique a été la diminution du débit coronaire. Des mesures directes du débit sanguin coronaire et des paramètres métaboliques myocardiques au cours d'études cliniques, ont permis d'écarter l'idée d'une ischémie myocardique globale (Cunnion et coll., 1986 ; Dhainaut et coll., 1987). Néanmoins, plusieurs études cliniques ont révélé que la présence de taux plasmatiques élevés de troponine en cas de sepsis sévère et de choc septique était corrélée à la gravité de l'atteinte myocardique (Fernandes et coll., 1999 ; Metha et coll., 2004). Il n'a cependant pas été possible de mettre en évidence des signes patents de nécrose du myocarde ou des muscles squelettiques chez des patients décédés de choc septique (Lanone et coll., 2000). L'augmentation de troponine plasmatique peut résulter de l'augmentation transitoire de la perméabilité de la membrane cellulaire des cardiomyocytes sous l'effet de cytokines (Wu, 2001). De plus, la dysfonction endothéliale présente au cours du choc septique peut être à l'origine d'altérations microcirculatoires (microthrombus) ou de la sécrétion de facteurs paracrines agissant sur les cardiomyocytes (Grocott-Mason et Shah,

1998). Les altérations du rapport apport/consommation d'oxygène en résultant, pourraient expliquer l'apparition de zones d'ischémie myocardique.

(c) Facteurs circulants

La présence de facteurs circulants dépresseurs de la fonction myocardique au cours du choc septique a été évoquée voilà près de 60 ans (Wiggers, 1947). Parrillo et coll. ont confirmé cette hypothèse chez l'homme en montrant que le sérum obtenu de patients à la phase initiale d'un choc septique, diminuait à la fois l'amplitude et la vitesse de raccourcissement de cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Parrillo et coll., 1985). Certaines cytokines ont été proposées comme de potentiels « facteurs circulants dépresseurs myocardiques », c'est le cas du TNF- α et l'IL-1 β . Ces deux cytokines sont présentes dans le plasma lors du sepsis (Finkel et coll., 1992) et sont responsables, *in vitro*, d'un effet inotrope négatif direct mais transitoire (Kumar et coll., 1996). Cependant, bien que les cytokines puissent rendre compte d'un effet dépresseur myocardique à la phase initiale du sepsis, le profil de sécrétion de ces substances rend plus improbable un effet retardé et prolongé. En effet, la performance myocardique est, comme nous l'avons vu, altérée pour une période de 7 à 10 jours chez la plupart des individus, alors que les taux de TNF- α et l'IL-1 β retrouvent une valeur normale 48 heures environ après le début du choc septique. De plus, plusieurs études réalisées sur des muscles papillaires de lapin (Tavernier et coll., 2001a ; Mebazaa et coll., 2001) ou des cardiomyocytes de rat (Abi-Gerges et coll., 1999 ; Tavernier et coll., 2001), prélevés à la phase aiguë du choc septique décrivent une diminution prolongée de la contractilité, à un niveau comparable à celui qui est observé *in vivo*, et ce en absence de contact direct avec le plasma.

(d) Mécanismes cellulaires intrinsèques

Comme nous l'avons vu, les deux hypothèses précédemment développées ne permettent pas d'expliquer à elles seules la dysfonction myocardique observée au cours du choc septique. Plusieurs observations vont dans le sens d'une atteinte intrinsèque du myocarde au cours du sepsis. Si les cytokines ne sont pas directement responsables de la dysfonction myocardique prolongée, elles peuvent en revanche initier ces altérations cellulaires.

▪ Homéostasie calcique et couplage excitation-contraction

Au cours du choc septique, l'homéostasie calcique est altérée par : (i) réduction des courants calciques et (ii) diminution de la sensibilité des myofilaments au calcium.

Chez des lapins traités par endotoxine, le nombre de canaux calciques de type L est diminué (Lew et coll., 1996) et cette diminution est directement corrélée chez l'homme, *in*

vivo à l'altération de la fonction ventriculaire gauche (Silverman et coll., 1993). Au niveau du réticulum sarcoplasmique, l'activité du récepteur à la ryanodine dépendante de la production de NO est également réduite, ce qui pourrait accentuer la diminution de contractilité (Cohen et coll., 2006). Certains auteurs suggèrent que les anomalies du transitoire calcique induites par le sepsis varient au cours du temps (Ren et coll., 2002).

Parallèlement, il a été démontré que la diminution de sensibilité des myofilaments au calcium joue un rôle crucial dans la dysfonction myocardique dans le sepsis (Tavernier et coll., 1998 ; Powers et coll., 1998; Tavernier et coll., 2001a; Tavernier et coll., 2001b, Behrends et Peters, 2003) même en l'absence de modification des courants calciques (Yasuda et Lew, 1997). Cette diminution de sensibilité au calcium en cas d'endotoxémie est concentration-dépendante et réversible au cours du temps. Le mécanisme exact reste inconnu, mais des phosphorylations protéiques semblent être impliquées. Ainsi, la phosphorylation de la troponine I a été décrite (Tavernier et coll., 2001b), conduisant à une diminution de la capacité du calcium à activer les myofilaments. L'implication de ce mécanisme dans l'altération de la contractilité au cours du sepsis est confortée par l'utilisation d'un modèle de souris transgénique. Ainsi, la substitution de la troponine I cardiaque par la troponine I squelettique qui ne présente pas de site de phosphorylation pour la protéine kinase A protège le myocarde de l'endotoxémie (Layland et coll., 2005). Le NO pourrait également par la voie des kinases dépendante du GMPc, induire la phosphorylation de la troponine I et ainsi réduire la sensibilité des myofilaments au calcium. Cette altération de la sensibilité au calcium de l'appareil contractile cardiaque pourrait participer à la dilatation ventriculaire retrouvée chez les patients septiques. En effet, cette diminution de sensibilité au calcium des myofilaments est associée à une augmentation de longueur des cardiomyocytes et de distensibilité ventriculaire (Shah et MacCarthy, 2000).

Récemment, une nouvelle molécule, le levosimendan qui agit tel un sensibilisateur calcique des myofilaments, a permis une amélioration des fonctions cardiaques dans des modèles animaux et chez des patients septiques (Faivre et coll., 2005 ; Morelli et coll., 2005).

- La voie du monoxyde d'azote et du peroxydinitrite

Le NO, principalement produit par la NO synthase inductible joue un rôle important dans le développement de la cardiomyopathie septique notamment par modification de la contractilité, mais aussi des nitrosylations protéiques et l'altération de la respiration mitochondriale.

Les lipopolysaccharides induisent une augmentation de l'expression de la NO synthase inductible associée à une forte augmentation de production de NO. Cependant, l'effet direct du NO ainsi produit sur la contractilité n'est pas définitivement démontré. En effet, alors qu'au niveau vasculaire, l'inhibition de la NO synthase inductible restaure le tonus vasculaire, cette inhibition ne corrige pas l'altération de contractilité des cardiomyocytes isolés, muscles papillaires ou cœurs isolés d'animaux traités par endotoxine (Finkel et coll., 1992 ; Tavernier et coll., 2001b). De même, chez des patients en état de choc septique, l'administration d'un inhibiteur non spécifique de NO synthases (le N⁰-monométhyl-L-arginine) permet une augmentation de la pression artérielle mais entraîne une diminution du débit cardiaque (Grover et coll., 1999).

Le NO pourrait également réagir avec l'anion superoxyde (O⁻) et donner du peroxy-nitrite (ONOO⁻). Comme cela a été suggéré dans la dysfonction du muscle squelettique chez les patients en état de choc septique, le peroxy-nitrite, plus que le NO, diminuerait la contractilité musculaire (Lanone et coll., 2000). Cette hypothèse semble confirmée chez des souris transgéniques, où il existe une corrélation entre le niveau de surexpression de la NO synthase inductible, la production de peroxy-nitrite et la survenue d'atteinte cardiaque (Mungrue et coll., 2002). Une autre étude récente va dans le même sens en démontrant un effet bénéfique d'un inhibiteur de la formation de peroxy-nitrite sur la défaillance myocardique des rats endotoxémiques (Lancel et coll., 2004). Au niveau myocytaire, le peroxy-nitrite pourrait altérer la contractilité en modifiant les courants calciques (Ishida et coll., 1996), en perturbant la respiration mitochondriale (Xie et coll., 1998) et en inhibant l'isoforme cardiaque de la créatine kinase (Mihm et coll., 2001).

Outre les effets toxiques de dérivés comme le peroxy-nitrite (qui inhibe les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire), le NO produit au cours du sepsis peut, au niveau cardiaque se lier au complexe IV de la chaîne respiratoire et l'inhiber (Levy coll., 2004). La liaison compétitive NO-oxygène sur ce complexe, explique l'augmentation de production de radicaux libres. A des concentrations plus élevées, le NO inhibe tous les complexes de la chaîne respiratoire. Il a été récemment montré que le sepsis permet l'activation d'une enzyme nucléaire, la PARP (poly(adenosine 5'-diphosphate [ADP]-ribose) polymérase), à l'origine d'atteintes tissulaires dans différentes pathologies (ischémie/reperfusion myocardique), par le biais d'une dysfonction mitochondriale. Dans le cas du choc septique, il existe une corrélation entre l'altération de la fonction myocardique et le niveau d'activité de cette enzyme (Soriano et coll., 2006). De plus, l'inhibition PARP *in vitro* améliore la contractilité (Boulos et coll., 2003).

- Apoptose

L'apoptose constitue une forme particulière de mort cellulaire. Les effecteurs de l'apoptose sont des protéases, les caspases (Green, 1998). Deux voies de signalisation convergent vers ces effecteurs. La première déclenche la sécrétion par les mitochondries de facteurs proapoptotiques comme le cytochrome c. La seconde voie est indépendante des mitochondries et implique le recrutement et l'activation de procaspases qui sont activées par des récepteurs, telle que la famille des récepteurs au TNF.

Les caspases sont activées au niveau cardiaque par les endotoxines (Nevière et coll., 2001 ; Fauvel et coll., 2001). L'inhibition des caspases (en particulier la caspase 3) permet de prévenir la dysfonction cardiaque du sepsis et les phénomènes d'apoptose (Nevière et coll., 2001 ; Fauvel et coll., 2001). Cependant, si l'amélioration de la contractilité myocardique peut être liée à la diminution de la mort cellulaire par apoptose, l'inhibition des caspases est associée à d'autres phénomènes. Ainsi, en présence d'inhibiteur des caspases, la production de cytokines est diminuée (Wang et Lenardo, 2000). La voie des caspases peut participer à l'altération de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire, car l'activation de la caspase 3 par l'endotoxine entraîne une modification de la réponse des myofilaments au calcium, un clivage des protéines contractiles et une désorganisation sarcomérique (Lancel et coll., 2005a). De plus, la ciclosporine A, en bloquant le relargage de cytochrome c par les mitochondries, prévient la survenue de la dépression myocardique suggérant un rôle potentiel d'un pore mitochondrial MPT (Mitochondrial Permeability Transition) dans la cardiomyopathie septique (Fauvel et coll., 2002). La surexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-2, qui pourrait réguler l'ouverture de MPT, semble avoir également un rôle protecteur dans ce contexte (Lancel et coll., 2005b). Cependant, l'évolution de l'atteinte myocardique au cours du sepsis (récupération totale en 7-10 jours), relativise l'implication de l'apoptose cardiaque dans ce phénomène.

- Les récepteurs β -adrénergiques

En amont des modifications intrinsèques de contractilité au cours du choc septique, il est important de considérer les altérations des récepteurs β -ARs et de leurs voies de signalisation. En effet, ceux-ci sont impliqués dès l'induction du choc septique par le biais de l'activation du système sympathique (avec augmentation des concentrations plasmatiques de catécholamines) (Jones et Romano, 1984) conduisant à une altération de la régulation cardiovasculaire (Annane et coll., 1999). Le rôle des récepteurs β -ARs est d'ailleurs étayé par

le fait que les catécholamines ainsi que les agonistes β -ARs font partie de l'arsenal thérapeutique utilisé classiquement dans ce tableau de défaillance circulatoire.

Les études sur les récepteurs β -ARs myocardiques au cours du choc septique sont contradictoires. Sur des cardiomyocytes isolés, les cytokines (produites par application de LPS sur des macrophages) induisent une diminution de la réponse à l'isoprénaline, sans modification ni de la densité, ni de l'affinité des récepteurs β -ARs, l'activité de l'adénylate-cyclase n'étant pas modifiée (Joe et coll., 1998). Les mêmes constatations ont été faites dans un modèle de ligature-ponction cœcale chez le rat (Mansart et coll., 2003). Après avoir réalisé une bactériémie chez des rats, Boillot et coll. ne constatent pas de modification de la densité et de l'affinité des récepteurs β -ARs, mais une réduction de la synthèse d'AMPc après stimulation par l'isoprénaline (Boillot et coll., 1996). En revanche, l'incubation de cardiomyocytes de rats nouveau-nés par du sérum de patients en état de choc septique, produit une diminution de la densité des récepteurs β -ARs, de l'activité de l'adénylate cyclase, ainsi qu'une augmentation de la sous-unité α des protéines G_i (Reithmann et coll., 1993). Il est cependant important de souligner que ces patients étaient traités par de la noradrénaline, lors du prélèvement de sérum. Dans une situation proche du choc septique, un SIRS expérimental chez le rat (brûlure de 40% de la surface corporelle), l'affinité des récepteurs β -ARs est diminuée sans modification de leur densité. L'activité adénylate cyclase est également diminuée conduisant à une altération des mécanismes transductionnels (Wang et Martyn, 1996). Parallèlement, des travaux menés sur les effets du choc septique sur les voies de signalisation β -ARs dans les cellules mononucléées circulantes, démontrent une très nette diminution des taux d'AMPc intracellulaire après stimulation β -AR corrélée à une augmentation de l'activité des protéines G_i (Bernardin et coll., 2003). Il convient cependant de rester prudent avant d'étendre ces résultats aux cardiomyocytes.

Plusieurs travaux suggèrent que les modifications de réponses β -ARs myocardiques au cours du choc septique sont variables au cours du temps. Tang et coll. rapportent, dans un modèle de ligature-ponction cœcale chez le rat, une redistribution biphasique des récepteurs β -ARs en fonction de leur niveau de phosphorylation : au stade initial, il y a une externalisation des récepteurs β -ARs corrélée à une diminution de leur phosphorylation, alors qu'à un stade tardif une augmentation de la phosphorylation des récepteurs β -ARs s'accompagne d'une internalisation (Tang et coll., 1998). Une cinétique identique a été observée dans la régulation β -AR des canaux calciques de type L : sous l'effet d'une stimulation β -AR, les auteurs constatent une augmentation de ce courant 12h après l'injection de LPS, mais qui est suivie

d'une diminution significative après 36 H (Abi-Gerges et coll., 1999). Ces modifications pourraient être le reflet d'une augmentation de l'activité de l'adenylate cyclase au temps précoce, mais que celle-ci est transitoire du fait de l'internalisation des récepteurs β -adrénergiques associée à l'augmentation de l'expression des protéines G_i . La kinase des récepteurs β -ARs pourraient être également impliquée au cours du choc endotoxémique chez le rat, une étude rapportant une augmentation progressive de sa fraction membranaire et donc une facilitation de l'internalisation (Kadoi et coll., 2002).

2. Dysfonction vasculaire au cours du sepsis

La défaillance vasculaire est une constante au cours du choc septique. Elle se traduit par une vasodilatation intense, touchant à la fois le système artériel et veineux. Cette vasodilatation est responsable d'une chute de la postcharge cardiaque. De manière réactionnelle et compensatoire, plusieurs axes neurohumoraux sont activés (le système nerveux sympathique, l'axe rénine-angiotensine-aldostérone) et la sécrétion de vasopressine est augmentée (Schrier et Wang, 2004). Il est important de souligner que la chute des résistances vasculaires est répartie de manière inégale entre les organes et au sein d'un même organe. Les causes de cette hétérogénéité de distribution du flux sanguin sont mal connues. L'hypotension induite est relativement résistante aux agents vasoconstricteurs endogènes ou exogènes. Outre ces altérations de la vasomotricité, il existe des anomalies de perméabilité vasculaire et de coagulation qui impliquent une dysfonction endothéliale.

(a) Les mécanismes responsables de la vasodilatation

La vasodilatation réfractaire du choc septique est due à une perte de la fonction contractile de la cellule musculaire lisse vasculaire. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette défaillance contractile, notamment la mort de cellules vasculaires en raison d'une hypotension prolongée (Byrne, 1966), des anomalies d'extractions de l'oxygène par les tissus (Parillo, 1993) ou l'augmentation d'activité de prostaglandines ayant des propriétés vasodilatatrices (Bernard et coll., 1997). Certaines de ces hypothèses ont été testées cliniquement ou expérimentalement (comme l'augmentation d'apport d'oxygène (Yu et coll., 1993) et l'inhibition de synthèse des prostaglandines (Bernard et coll., 1997) avec un effet bénéfique très limité.

Des travaux plus récents ont clarifié les mécanismes sous-jacents à l'altération de la fonction contractile musculaire lisse vasculaire. Trois mécanismes par ailleurs communs à d'autres pathologies comme certaines intoxications (monoxyde de carbone, metformine), ou

d'autres états de choc (cardiogénique, hémorragique) sont impliqués : l'activation des canaux potassiques ATP-dépendant (K_{ATP}) de la membrane cytoplasmique de la cellule musculaire lisse, l'activation de la NO synthase inductible et le déficit en vasopressine (Landry et Oliver, 2001).

- Activation des canaux potassique ATP-dépendant dans les cellules musculaires lisses vasculaires

La vasoconstriction requiert l'activation de récepteurs membranaires présents sur la membrane plasmique des cellules musculaires lisses par leurs ligands spécifiques comme l'angiotensine II ou la noradrénaline. Cette activation engendre une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans le cytosol (par influx calcique depuis l'espace extracellulaire et par le biais de canaux calciques voltage-dépendants, mais aussi par recrutement des stocks intracellulaires). Le calcium va former un complexe avec la calmoduline et ce complexe active une kinase qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine. La phosphorylation de la myosine va permettre la stimulation de l'activité ATPasique de la myosine et ainsi, générer la contraction (Kamm et Stull, 1985) (Figure 21). Inversement, des vasodilatateurs tel que le peptide atrial natriurétique et le NO vont activer une kinase qui par interaction avec la myosine phosphatase, déphosphoryle la chaîne légère de la myosine et empêche la survenue d'une contraction.

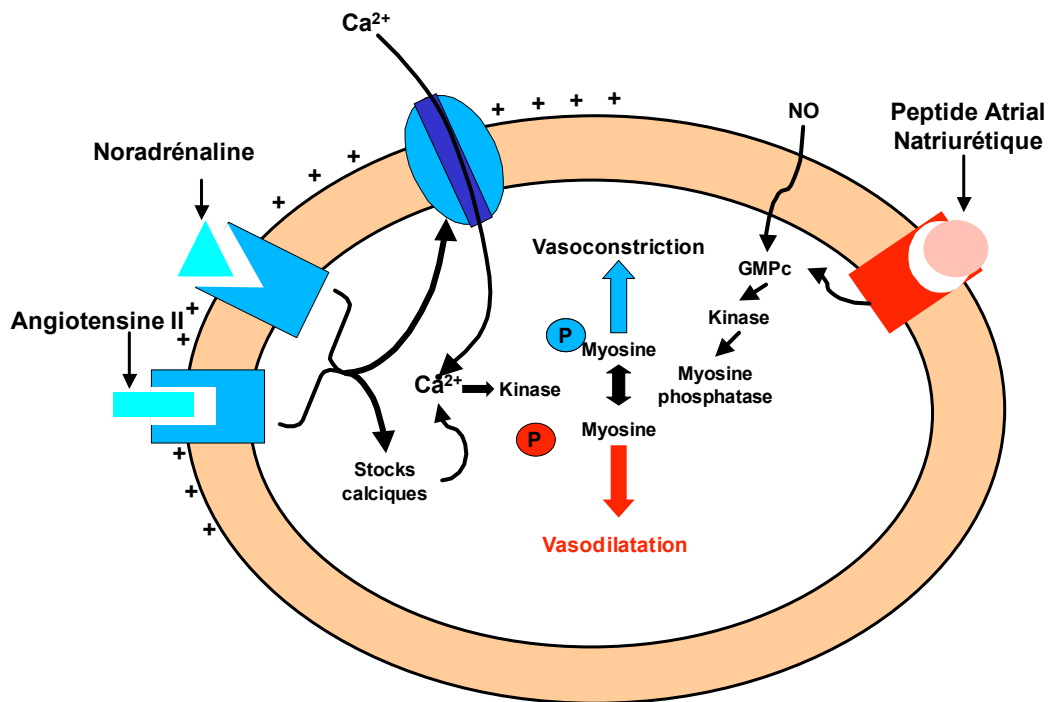


Figure 21 : Régulation du tonus musculaire lisse. La phosphorylation (P) de la myosine est l'étape critique de la contraction musculaire lisse. Par le biais de seconds messagers, des vasoconstricteurs comme l'angiotensine II ou la noradrénaline, induisent une augmentation du calcium cytosolique, qui active la kinase de la myosine. Des vasodilatateurs comme le peptide atrial natriurétique et le NO activent la phosphatase de la myosine qui en déphosphorylant la myosine, entraîne une vasorelaxation. La membrane plasmique est montré à un état de potentiel de repos (signes +).

Il a été démontré qu'en plus de ces mécanismes très connus, le potentiel de membrane de la cellule musculaire lisse joue un rôle majeur dans la contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire. Le potentiel membranaire de repos des cellules musculaires lisses est compris entre -30 et -60 mV suivant le type cellulaire. Une dépolarisation (potentiel plus positif) entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, augmente la concentration cytosolique de calcium et induit une contraction (Jackson, 2000). Inversement, une hyperpolarisation ferme ces canaux, diminue la concentration cytosolique en calcium et induit une relaxation. De plus, comme une vasoconstriction prolongée requiert une entrée de calcium extracellulaire dans la cellule, l'hyperpolarisation membranaire inhibe la vasoconstriction même en présence d'agents vasoconstricteurs (Jackson, 2000). Les canaux potassiques contribuent au potentiel membranaire de la cellule musculaire lisse. Parmi les 4

classes de canaux potassiques présentes sur la cellule musculaire lisse vasculaire (Jackson, 2005), les canaux potassiques ATP-dépendants jouent un rôle capital dans les chocs vasoplégiques.

L'ouverture des canaux K_{ATP} permet la sortie du potassium entraînant une hyperpolarisation et empêchant l'entrée de calcium. Ces canaux K_{ATP} sont activés physiologiquement par la diminution de la concentration intracellulaire d'ATP et par l'augmentation des concentrations d'ion H^+ et de lactate intracellulaire (Davies 1990; Quayle et coll., 1997) (Figure 22). Il apparaît que dans des conditions basales, les canaux K_{ATP} sont fermés et que leurs inhibiteurs tels que les sulfonylurées (antidiabétiques oraux) n'entraînent pas de vasoconstriction. Lors d'hypoxie ou d'augmentation du métabolisme tissulaire, l'activation de ces canaux est responsable d'une vasodilatation qui est inhibée par les sulfonylurées (Quayle et coll., 1997).

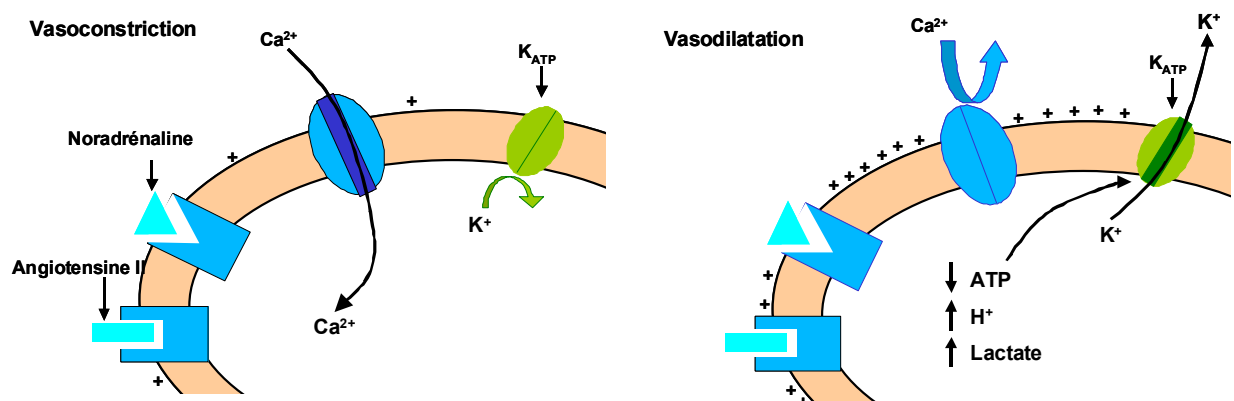


Figure 22 : Effets du potentiel de membrane sur la régulation du tonus vasculaire. Les vasoconstricteurs comme l'angiotensine II et la noradrénaline entraîne l'entrée de calcium dans la cellule musculaire lisse vasculaire par les canaux calciques voltage-dépendants, les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}) restant fermés. L'acidose lactique favorise la vasodilatation en activant les canaux K_{ATP} . La sortie de potassium par ces canaux, provoque une hyperpolarisation de la membrane plasmique et l'inactivation des canaux calciques voltage-dépendants.

L'activation des canaux K_{ATP} artériolaires est un mécanisme essentiel dans l'hypotension et la vasodilatation observées au cours du choc septique. Cela est démontré par les effets des sulfonylurées qui augmentent la pression artérielle et les résistances artérielles après administration de LPS (Landry et Oliver, 1992 ; Geisen et coll., 1996, Gardiner et coll.,

1999a). Néanmoins, l'intérêt de ces inhibiteurs reste discuté dans le cadre du choc septique (Preiser et coll., 2003), un essai clinique utilisant un bloqueur de ces canaux K_{ATP} chez des patients en état de choc septique n'a pas montré d'effet sur la restauration de la réactivité à la noradrénaline (Warrillow et coll., 2006). De plus, des substances présentes au niveau plasmatique en grande quantité au cours du choc septique peuvent activer les K_{ATP} : le peptide atrial natriurétique (ANP), le peptide associé au gène de la calcitonine (Calcitonin-related peptide), le VIP et l'adénosine (Brayden, 2002). Il faut également souligner que ces canaux sont activés par le NO de façon dépendante du GMPc (Murphy et Brayden, 1995 ; Wu et coll., 2004). Une étude récente rapporte que l'amélioration de l'hyporéactivité vasculaire par les corticoïdes pourrait, en partie, être due à la modulation de l'activité des K_{ATP} (d'Emmanuele di Villa Bianca et coll., 2003).

- Augmentation de synthèse de NO

Au cours du choc septique, l'augmentation de l'expression de la NO synthase inductible et donc de synthèse de NO sont pour une large part responsables de la vasoplégie constatée (Landry et Oliver, 2001). Cette augmentation concerne plusieurs types cellulaires, y compris au niveau vasculaire les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Titheradge, 1999). De plus, l'utilisation d'animaux transgéniques a démontré qu'en l'absence du gène codant pour la NO synthase inductible, il n'y a pas d'augmentation de la synthèse de NO au cours du sepsis (MacMicking et coll., 1995 ; Laubach et coll., 1995). Les mécanismes responsables de l'augmentation de l'expression de la NO synthase inductible et les facteurs de régulation transcriptionnelle sont imparfaitement connus. De plus, ces mécanismes diffèrent suivant le type cellulaire et l'espèce considérée (Kleinert et coll., 2004). Néanmoins, plusieurs cytokines sont impliquées : l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α , l'interferon γ (Kleinert et coll., 2004). Ces composés sont capables à eux seuls d'induire l'expression de la NO synthase inductible chez le rat et la souris. En revanche, chez l'homme, il semble qu'une association de plusieurs cytokines soit nécessaire. L'ensemble des signaux induisant l'expression de la NO synthase inductible, converge en général vers le système JAK/STAT (janus kinase/signal transducer and activator of transcription) et/ou le facteur de transcription NF- κ B (Kleinert et coll., 2004). Par ailleurs, il a été suggéré récemment que la NO synthase endothéliale pourrait être impliquée dans l'augmentation d'expression de la NO synthase inductible (Figure 23), ce qui lui conférerait un rôle « pro-inflammatoire » au cours du sepsis (Vo et coll., 2004 ; Connelly et coll., 2005). Inversement, le thromboxane A2 dont la synthèse est augmentée au cours du

choc septique (Bernard et coll., 1997), pourrait inhiber l'expression de la NO synthase inductible et limiterait l'hyporéactivité vasculaire (Yamada et coll., 2003).

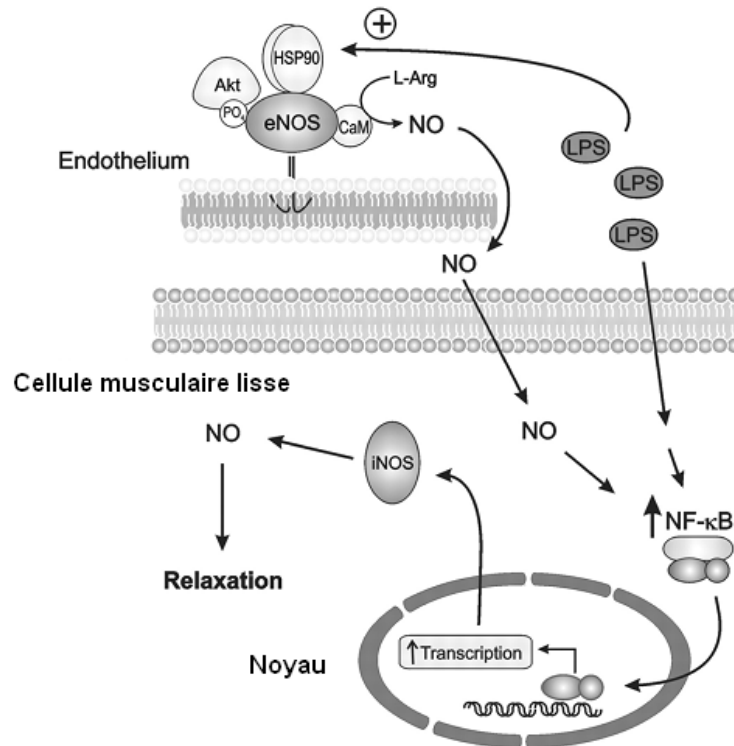


Figure 23 : Mécanisme de régulation par la NO synthase endothéliale de l'induction de la NO synthase inductible par le LPS. AKT : protéine kinase B ; CAM : calmoduline ; HSP90 : Heat Shock Protein 90; LPS : lipopolysaccharide; eNOS : NO synthase endothelial ; iNOS : NO synthase inductible..

L'inhibition non spécifique des NO synthases augmente la pression artérielle d'animaux en état de choc septique. Cependant, différentes études expérimentales démontrent l'effet délétère d'une telle inhibition sur la fonction de plusieurs organes et la survie (Fink, 1999 ; Cobb, 2001). Chez des souris génétiquement modifiées, dépourvues du gène codant pour la NO synthase inductible, il est constaté une très faible hypotension en réponse à l'administration d'endotoxine (MacMicking et coll., 1995). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la NO synthase inductible au cours du choc septique est actuellement en cours d'évaluation. Les résultats sont parfois contradictoires. Chez le rat, l'inhibition spécifique de la NO synthase inductible restaure l'hémodynamique après ligature-ponction cœcale, mais n'améliore pas les fonctions neurologiques des animaux (Kadoi et Goto, 2004). Dans un modèle de sepsis chez le mouton, cette inhibition n'a pas d'effet sur la pression artérielle (Enkhbaatar et coll., 2006). Certaines études remettent également en cause le rôle de la NO

synthase inductible dans l'hyporéactivité vasculaire (Heesen et coll., 1994 ; Wang et coll., 2004). Dans un modèle de ligature-ponction cœcale chez le rat, les auteurs constatent, que l'inhibition des NO synthases et de la guanylate cyclase soluble (GCs) ne permet pas de restaurer la réactivité musculaire lisse vasculaire (Wang et coll., 2004).

Le NO produit active la GCs dans la cellule musculaire lisse qui catalyse la transformation du GTP en GMPc. Les protéines kinases activées par le GMPc (PKG) exercent de nombreux effets responsables de la relaxation de la cellule musculaire lisse. L'effet vasodilatateur du NO est principalement dû à l'activation de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine et donc à la désensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+} (Landry et Oliver, 2001). Cependant, le NO peut également être responsable d'une vasodilatation par hyperpolarisation dépendant de divers canaux potassiques membranaires : B_{KCa} (Bolotina et coll., 1994 ; Archer et coll., 1994) ou K_{ATP} (Murphy et Brayden, 1995; Quayle et coll., 1997). L'intérêt tout particulier porté à ces canaux dans le cadre du choc septique, tient au fait qu'étant activé par le calcium cytosolique, une de leurs fonctions est de bloquer les effets d'agents vasoconstricteurs (Jaggar et coll., 2000). Cet effet permet d'expliquer le caractère réfractaire de nombreux états de choc (et en particulier le choc septique) aux vasoconstricteurs. Le NO peut activer ces canaux par le biais d'une PKG (Archer et coll., 1994) mais aussi directement par nitrosylation du canal (Bolotina et coll., 1994)

L'hyporéactivité vasculaire aux catécholamines et à l'endothéline au cours du choc septique est nettement améliorée par l'administration d'inhibiteur des NO synthases (Hollenberg et coll., 1993 ; Hollenberg et coll., 1997) et d'avantage encore si cet inhibiteur est spécifique de la NO synthase inductible (Pullamsetti et coll., 2006). La réponse vasopressive aux catécholamines est meilleure chez les souris génétiquement modifiées dépourvues du gène codant pour la NO synthase inductible (Hollenberg et coll., 2000).

- Déficit en vasopressine

La vasopressine a un effet hormonal antidiurétique sous le contrôle de la pression osmotique qui s'exerce au niveau du tubule collecteur du néphron. Cette neurohormone, intervient également dans l'homéostasie cardiovasculaire, et sa sécrétion se fait sous le contrôle d'un arc baroréflexe, et entraîne une vasoconstriction. Dans les conditions physiologiques, la vasopressine ne joue qu'un rôle mineur dans la régulation de la pression artérielle, mais en cas d'hypotension (comme après une hémorragie (Errington et coll., 1972) ou un choc septique (Wilson et coll., 1981), elle est sécrétée par la posthypophyse et ses taux plasmatiques augmentent. La vasopressine restaure le tonus vasculaire par quatre mécanismes connus : (i)

l'activation des récepteurs à la vasopressine de type 1 (V1) présents sur les cellules musculaires lisses vasculaires en grande densité, (ii) la régulation des canaux K_{ATP} , (iii) la régulation de la voie du NO et (iv) la potentialisation de l'effet des agents vasoconstricteurs et notamment des catécholamines. De plus, la vasopressine active les récepteurs V1 qui par le biais d'une protéine $G_{q/11}$ stimule la voie de la phospholipase C conduisant à l'augmentation intracellulaire d'inositol trisphosphate (IP_3) et de diacylglycérol. L'activation de la protéine kinase C (PKC) par ces seconds messagers provoque l'élévation du calcium intracellulaire et permet la contraction (Holmes et coll., 2004).

La vasopressine aurait la capacité de fermer les canaux K_{ATP} des cellules musculaires lisses vasculaires, favorisant ainsi la contraction (Wakatsuki et coll., 1992).

La vasopressine est capable par le biais des récepteurs V1 (Kusano et coll., 1997 ; Yamamoto et coll., 1997) d'inhiber la synthèse de NO synthase inductible après endotoxémie (Umino et coll., 1999). De plus, la vasopressine restaure le tonus vasculaire en bloquant l'élévation de $GMPC$ induite par le NO (Umino et coll., 1999) et l'ANP (Nambi et coll., 1986) par le biais de l'activation de la PKC.

La potentialisation de l'effet d'agents vasoconstricteurs par la vasopressine est bien connue, notamment pour la noradrénaline, (Noguera et coll., 1997) et l'angiotensine II (Caramelo et coll., 1990 ; Emori et coll., 1991 ; Iversen et Arendshorst, 1998). Toutefois, le mécanisme sous-jacent à cette potentialisation n'est pas connu.

(b) La défaillance endothéliale

L'endothélium joue un rôle central dans la physiopathologie du sepsis. Nous l'avons vu, il participe, par son activation, à l'extension de la réponse de l'hôte à l'agression par le microorganisme (*cf. supra*). L'endothélium participe à de multiples fonctions indispensables au maintien de l'homéostasie : régulation de la vasomotricité, perméabilité vasculaire sélective et prévention des phénomènes thrombotiques (Grandel et Grimminger, 2003). La dysfonction endothéliale constatée après une endotoxémie, peut-être due aux effets directs du LPS (Figure 24) ou aux médiateurs de l'inflammation secondairement sécrétés.

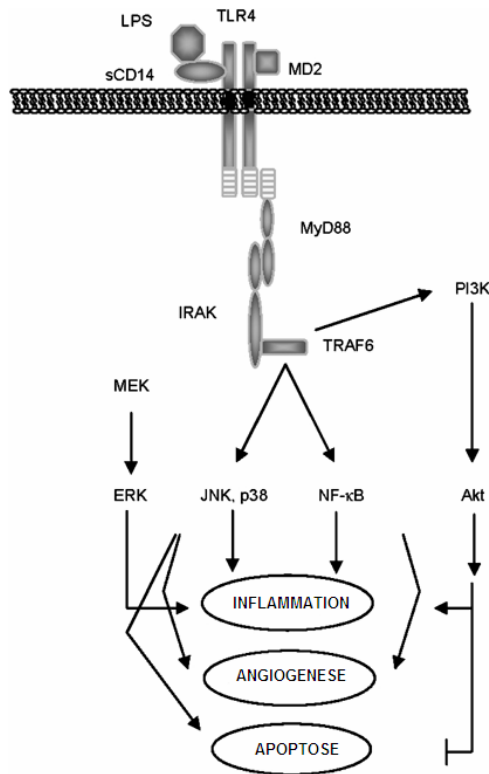


Figure 24 : Voies de signalisation activées par le LPS dans les cellules endothéliales. La stimulation des cellules endothéliales par le LPS conduit à une activation de TRAF6 qui induit l'activation de multiples voies de conduction (dont NFκB, et JNK) amenant à la production de molécules pro-inflammatoires. Ces mêmes voies de signalisation sont responsables de phénomène de bourgeonnement des cellules endothéliales. L'activation de TRAF6 est également responsable de l'activation de la voie PI3K/Akt qui stimule la synthèse de molécules inflammatoires mais inhibe aussi l'apoptose. Enfin ERK est susceptible d'être activée dans les cellules endothéliales indépendamment de l'activation de TRAF6. (D'après Dauphinee et Karsan, 2006)

- Vasomotricité

La cellule endothéliale sécrète de manière paracrine de nombreux agents capables de moduler le tonus vasculaire en agissant sur les cellules musculaires lisses (Sumpio et coll., 2002) (Tableau 8)

Agents vasoconstricteurs	Agents vasodilatateurs
Angiotensine	NO
Endothéline	PGE ₂ /PGI ₂
TXA ₂ /PGF _{2α}	EDHF
EDCF	
Radicaux libres	
Leucotriènes	

Tableau 8 : Agents vasoactifs synthétisés par les cellules endothéliales. TXA₂ : thromboxane A₂; EDCF : endothelial-derived contracting factor; PG : prostaglandine; EDHF : endothelial derived hyperpolarizing factor

Comme nous l'avons vu précédemment, le LPS va provoquer une augmentation de l'expression de la NO synthase inductible au niveau des cellules endothéliales, conduisant à une augmentation de la production de NO (Morikawa et coll., 2000)

- Perméabilité vasculaire

L'endothélium se comporte comme un filtre sélectif pour l'échange de macromolécules et de liquide du compartiment vasculaire vers les tissus environnants (Grandel et Grimminger, 2003). L'augmentation de la perméabilité vasculaire dépend de phénomènes de rétraction des cellules endothéliales et de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Yuan, 2002). Le LPS est capable d'induire la dépolymérisation de l'actine et d'augmenter la perméabilité vasculaire directement (Bannerman et coll., 1998a). L'endotoxine peut également être responsable par la voie des caspases, du clivage des protéines de jonction impliquées dans la régulation du transport entre l'espace intravasculaire et les tissus (Bannermann et coll., 1998b)

- Recrutement et adhésion leucocytaire

La diapédèse leucocytaire constitue une étape fondamentale dans tout processus inflammatoire et en particulier lors du sepsis, puisque cette diapédèse va permettre une accumulation de leucocytes au niveau du site d'infection (Kubes, 2002). La diapédèse leucocytaire est constituée d'une cascade d'événements divisée schématiquement en cinq étapes : (i) la capture, (ii) le roulement, (iii) le roulement lent et l'activation endothéliale, (iv) l'adhérence et l'étalement, (v) la migration transendothéliale. La phase de capture des

leucocytes à la surface endothéliale, requiert la présence sur les membranes cellulaires de molécules d'adhérence : la L-sélectine pour les leucocytes et la E- et la P-sélectine sur les cellules endothéliales (Kubes, 2002). Dans les phénomènes de roulement, les sélectines sont à nouveau sollicitées de même que les protéines de la famille des intégrines. Les intégrines sont des molécules hétérodimériques exprimées à la surface des leucocytes et qui facilitent l'association avec les molécules d'adhésions cellulaires (CAM : cell-adhesion molecule) sur la surface des cellules endothéliales activées (ICAM-1, VCAM-1) (Ulbrich et coll., 2003). Le LPS augmente directement l'expression de la E-sélectine et des récepteurs aux intégrines (Lush et coll., 2003) et la localisation nucléaire de NF- κ B augmente l'expression des molécules d'adhésion (Boyle et coll., 1998 ; Collins et coll., 1995). Chez les patients en état de choc septique, un taux élevé de sélectines endothéliales est corrélé à un mauvais pronostic (Cummings et coll., 1997). De plus, une souche de souris transgéniques déficientes pour les sélectines endothéliales présente une augmentation de la survie dans un modèle de choc septique (Matsukawa et coll., 2002)

- Hémostase

Dans les conditions normales, l'endothélium est maintenu dans un état d'anticoagulation par l'action de la thrombine à la surface des cellules endothéliales (Wu et Thiagarajan, 1996). La thrombine en se liant à la thrombomoduline clive la protéine C en une forme active, qui inhibe les facteurs activés de la coagulation, Va et VIIa (Dahlback et Villoutreix, 2005). Lors du sepsis, l'endothélium passe d'un état anticoagulant à un état procoagulant, par diminution d'expression des protéines anticoagulantes comme la thrombomoduline, favorisant ainsi la constitution de caillots de fibrine (Moore et coll., 1987 ; Pawlinski et Mackman, 2004). De plus, le LPS peut directement favoriser le passage à l'état procoagulant par augmentation de l'expression du facteur tissulaire par un mécanisme dépendant de NF- κ B (Parry et Mackman, 1995). L'ensemble contribue à la coagulation intravasculaire disséminée caractéristique des états de choc septiques.

(c) Microcirculation

Le rôle central de la microcirculation est de fournir un apport en oxygène suffisant aux cellules des différents tissus, ce qui lui confère une importance capitale. Lors du choc septique, Sakr et coll., ont montré que l'absence de correction de la dysfonction microcirculatoire dans les 24 H suivant le début d'un choc septique, était le seul facteur indépendant prédictif de l'évolution du patient (Sakr et coll., 2004).

La microcirculation est constituée par les vaisseaux (artérioles, capillaires et veinules) de diamètre inférieur à 100 μm . C'est au niveau de ces microvaisseaux que s'effectue les échanges gazeux. La structure et les fonctions de la microcirculation sont très hétérogènes suivant l'organe considéré. D'une manière générale, la pression sanguine, le tonus artériolaire et la rhéologie sont les principaux déterminants du débit microcirculatoire.

- Régulation de la microcirculation

Les mécanismes de régulation de la perfusion microcirculatoire sont : (i) myogéniques (régulation en fonction des contraintes mécaniques), (ii) métaboliques (régulation en fonction des pressions partielles en O_2 , CO_2 , des concentrations en lactate et en ion H^+) et (iii) neurohumoraux (Ince, 2005). Ce système de contrôle nécessite des interactions autocrines et paracrines pour adapter le flux sanguin microcirculatoire aux besoins en oxygène des tissus. Les cellules endothéliales jouent un rôle central dans ce système, et notamment comme « senseur » du flux sanguin, mais aussi des signaux métaboliques et des substances régulatrices de la contractilité des muscles lisses vasculaires et du recrutement capillaire (Vallet, 2002). La signalisation intercellulaire endothéliale permet la transmission en amont des informations sur les conditions hémodynamiques sous-jacentes (Lidington et coll., 2002).

- Altération de la régulation de la microcirculation

Les mécanismes d'autorégulation, et donc des fonctions de la microcirculation, sont profondément perturbés au cours du sepsis, et leur dysfonction est un élément essentiel dans la physiopathologie du sepsis (Spronk et coll., 2004). La dysfonction microcirculatoire est caractérisée par des anomalies hétérogènes du flux sanguin, avec des capillaires hypoperfusés, alors que d'autres ont un flux normal voire augmenté (Lam et coll., 1994 ; Nakajima et coll., 2001 ; De Backer et coll., 2002 ; Spronk et coll., 2002 ; Bateman et coll., 2003). Fonctionnellement très vulnérables, les unités microcirculatoires deviennent hypoxiques, ce qui explique le défaut d'extraction d'oxygène associé au sepsis (Lam et coll., 1994 ; Nakajima et coll., 2001 ; Goldman et coll., 2004 ; Ince et Sinaasappel, 1999 ; Sinaasappel et coll., 1999). Dans ces conditions, la pression partielle en O_2 au niveau de la microcirculation baisse en dessous de la pression partielle en O_2 veineuse. Cette différence est appelée le « pO_2 gap », qui est une mesure de la sévérité du shunt fonctionnel et qui est plus sévère dans le choc septique que dans le choc hémorragique (Ince et Sinaasappel, 1999 ; Sinaasappel et coll., 1999, Schwarte et coll., 2005) (Figure 25). C'est pour cela que le monitoring des variables hémodynamiques et d'oxygénation systémiques globales ne permet pas une détection satisfaisante de la défaillance microcirculatoire.

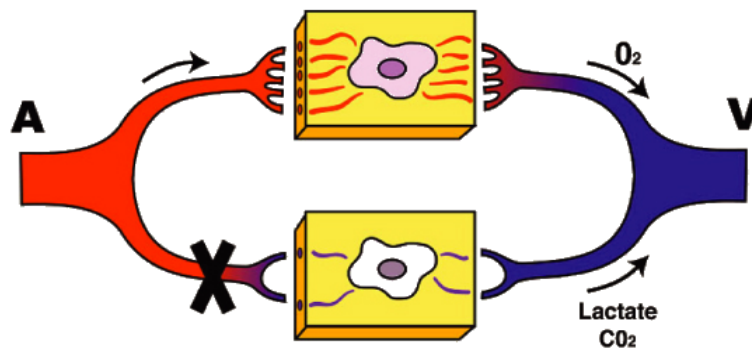


Figure 25 : Shunt fonctionnel observé au cours du choc septique dans une unité microcirculatoire. A : artériole ; V : veinule

Au cours du sepsis, les cellules endothéliales microcirculatoires perdent leurs fonctions régulatrices en raison de perturbations importantes de leurs voies de signalisation, de leurs interactions électrophysiologiques et de leur contrôle du tonus vasculaire (Lidington et coll., 2002; Vallet, 2002). Comme nous l'avons vu, un des éléments essentiels dans ces perturbations est la modification de la voie du NO, avec en particulier une augmentation hétérogène suivant les tissus de l'expression de la NO synthase inducible, responsable d'un effet shunt pathologique (Morin et coll., 1998; Revelly et coll., 1996). Comme la NO synthase inducible n'est pas exprimée dans tous les lits vasculaires, les zones où elle est absente présentent une vasodilatation moins importante et sont hypoperfusées (baisse de la pression de perfusion globale et constitution de thrombi). Les cellules musculaires lisses des artérioles qui régulent la perfusion des organes, perdent leur sensibilité aux catécholamines (Price et coll., 1999). Les globules rouges perdent leur déformabilité et ont tendance à former des agrégats (Piagnerelli et coll., 2003). Les globules rouges peuvent également jouer un rôle important dans la régulation du flux sanguin microcirculatoire, par leur capacité à sécréter du NO lors d'une hypoxie et donc entraîner une vasodilatation (Cosby et coll., 2003 ; Singel et Stamler, 2005). Cette propriété régulatrice des globules rouges est également affectée lors du sepsis. Ces différentes altérations, associées aux perturbations de l'hémostase, au cours du sepsis contribuent à aggraver la perfusion et la fonction microcirculatoire (Morin et coll., 1998 ; Revelly et coll., 1996). De plus, l'activation des leucocytes au cours des phénomènes inflammatoires entraîne la formation de radicaux libres qui altèrent directement les structures microcirculatoires, les interactions cellulaires et la coagulation (Cerwinka et coll., 2003; Martins et coll., 2003; Victor et coll., 2004). Ces radicaux libres et d'autres facteurs de l'inflammation altèrent la perméabilité vasculaire au niveau microcirculatoire, au niveau des

jonctions intercellulaires et potentiellement du glycocalyx endothélial. Cette augmentation de perméabilité est responsable de la constitution d'un œdème tissulaire important qui aggrave le défaut d'extraction de l'oxygène cellulaire (Fink, 2003 ; van den Berg et coll., 2003).

- Dysfonction mitochondriale

La part de l'hypoxie des unités microcirculatoires et/ou de la dysfonction mitochondriale associée au sepsis reste un sujet de controverse dans le défaut d'extraction de l'oxygène tissulaire (Ince et Sinaasappel, 1999 ; Fink, 1997). Dans le cœur de rat, l'endotoxémie à un stade précoce peut induire des zones d'hypoxie au niveau microcirculatoire (Ince et Sinaasappel, 1999 ; Avontuur et coll., 1995). Cependant, dans ce modèle, aucune dysfonction mitochondriale n'a été mise en évidence (Ince, 2005). Il est possible qu'initialement le sepsis s'accompagne ou soit potentiellement dû à une dysfonction de la microcirculation, évoluant jusqu'à une forme tardive sévère, où le sepsis est responsable d'une dysfonction mitochondriale. Brealey et coll. ont montré que la dysfonction endothéliale joue un rôle important dans le sepsis où le niveau de dysfonction mitochondriale est corrélé à l'évolution du patient (Brealey et coll., 2002). La défaillance mitochondriale associée au sepsis contribue à la détresse respiratoire, en particulier dans les zones hypoxiques (Dubois et coll., 2003) et conduit donc à la défaillance multiviscérale.

- Syndrome de détresse microcirculatoire et mitochondriale

La réanimation de la détresse circulatoire du sepsis, basée sur la correction des variables systémiques globales d'hémodynamique et d'oxygénation, mais où la dysfonction microcirculatoire persiste, a été désignée comme le syndrome de détresse microcirculatoire et mitochondriale (Ince, 2005). Ce concept a été développé afin de rendre compte des anomalies masquées du transport d'oxygène et de la respiration cellulaire lors du choc septique et qui peuvent être responsable d'une défaillance multiviscérale (Figure 26). Les éléments définissant la nature et la sévérité du sepsis comprennent la nature de l'agression initiale, les facteurs de comorbidité, les déterminants génétiques, les traitements antérieurs et le délai de prise en charge.

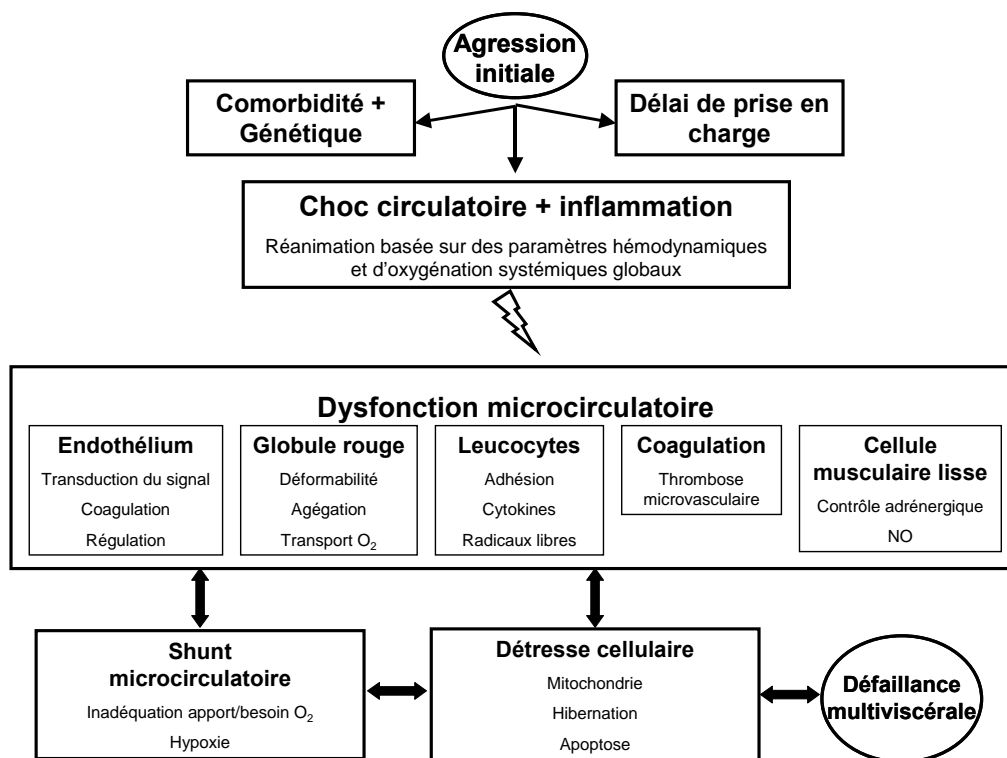


Figure 26 : La microcirculation, pierre angulaire du sepsis. La détresse circulatoire peut être déclenchée par de nombreux phénomènes comme le traumatisme, l'infection et l'état de choc. Son traitement est initialement basé sur la correction des perturbations systémiques. La détresse microcirculatoire peut persister et être difficilement détectable, une situation définitive comme le syndrome de détresse microcirculatoire et mitochondrial. Le délai de prise en charge et le traitement, participe également à sa constitution. Sans traitement efficace de ce syndrome, les différents constituants cellulaires et inflammatoires de cette défaillance interagissent et aggravent la situation, conduisant à un stade ultime à la défaillance multiviscérale. (Daprès Ince, 2005).

(d) Les récepteurs adrénérgiques vasculaires au cours du choc septique

Il est établi depuis de nombreuses années qu'il existe une altération de la réactivité vasculaire aux catécholamines au cours du choc septique (Annane et coll., 1998). Cette hyporéactivité est en générale mise en grande partie sur le compte de l'induction de la NO synthase de type II (*cf supra*). Néanmoins, un certain nombre de travaux révèle que cette hyporéactivité persiste chez de nombreux patients alors même qu'il est constaté une diminution de l'activité de la NO synthase inductible (Szabo et coll., 1994). De même, la réponse aux agents vasoconstricteurs n'est que partiellement rétablie chez des rats septiques par les inhibiteurs des NO synthases (Takakura et coll., 1994). Certaines études rapportent également que l'expression de la NO synthase inductible est limitée au tissu où se situe l'infection (Annane et coll., 2000a). Il a été proposé que les radicaux libres dont la production est augmentée sous l'effet du LPS, pourraient induire une inactivation des catécholamines (l'exposition des catécholamines à des radicaux libres conduit à la génération d'adrénochromes, qui sont des composés ayant potentiellement des effets cytotoxiques) (Macarthur et coll., 2000). Ces mêmes radicaux libres pourraient être à l'origine d'une modification directe des récepteurs adrénérgiques. Le peroxy-nitrite induit par exemple une diminution de l'affinité des récepteurs α_1 -ARs pour la noradrénaline (Takakura et coll., 2002). Des phénomènes d'internalisation des récepteurs α_1 -ARs ont également été évoqués (Pleiner et coll., 2002), comme cela a été montré au niveau cardiaque (Wu et coll., 1997). L'ensemble de ces données suggère une anomalie de transduction du signal des récepteurs α_1 -ARs au niveau vasculaire.

En ce qui concerne les récepteurs β -ARs vasculaires, leur importance a été essentiellement soulignée dans leur rôle sur la perfusion hépatosplanchnique. Leur activation permet d'augmenter le flux sanguin hépatosplanchnique et l'extraction tissulaire en oxygène (Zhang et coll., 2001). Il est établi que la relaxation β -AR vasculaire au cours du choc septique est altérée (Donalton et Myers, 1996 ; Mallem et coll., 2003). Cette altération est dépendante du lit vasculaire considéré. Ainsi, au niveau pulmonaire, l'altération de la vasodilatation induite par l'isoprénaline semble être plus importante qu'au niveau aortique (McIntyre et coll., 1997). Aucune étude ne se penche précisément sur les sous-types de récepteurs β -ARs impliqués. Certains auteurs, soulignent néanmoins l'effet protecteur des agonistes β_2 -AR sur la dysfonction vasculaire induite par le sepsis (Wu et coll., 2000). Cette action préventive est due à l'inhibition de la production de TNF- α et de NO par la NO synthase inductible mais aussi à l'augmentation de production d'IL-10. Ceci suggère donc une

action des agonistes β_2 -AR sur la réaction inflammatoire vasculaire chez les animaux endotoxémiques.

D. Modèle expérimentaux de sepsis

Durant les 20 dernières années, des résultats encourageants sur le traitement du choc septique (agents immunomodulateurs notamment) ont été obtenus sur des modèles animaux. Malheureusement, les résultats des essais cliniques menés chez l'homme n'ont pas montré de bénéfice évident pour les patients (Deans et coll., 2005), et de nombreux paramètres restent à définir pour cibler ces thérapeutiques. Un facteur de l'échec apparent de ces essais, est le caractère inappropriée des modèles animaux utilisés à la phase préclinique. Le modèle idéal, devrait être simple, reproductible avec une agression initiale suivant une voie et une intensité proche de ce qui est observé en clinique humaine. L'animal devrait présenter des signes patents de sepsis avec un profil bactériologique et/ou de sécrétion de cytokines adapté. La réponse devrait être graduée depuis une réaction localisée, puis systémique et enfin une défaillance multiviscérale. (Parker et Watkins, 2001). Plusieurs modèles de sepsis existent actuellement (Tableau 9), les plus populaires étant l'injection de LPS (intraveineuse ou intrapéritonéale) et la péritonite par ponction-ligature cœcale.

Modèle	Agent pathogène	Administration
Endotoxémie	LPS : <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i>	Intraveineuse Intrapéritonéale Orale
Bactériémie	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Intraveineuse Intrapéritonéale
Formation d'abcès	<i>Staphylococcus</i> , <i>Bacteroides fragilis</i>	Intramusculaire Sous-cutanée Intra-abdominale
Pneumopathie	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Intranasale Intratrachéale Intraveineuse
Péritonite	Selles autologues ou hétérologues Flore digestive indigène : <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i> , streptocoques anaérobies	Intrapéritonéale Ligature-ponction cœcale

Tableau 9 : Les différents modèles de sepsis (d'après Parker et Watkins, 2001).

1. Sélection de l'espèce animale

Les petits animaux sont fréquemment utilisés dans la recherche sur le sepsis en raison de leur faible coût et la simplicité de la logistique. La survie constitue le critère de jugement habituel. Les gros animaux permettent un monitoring invasif plus simple. Le porc est assez souvent utilisé en raison de ses grandes homologues anatomiques et physiologiques avec l'homme. L'utilisation des primates et des chiens est limitée pour des raisons éthiques et logistiques.

La sensibilité au LPS varie suivant les espèces (Redl et coll., 1993; Jesch et coll., 1997). De plus, à l'intérieur d'une même espèce, la réponse à l'infection peut varier suivant plusieurs facteurs. Le sexe (Losonczy et coll., 2000), l'âge (Wachulec et coll., 1997), le régime alimentaire (Spolarics et Meyenhofer, 2000), le stade du cycle menstruel (Zellweger et coll., 1997) influencent la résistance à l'infection. Les rats nouveau-nés ont des capacités limitées de résistance à l'infection qui augmentent rapidement avec l'âge (Lassiter et coll., 1997).

2. Modèles d'endotoxémie

Le LPS, composé stable et relativement pur, administré en perfusion prolongée ou en bolus, constitue un modèle simple et aisément réalisable de sepsis. Les petits animaux et les babouins sont relativement résistants aux effets de l'endotoxine, alors que les lapins, moutons et chimpanzés présentent une sensibilité accrue (McCuskey et coll., 1984). Une dose létale est définie pour chaque type de LPS, celle-ci étant variable suivant l'espèce concernée. Par exemple, la dose létale du LPS de *Bacteroides fragilis* est 700 fois inférieure à celle de *Salmonella* chez la souris. Bien que peu d'auteurs les aient comparés, les différents LPS suivant leur origine bactérienne, peuvent influencer les effets observés dans un même modèle.

Chez le rat, il est classiquement admis qu'une forte dose de LPS en bolus induit une vasodilatation, un collapsus cardiovasculaire et un décès précoce. A l'opposé, une dose plus faible engendre une réponse cardiovasculaire hyperdynamique, avec une augmentation précoce du débit cardiaque (Parker et Watkins, 2001). Néanmoins, pour certains auteurs, le profil hémodynamique après injection de LPS n'est pas aussi simple que cela. Après injection d'endotoxine en bolus chez le rat conscient, l'hypotension précoce et profonde constatée se fait en absence de vasodilatation rénale et mésentérique et serait dans ce cas secondaire à une chute importante du débit cardiaque (Gardiner et coll., 1999b). De plus, au cours de l'administration prolongée de LPS, bien qu'il apparaisse une vasodilatation, celle-ci varie suivant les organes et le temps (Gardiner et coll., 1995).

L'endotoxémie présente l'avantage d'être de réalisation aisée, reproductible et induisant une réponse dose-dépendante. Elle permet de plus de « limiter » les voies de signalisations impliquées. En revanche, les effets observés sont probablement assez éloignés des tableaux retrouvés lors de sepsis de développement plus lent, secondaires à une infection mono voire polymicrobienne. Il faut plus parler de « LPS Challenge » que de véritable sepsis.

3. Perfusion intraveineuse de bactéries

De nombreux travaux ont étudié la réponse à l'administration intraveineuse de bactéries vivantes. De multiples espèces bactériennes ont été étudiées, la plus commune étant *Escherichia coli*. Comme pour l'endotoxémie, la quantité de microorganismes et la durée de perfusion vont considérablement influencer la réponse observée. Chez les petits animaux, des doses faibles d'*Escherichia coli* perfusées pendant plusieurs heures n'entraînent que des effets précoces et modérés, alors que des doses massives sont responsables d'une réponse biphasique avec d'abord une augmentation du débit cardiaque associée à une vasodilatation, puis une chute secondaire du débit cardiaque (Parker et Watkins, 2001).

4. Modèles de péritonites

Les péritonites sont induites chez l'animal de différentes manières. Il peut s'agir d'inoculation intrapéritonéale de LPS, de bactéries ou de matières fécales. D'autres modèles consistent en une ligature d'un segment digestif, conduisant au développement d'une péritonite. L'inconvénient de cette méthode est le caractère imprévisible du début de la péritonite qui dépend de la survenue d'une perforation. Pour s'affranchir de ce problème, Wichterman et coll. ont proposé un modèle simple de ligature et de perforation cœcales (Wichterman et coll., 1980). Une ligature du cæcum est réalisée à distance de la valvule iléocœcale et une ponction du cæcum est réalisée. La mortalité va dépendre du nombre et de la taille de la perforation (déterminée par la taille de l'aiguille) (Baker et coll., 1983). Il s'agit bien entendu d'un modèle de sepsis polymicrobien qui dépend de la composition de la flore bactérienne colique de l'animal.

Chez le rat, la réponse cardiovasculaire à ce type d'intervention, se caractérise par une phase précoce (5h après l'intervention), hyperdynamique avec une augmentation du débit cardiaque, de la perfusion tissulaire (Wang et Chaudry, 1996), une augmentation de l'apport et de la consommation d'oxygène (Yang et coll., 1999) et une diminution des résistances périphériques (Wang et Chaudry, 1996). Cette phase est suivie par un état tardif (20 à 24 H après l'intervention) hypodynamique caractérisé par une diminution du flux sanguin

microvasculaire dans différents tissus (Wang et coll., 1992; Wang et Chaudry, 1996) et une diminution de l'apport en oxygène (Yang et coll., 1999) ainsi qu'une augmentation des résistances périphériques (Wang et Chaudry, 1996). Il est important de signaler que pour l'ensemble des modèles, les soins peropératoires (type d'anesthésie, remplissage vasculaire), postopératoires (remplissage vasculaire, analgésie, réchauffement) et les conditions de mesures (sur animal conscient, sous anesthésie, type d'anesthésique) sont autant d'éléments susceptibles d'influencer les résultats observés. Cependant, dans la littérature, ces différents paramètres sont très variables, comme le sont du reste les formes et les tableaux observés en clinique humaine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Etude de la vasomotricité

A. Modèles expérimentaux

Dans le cadre de ces expériences, des artères de conductance dont la lumière est d'environ 1 mm de diamètre ont été utilisées. Ces artères ont une paroi constituée de 3 couches concentriques : l'*intima*, la *media* et l'*adventice* (Figure 27). Dans un certains nombre de protocoles expérimentaux, l'*adventice* et/ou l'*intima* (correspondant pour l'essentiel à l'endothélium) ont été retirées.

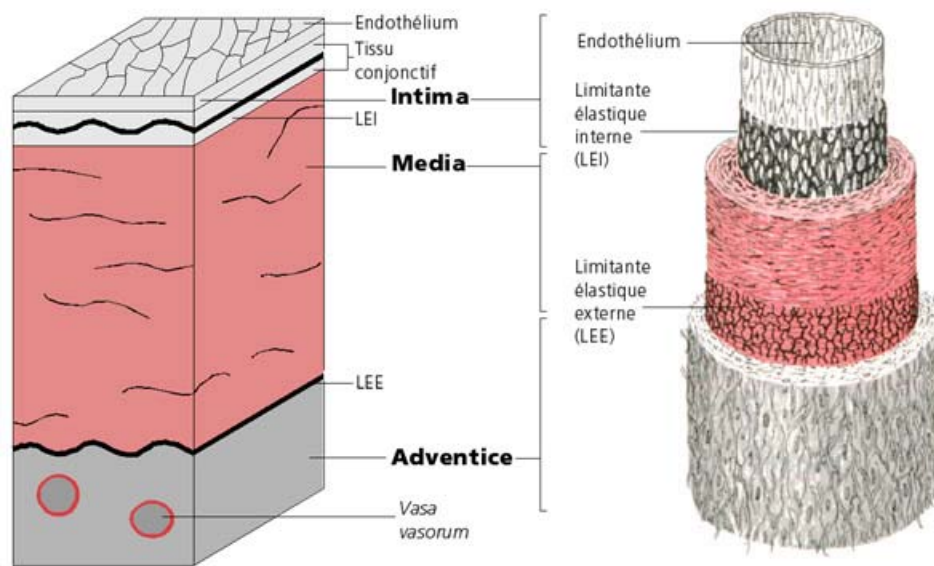


Figure 27 : Structure de la paroi artérielle.

1. Artère mammaire interne humaine

Les artères mammaires internes (AMI) sont prélevées au cours de pontages aorto-coronariens chez des patients présentant une insuffisance coronarienne d'origine athéromateuse (intervention réalisée dans le service de chirurgie cardiothoracique et vasculaire du CHU de Nantes). La Figure 28 illustre sommairement le principe du pontage aortocoronarien, qu'il soit réalisé avec les AMI ou avec des greffons veineux libres.

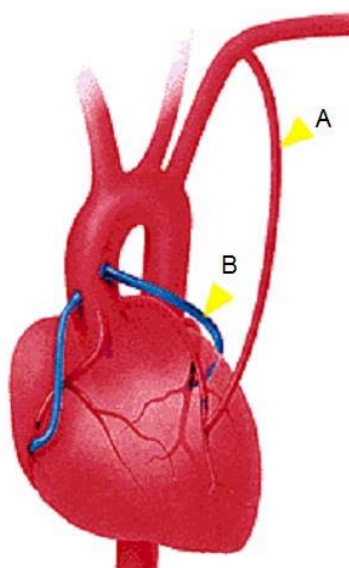


Figure 28 : Représentation schématique des deux principaux types de pontage aortocoronarien : artériel en utilisant l'artère mammaire interne gauche en respectant son origine (A) et veineux par un fragment libre de la veine saphène interne (B).

Avant circulation extracorporelle, le chirurgien prélève le pédicule mammaire interne sur une longueur maximale en évitant de manipuler l'artère elle-même. En fonction de la longueur nécessaire pour l'intervention, l'extrémité distale (proche de la bifurcation en artère musculophrénique et artère épigastrique supérieure) (Figure 29) de ce greffon est éliminée. C'est cette extrémité, considérée comme déchet chirurgical qui nous est confiée.

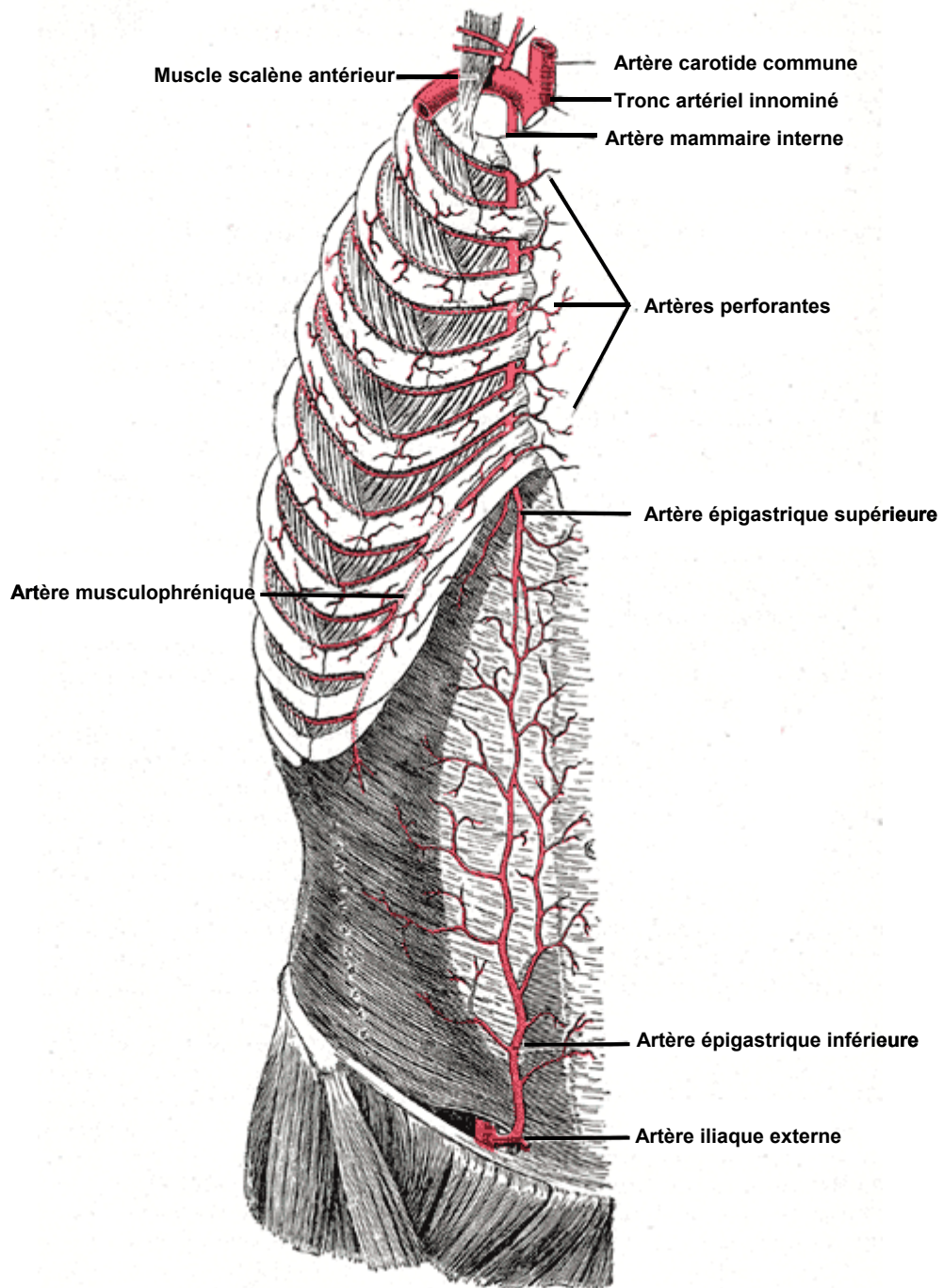


Figure 29 : Anatomie de l'artère mammaire interne (Henry Gray : *Anatomy of the Human Body*. 1918).

Le prélèvement est transporté le plus rapidement possible jusqu'au laboratoire dans une solution de Tyrode (Tableau 10) à température ambiante. Une fiche de renseignements concernant le patient (âge, sexe, principaux antécédents, traitement préopératoire, nature de l'intervention) est complétée au moment de l'envoi du prélèvement. Les prélèvements ne subissent aucun traitement local qui serait de nature à modifier leur vasomotricité (notamment par des inhibiteurs des phosphodiésterases telle que la papavérine).

Dès leur réception, les AMI sont déposées dans une boîte de Pétri contenant de la solution de Krebs (Tableau) à température ambiante préalablement oxygénée avec du carbogène (95 % O₂, 5 % CO₂). Les AMI sont alors isolées des tissus conjonctifs et graisseux environnants et coupées en anneaux de 4 mm de long.

Composés	mM
NaCl	130
KCl	5,6
MgCl ₂	1
CaCl ₂	2
Glucose	11
HEPES	8
pH	7.4

Tableau 10 : Composition du Tyrode-HEPES de transport vasculaire.

Composés	mM
NaCl	118.3
KCl	4.7
MgSO ₄ -7H ₂ O	1.2
KH ₂ PO ₄	1.2
NaHCO ₃	20
glucose	11.1
EDTA	0.016
CaCl ₂ -2H ₂ O	2.5
O ₂	≈ 75 KPa
CO ₂	≈ 3.5 KPa

Tableau 11 : Composition et paramètres gazeux de la solution de Krebs.

2. Aorte thoracique de rat

(a) Rats Sprague-Dawley

Les rats mâles Sprague-Dawley (élevage Janvier, France) sont nourris avec un aliment standard et de l'eau fournis *ad libitum*. Les rats livrés sont laissés au repos au moins une semaine avant d'être utilisés. Pour nos expériences, les rats sont âgés de 10 semaines, avec un poids compris entre 350 et 450 g. Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Comité d'Ethique local.

(b) Rats Sprague-Dawley endotoxémiques

Les rats sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (Forène®, Abbott), un gaz halogéné, grâce à un système d'anesthésie inhalée (TEM, France). L'induction est réalisée par isoflurane à 5 % en quelques min. dans une chambre d'induction. Les rats sont retirés de la chambre d'induction et laissés en ventilation spontanée. L'entretien de l'anesthésie est assuré par un masque placé sur le museau de l'animal, permettant de délivrer un mélange oxygène pur/isoflurane (fraction inspirée entre 2 et 3%). Une dose de 5 mg/kg de LPS (*Escherichia coli*, O111B4, Sigma) diluée dans 1 ml de sérum physiologique est injectée en intraveineux (veine dorsale de la verge). Un volume équivalent de sérum physiologique est injecté aux rats contrôles. Pour leur réveil et durant les 3 H qui précèdent leur sacrifice, les animaux sont placés dans une cage où de l'eau leur est fournie *ad libitum*.

(c) Prélèvement de l'aorte thoracique de rat

Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (30 mg/kg ; Sanofi, France). L'aorte thoracique est prélevée et déposée dans une boîte de Pétri contenant la solution physiologique de Krebs à température ambiante préalablement saturée avec du carbogène (95 % O₂, 5 % CO₂) dont la composition est indiquée dans le Tableau 11. Les tissus conjonctifs et adipeux sont retirés et l'aorte est sectionnée en anneaux de 3 à 4 mm de long.

B. Etude hémodynamique

Après une induction de quelques minutes par isoflurane à 5% dans une chambre d'induction (*cf.* Rats Sprague-Dawley endotoxémiques utilisés pour les études de vasomotricité), les rats sont retirés de la chambre d'inhalation et laissés en ventilation spontanée. L'entretien de

l'anesthésie est assurée par un masque placé sur le museau de l'animal, permettant de délivrer un mélange oxygène pur/isoflurane. Le débit d'oxygène pur est réglé à 0,4 l/min. et la fraction inhalée d'isoflurane abaissée à 2%. L'animal est placé sur un tapis chauffant (Tronic, Allemagne) permettant le maintien d'une température centrale autour de 37°C. La région cervicale droite est rasée et désinfectée à l'aide d'une solution iodée (povidone iodée, Bétadine dermique® 10%, ASTA Médica). Après incision cervicale verticale, la carotide interne droite est disséquée, isolée. Le cathéter de mesure de pression artérielle 2F (SPR-407 Microtip catheter ; Millar instruments, USA) est introduit après réalisation d'une incision longitudinale d'environ 1 mm. Le signal est amplifié et enregistré grâce au logiciel IOX® (EMKA technologies, France). L'analyse des courbes de pression intra-artérielle permet de déterminer les paramètres suivants :

- Fréquence cardiaque
- Pression artérielle systolique (PAS)
- Pression artérielle diastolique (PAD)
- Pression artérielle moyenne (PAM), cette valeur est calculée par le logiciel IOX® (EMKA technologies) de la façon suivante $PAM = 2/3 PAD + 1/3 PAS$

Après stabilisation des différents paramètres hémodynamiques, l'injection de LPS ou de sérum physiologique est réalisée suivant le protocole précédemment décrit. Les mesures sont faites sur 3 H : toutes les 3 min. pendant les 15 premières min. puis toutes les 15 min. pendant les 165 min. restantes.

C. Etude en cuves à organes isolés

1. Dispositif expérimental

Nous disposons au laboratoire de deux ensembles de quatre cuves à organes isolés (EMKA Technologies, France) (Figure). Chaque cuve est placée dans une enceinte thermostatée à 37°C par une pompe de thermorégulation. Un bulleur en verre fritté assure la saturation de la solution physiologique avec un mélange gazeux (O₂ 95% ; CO₂ 5%) qui permet de maintenir le pH à 7,4. Un réservoir de solution de Krebs maintenu sous pression et des robinets à trois voies assurent le remplissage des cuves. Un réservoir de vide permet l'ajustement du volume des cuves à 10 ml et leur vidange.

Chaque cuve est surmontée d'un capteur de force (IT2, EMKA Technologies) dont le déplacement vertical sur une crémaillère est assuré par une vis micrométrique. Les capteurs de force sont des transducteurs mécano-électriques.

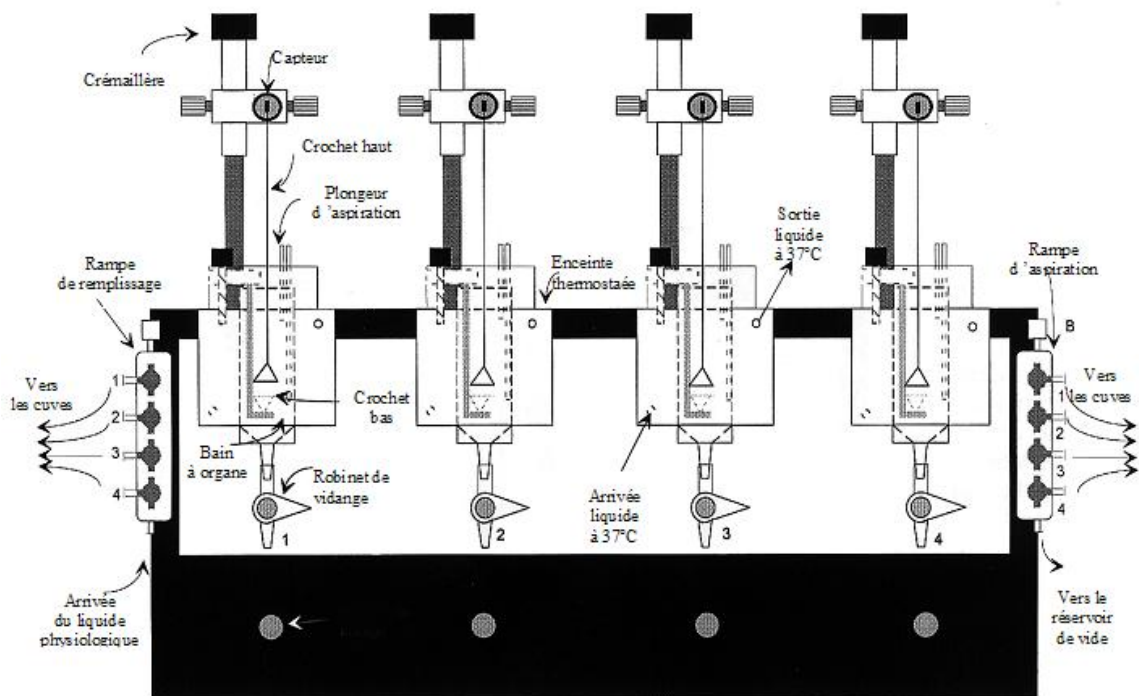


Figure 30 : Représentation schématique d'un ensemble de 4 cuves à organes isolés (EMKA Technologies)

Les anneaux vasculaires sont placés sur deux crochets en acier inoxydable. L'un des crochets repose sur la tige du capteur alors que l'autre est fixe et solidaire du support du bulleur. L'ensemble de ce système est ensuite descendu dans la cuve afin que les anneaux soient complètement immergés dans la solution de Krebs (Tableau 11). Le signal électrique correspondant à la tension isométrique développée est amplifié (Amplificateur 4 voies, EMKA Technologies) puis enregistré grâce au logiciel d'acquisition IOX (EMKA Technologies). Les tensions sont exprimées en grammes.

2. Protocoles expérimentaux

Une tension dite « de repos » est appliquée aux anneaux en les étirant à l'aide d'une vis micrométrique. Cette tension de repos revêt une importance particulière, puisque elle va influencer la réponse du vaisseau aux agents contractants. Cette tension est différente en fonction de chaque type de vaisseau : 2,5 g pour les anneaux d'artère mammaire interne, 2 g pour les anneaux d'aorte thoracique des rats Sprague-Dawley.

Après une période de stabilisation de 30 min., les anneaux vasculaires sont contractés deux fois avec du KCl (90 mM) puis rincés, afin d'équilibrer le potentiel membranaire. Cela permet de stabiliser les préparations et d'assurer des réponses reproductibles par la suite.

L'intégrité de l'endothélium est vérifiée par l'application d'acétylcholine sur des anneaux intacts pré-contractés avec la phényléphrine, un agoniste α_1 -adrénergique. L'acétylcholine, un agoniste des récepteurs muscariniques, entraîne la production de facteurs vasodilatateurs par les cellules endothéliales lorsqu'elles sont fonctionnelles (Figure 31). Dans le cas d'expériences réalisées sur des anneaux dont l'endothélium a été abrasé, la désendothélialisation est confirmée par l'absence de relaxation à l'acétylcholine. Suite à ce test, les anneaux sont rincés plusieurs fois.

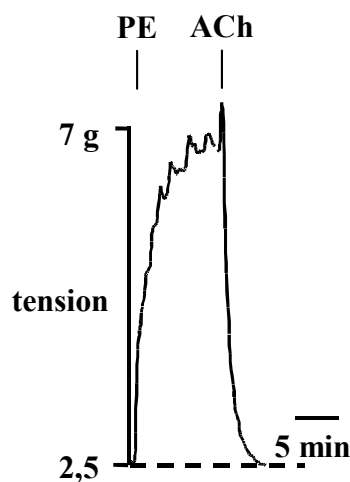


Figure 31 : Exemple de relaxation obtenue après application de $1 \mu\text{M}$ d'acétylcholine sur un anneau artérielle d'artère mammaire interne précontracté par $1 \mu\text{M}$ de phényléphrine.

Pour déterminer les concentrations d'agent vasoconstricteur (phényléphrine, endothéline-1) nécessaires pour atteindre les niveaux de précontraction souhaités, des courbes concentrations-contractions sont réalisées.

Lorsque le niveau de tension de repos est restauré, certains anneaux sont soumis à un traitement de 30 min. par différents agents pharmacologiques suivant le protocole choisi (nadolol, L-748,337, nébivolol, L-NMMA, etc).

Pour réaliser les courbes de relaxation, les anneaux sont alors précontractés avec la phényléphrine ou l'endothéline. La concentration d'agoniste utilisée est variable selon le type de prélèvement vasculaire utilisé, l'objectif étant d'obtenir 80% de la contraction maximale (EC_{80}). Dans le cas de l'étude des anneaux aortiques de rat endotoxémiques, les concentrations de phényléphrine ont été déterminées de façon à produire des niveaux de

précontractions comparables (en pourcentage de la contraction maximale) sur les vaisseaux contrôles et pathologiques. Des courbes concentration-relaxation cumulatives sont construites en présence de différents agonistes vasodilatateurs à partir du plateau de précontraction. Les relaxations obtenues en réponse aux agonistes β_3 -ARs (SR 58611A par exemple) présentent une cinétique lente et atteignent un état stable après une longue durée (10 à 20 min. pour chaque concentration). Afin de s'affranchir d'une évolution de l'état contractile de chaque anneau en fonction du temps, la relaxation spontanée est mesurée sur des anneaux témoins en absence d'agoniste β_3 -AR. Pour chaque concentration d'agoniste β_3 -AR, la vasodilatation spontanée correspondante est retirée.

D. Analyse statistique

La contraction obtenue pour différentes concentrations de phényléphrine ou d'endothéline-1 est exprimée en g ou en pourcentage de la contraction maximale.

La relaxation est exprimée en pourcentage de la tension développée sous phényléphrine ou endothéline-1 avant l'ajout de la première concentration de substance vasorelaxante.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm erreur standard (S.E.M) de n expériences.

L'analyse statistique de l'effet d'une substance sur la relaxation est calculée à l'aide d'un test d'analyse de variance (ANOVA) à une voie. Les effets des pré-traitements ou des pathologies sur les courbes concentration-relaxation sont analysés à l'aide d'un test ANOVA à deux voies (concentration, traitement ou pathologie). Une valeur de $P < 0,05$ étant considérée comme significative.

La puissance des agonistes est déterminée à partir des courbes concentration-relaxation. La concentration de l'agoniste produisant la moitié de l'effet maximal (EC_{50}) est calculée par modélisation mathématique des courbes avec l'équation de Boltzmann :

$$f = a + d [1 + (x / c)^b]^{-1}$$

avec :

a : relaxation minimale

d : relaxation maximale

f : pourcentage de relaxation

c : valeur au point d'inflexion (EC_{50})

x : concentration d'agoniste

b : coefficient de Hill

Les valeurs de pD_2 représentant la puissance de l'agoniste sont calculées selon l'équation :

$$pD_2 = -\log EC_{50}$$

La signification de l'effet d'un traitement sur les valeurs de pD_2 des différents agonistes est évaluée à l'aide d'un test t non apparié ($P < 0,05$ étant considéré comme significatif).

Les calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel SigmaStat®2.03 (SSPS Inc.).

E. Substances pharmacologiques utilisées

Les substances pharmacologiques utilisées dans les divers protocoles d'étude de la contractilité vasculaire sont énumérées dans le Tableau 12

Substances pharmacologiques	Propriétés pharmacologiques	Solvant	Concentrations utilisées
Acétylcholine (Sigma)	Agoniste des récepteurs muscariniques et nicotiniques	Eau distillée	1 nM à 30 μ M
Dobutamine (Sigma)	Agoniste β_1 -AR	Eau distillée	1 nM à 30 μ M
Endothéline-1 (Sigma)	Agoniste des récepteurs à l'endothéline	Eau distillée + 0,1 % albumine bovine	10 pM à 0,03 μ M
Isoprénaline (Sigma)	Agoniste β -AR non sélectif	Eau distillée	1 nM à 30 μ M
L-748,337 ((S)-N-N-[4-[2-[3-[3-(acetamido methyl)phenoxy]-2hydroxypropyl]amino]ethyl phenylbenzensulfonamide) (Merck)	Antagoniste β_3 -AR	DMSO	3 à 7 μ M
L-NMMA (N ^G -monomethyl-L-arginine monoacetate) (Calbiochem)	Inhibiteur des NO synthases	Eau distillée	100 μ M
Nadolol (Sigma)	Antagoniste β_1 - et β_2 -AR	HCl	10 μ M

Néбиволол (Ménarini)	Antagoniste β_1 -AR	DMSO	0,1 à 10 μ M
Nitroprussiate de sodium (Sigma)	Donneur de NO	Eau distillée	0,1 nM à 30 μ M
Phényléphrine (Sigma)	Agoniste α_1 -AR	Eau distillée	1 nM à 30 μ M
Salbutamol (Sigma)	Agoniste β_2 -AR	Méthanol	1 nM à 30 μ M
SR 58611A [(RS)-N-[(25)-7-ethoxycarbonylmethoxy-1,2,3,4-tetrahydronapht-2-yl]-(2)-2-(3-chlorophenyl)-2 hydroethanamide hydrochloride] (Sanofi)	Agoniste β_3 -AR	Eau distillée	0,1 μ M à 300 μ M

Tableau 12 : Liste des substances pharmacologiques utilisées pour les études de vasomotricité.

II. Etudes sur le myocarde humain

A. Origine des prélèvements

Nos études sont réalisées sur des biopsies endomyocardiques prélevées au niveau du septum du ventricule droit de patients transplantés cardiaques au CHU de Nantes. Ces biopsies sont effectuées dans le cadre de la surveillance systématique du rejet de greffon. Elles sont réalisées sous anesthésie locale à l'aide d'un biotome introduit par la veine jugulaire droite jusqu'au ventricule droit. Cinq à 6 prélèvements sont réalisés chez le même patient. Après consentement du patient, un prélèvement d'environ 2 mm est adressé au laboratoire dans une solution de Tyrode-Hépès à température ambiante (Tableau 13). Les autres prélèvements sont envoyés en anatomopathologie pour le diagnostic du rejet.

Pour l'ensemble des expériences réalisées, les biopsies proviennent de patients qui ne présentaient aucun signe de rejet. Tous les patients étaient sous immunosuppresseurs associés parfois à des traitements à visée cardiovasculaire (antagonistes calciques, antagonistes α_1 -ARs, diurétiques). Ces traitements ne modifient pas la réponse β -AR.

Les caractéristiques électrophysiologiques et mécaniques des biopsies endomyocardiques (adaptation à la fréquence de stimulation, réponses à la stimulation β -AR et aux variations de calcium extracellulaire) sont similaires à celles obtenues sur d'autres prélèvements indiquant que ces biopsies constituent un bon modèle pour l'étude de l'activité ventriculaire humaine (Gauthier et coll., 1994).

Composés	mM
NaCl	120
KCl	5
MgCl ₂	1,1
CaCl ₂	1
Glucose	5
NaH ₂ PO ₄	0,33
HEPES	10
pH	7,4

Tableau 13 : Composition et pH de la solution de Tyrode-HEPES de transport des biopsies myocardiques.

B. Dispositif expérimental

La cuve expérimentale consiste en une gouttière (20 X 8 X 8 mm) fraisée dans un bloc de Plexiglas. Une couche de silicone coulée dans la partie centrale permet d'y épingler la préparation. Sous loupe binoculaire, la préparation est fixée par l'une des extrémités au fond de la cuve, à l'aide d'une minutie. L'autre extrémité est fixée par une minutie en forme de crochet à un tube capillaire qui est relié à l'élément sensible d'un transducteur mécano-électrique (Akers, AE ; Sen Sonor, Norvège) (Figure 32).

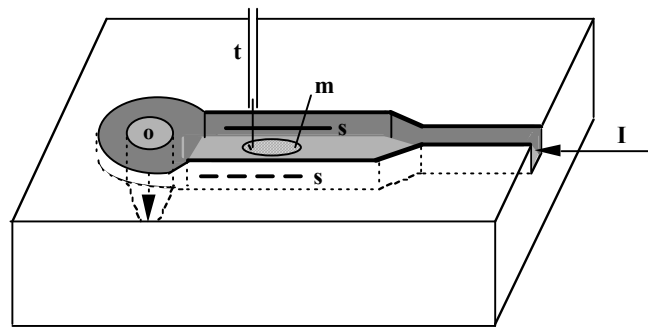


Figure 32 : Représentation schématique de la cuve expérimentale. I : arrivée des solutions ; m : minutie ; s : électrode de stimulation ; t : transducteur mécano-électrique (D'après Gauthier et coll., 1994).

Les solutions physiologiques sont perfusées à l'aide d'une pompe péristaltique (Ismatec) à un débit de 5 ml/mn. La solution physiologique contrôle est une solution de Tyrode-bicarbonate (Tableau 14), préchauffée permettant d'obtenir une température de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dans la cuve. Le pH (7,4) est ajusté par saturation de la solution avec un mélange 95% O_2 / 5% CO_2 . La vidange de la cuve est obtenue par un écoulement continu.

Les préparations sont stimulées à l'aide d'un stimulateur cardiaque (modèle 5328 ; Medtronic inc., Minéapolis, MN) par l'intermédiaire de deux électrodes de platine fixées sur les parois latérales de la cuve (stimulation de champ). La fréquence de stimulation est de 40 coups par minute. La durée des stimuli est de 2 à 4 msec et leur intensité fixée à deux fois celle du seuil d'activation de la préparation.

La contraction est mesurée à l'aide du transducteur mécano-électrique qui transforme la réponse mécanique de la préparation (c'est à dire la contraction) en un phénomène électrique quantifiable. Elle est recueillie sur un enregistreur thermique (Gould 400 ; Les Ulis)

et sur un enregistreur numérique (DTR-1200 ; Biologic, Claix). Les paramètres de contractions sont mesurés sur un oscilloscope numérique (Gould 400).

Composés	mM
NaCl	120
KCl	5
MgCl ₂	1,1
CaCl ₂	2,7
Glucose	5
NaH ₂ PO ₄	0,33
NaHCO ₃	27

Tableau 14 : Composition de la solution de Tyrode-bicarbonate.

C. Protocole expérimental

La sélection des préparations se fait essentiellement selon le décours (amplitude et cinétique) et la bonne stabilité de la contraction au cours du temps. Chaque préparation est équilibrée avec la solution de perfusion contrôle (Tableau 14) pendant 1 H avant le début de l'expérience. Une courbe tension longueur est alors réalisée. Les expériences sont effectuées à environ 90% de la tension maximale.

Les agents pharmacologiques sont ajoutés à la solution de Tyrode-bicarbonate. Des courbes concentration-réponse cumulatives sont réalisées en perfusant la préparation avec des concentrations croissantes d'agoniste β -AR sans retour à la solution contrôle. Après obtention de l'état stable, la concentration supérieure est perfusée. Pour étudier l'effet de différents inhibiteurs, les biopsies sont prétraitées pendant 20 min. avant d'établir les courbes concentration-réponse.

D. Analyse des résultats

L'amplitude de la contraction est mesurée au pic après l'obtention d'un état stable. Elle est exprimée en pourcentage de l'amplitude obtenue après l'état basal. Différents temps sont également mesurés : le temps au pic, le temps de demi-contraction, le temps de demi-relaxation et la durée totale.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm erreur standard (S.E.M) de n expériences.

L'analyse statistique de l'effet d'une substance sur la contraction est calculée à l'aide d'un test d'analyse de variance (ANOVA) à une voie pour mesures répétées. Les effets des pré-traitements sont analysés à l'aide d'un test ANOVA à deux voies, $P < 0,05$ étant considéré comme significatif.

Les calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel SigmaStat®2.03 (SPSS Inc.).

E. Substances pharmacologiques utilisées

Les substances pharmacologiques utilisées dans les divers protocoles d'étude de la contractilité myocardique sont énumérées dans le Tableau 15.

Substances pharmacologiques	Propriétés pharmacologiques	Solvant	Concentrations utilisées
BRL 37344 (sodium-4-[-2-[2-hydroxy-2-(3-chlorophenyl)ethylamino]propyl]phenoxyacetate) (RBI)	Agoniste β_3 -AR	Eau distillée	0.1 nM à 10 μ M
L-748337 ((S)-N-N-[4-[2-[3-[3-(acetamidomethyl)phenoxy]-2hydroxypropyl]amino]ethylphenyl]benzenesulfonamide) (Merk)	Antagoniste β_3 -AR	DMSO	0,1 à 1 μ M
L-NMMA (N ^G -monomethyl-L-arginine monoacetate) (Calbiochem)	Inhibiteur des NO synthases	Eau distillée	10 à 100 μ M
Nadolol (Sigma)	Antagoniste β_1 - et β_2 -AR	HCl	10 μ M
Néбиволол (Ménarini)	Antagoniste β_1 -AR	DMSO	0,1 à 10 μ M

Tableau 15 : Liste des substances pharmacologiques utilisées pour les études sur le myocarde.

III. Etudes de l'activité angiogénique

A. Lignées cellulaires

Dans les différents protocoles d'angiogenèse, deux lignées cellulaires humaines ont été utilisées : des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (Human Umbilical Vein Endothelial Cell ou HUVEC) et des cellules endothéliales de microvaisseaux cutanés humains (Human MicroVascular Endothelial Cell-Dermal : HMVEC-D). Ces deux lignées proviennent des laboratoires Clonetics (Walkersville, MD). Ces cellules sont cultivées sur des boîtes de Pétri gélatinisées, dans leur milieu de culture respectif. Pour les HUVECs, le milieu utilisé est de l'EGM-MV (Clonetics) : milieu basal de culture des cellules endothéliales (Endothelial Basal Media = EBM) supplémenté en extrait cérébral de boeuf (Brain Bovine Extract = BBE), en facteur de croissance épithélial humain (human Epithelial Growth Factor = hEGF), en hydrocortisone, en gentamicine, en amphotéricine B et enfin en sérum fœtal bovin (Fetal Bovine Serum) pour une concentration finale à 5%. Pour HMVEC-D, l'EGM2-MV (Clonetics) est un milieu de culture adapté aux cellules microvasculaires dont la composition est la suivante : EBM (Clonetics), hydrocortisone, gentamicine, amphotéricine B, 5% de FBS, plusieurs facteurs de croissance [hEGF, facteur de croissance fibroblastique (Fibroblast Growth Factor = FGF), facteur de croissance insuline-like (Insulin-like Growth Factor (IGF), VEGF] et acide ascorbique. Pour toutes les expériences, les cellules sont maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié en présence de 5% de CO₂.

Les cellules utilisées pour les expériences sont à un nombre de passages compris entre 5 et 7. Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits de 35 mm de diamètre ou des boîtes de 100 mm de diamètre. Quand leur degré de confluence atteint 80 à 90%, les cellules sont soit repiquées, soit utilisées pour les différentes expériences. A ce degré de confluence, pour une boîte de 100 mm et pour un puits de 35 mm, le nombre de cellules estimé est respectivement de $3 \cdot 10^6$ et de 10^6 .

B. Les adénovirus

Diverses méthodes de transfert expérimental d'ADN dans des cellules eucaryotes ont été testées. Deux grandes catégories de vecteurs permettent de délivrer un gène dans une cellule afin d'en obtenir une expression : les vecteurs non viraux (plasmides et oligonucléotides) et les vecteurs viraux (adénovirus, virus associés à l'adénovirus, rétrovirus, lentivirus, herpes

virus). Les premiers vecteurs souffrent d'une efficacité faible de transfert et d'une expression transitoire, quelles que soient les techniques de délivrance employées (injection directe, électroporation, incorporation à des lipides, association à des protéines). Les vecteurs viraux ont une efficacité de transfection nettement supérieure, mais ils peuvent induire une réaction immunitaire plus ou moins importante.

1. Cycle de l'adénovirus sauvage

L'adénovirus sauvage est un virus composé d'un ADN bicaténaire de 36 kb entouré d'une capsidie icosaédrique protéique de 70 à 100 nm de diamètre (Figure 33). Il existe près d'une cinquantaine de sérotypes différents.

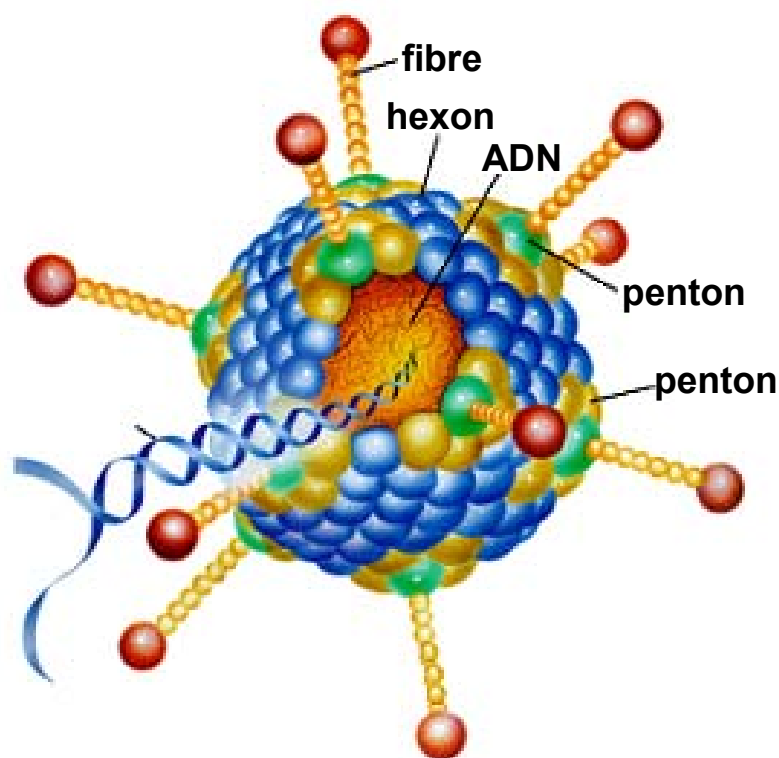


Figure 33 : Structure d'un adénovirus.

Ce type de virus est fréquemment responsable de pathologies respiratoires chez l'homme. La capsidie est composée de 252 capsomères, soit 12 pentons et 240 hexons. Chaque penton est lui-même composé d'une base et d'une fibre protéique. Ces deux composants interagissent avec des récepteurs cellulaires (Russell, 2000).

Le cycle de multiplication viral se divise en deux phases. La phase précoce correspond à l'entrée du virus dans la cellule, au passage du génome viral dans le noyau puis à la

transcription et la traduction de gènes précoces. L'ensemble de ces événements va permettre la mise en place de la phase tardive qui comporte : la duplication de l'ADN viral, la transcription et la traduction de gènes tardifs et enfin l'encapsidation et la maturation des particules virales.

La liaison du virus à la membrane cellulaire dépend de deux interactions : une première interaction non spécifique, ou adsorption qui est due à des phénomènes d'attraction physico-chimique et une seconde interaction qui est spécifique, secondaire à la liaison des fibres virales avec un récepteur membranaire CAR (Coxsackie-virus and Adenovirus Receptor). Après cet attachement, il y a interaction entre les intégrines α_V et les pentons. Le virus pénètre alors dans la cellule à la faveur d'un phénomène de pinocytose active. Le virus est libéré dans le cytoplasme, migre jusqu'au noyau où la décapsidation s'effectue avec libération de l'ADN viral (Russell, 2000). La probabilité de rencontre du virus avec une cellule est d'autant plus élevée que la multiplicité d'infection est élevée (Multiplicity Of Infection = MOI), celle-ci est le rapport entre le nombre de virus par unité de volume de milieu de culture et le nombre de cellules dans le même volume.

Les gènes viraux précoces sont transcrits au niveau nucléaire et les ARN messagers traduits par les ribosomes cellulaires en protéines. Ces protéines précoces vont intervenir dans le métabolisme de l'ADN et l'inhibition des synthèses cellulaires. Les gènes précoces sont regroupés en 5 « cassettes »: E1 (E1A et E1B), E2, E3, E4. Les gènes E1 sont impliqués dans la réplication adénovirale, les gènes E2 codent pour l'ADN-polymérase, les gènes E3 permettent au virus d'échapper au système immunitaire et enfin les gènes E4 codent pour des protéines régulatrices (Russell, 2000).

2. Vecteurs adénoviraux

(a) Principes généraux de construction d'un vecteur adénoviral

Les virus utilisés comme vecteur de transfert de matériel génétique ont été modifiés : le virus doit contenir un gène d'intérêt et la délétion d'une partie de son génome à la fois pour laisser de la place au gène d'intérêt mais surtout pour bloquer les possibilités de réplifications du virus dans les cellules ou l'organisme cible. Les gènes E1 correspondant aux protéines essentielles pour la réplication virale sont systématiquement délétés, les gènes E3 et E4 sont parfois délétés suivant le modèle utilisé (Bowles et coll., 1997).

Le principe de préparation d'un adénovirus recombinant est relativement simple (Figure 34) : un plasmide contenant à la fois le gène d'intérêt et le génome du virus déficient

est introduit dans une lignée cellulaire modifiée, contenant notamment les gènes E1, permettant la réplication du virus. Par recombinaison homologue dans les cellules, le génome obtenu contient le gène d'intérêt et une partie du génome viral. Les virions provoquent alors une lyse cellulaire. Outre l'efficacité de la méthode, elle ne présente que des dangers limités puisque les virions produits ne peuvent se multiplier que dans les cellules génétiquement modifiées prévues à cet effet.

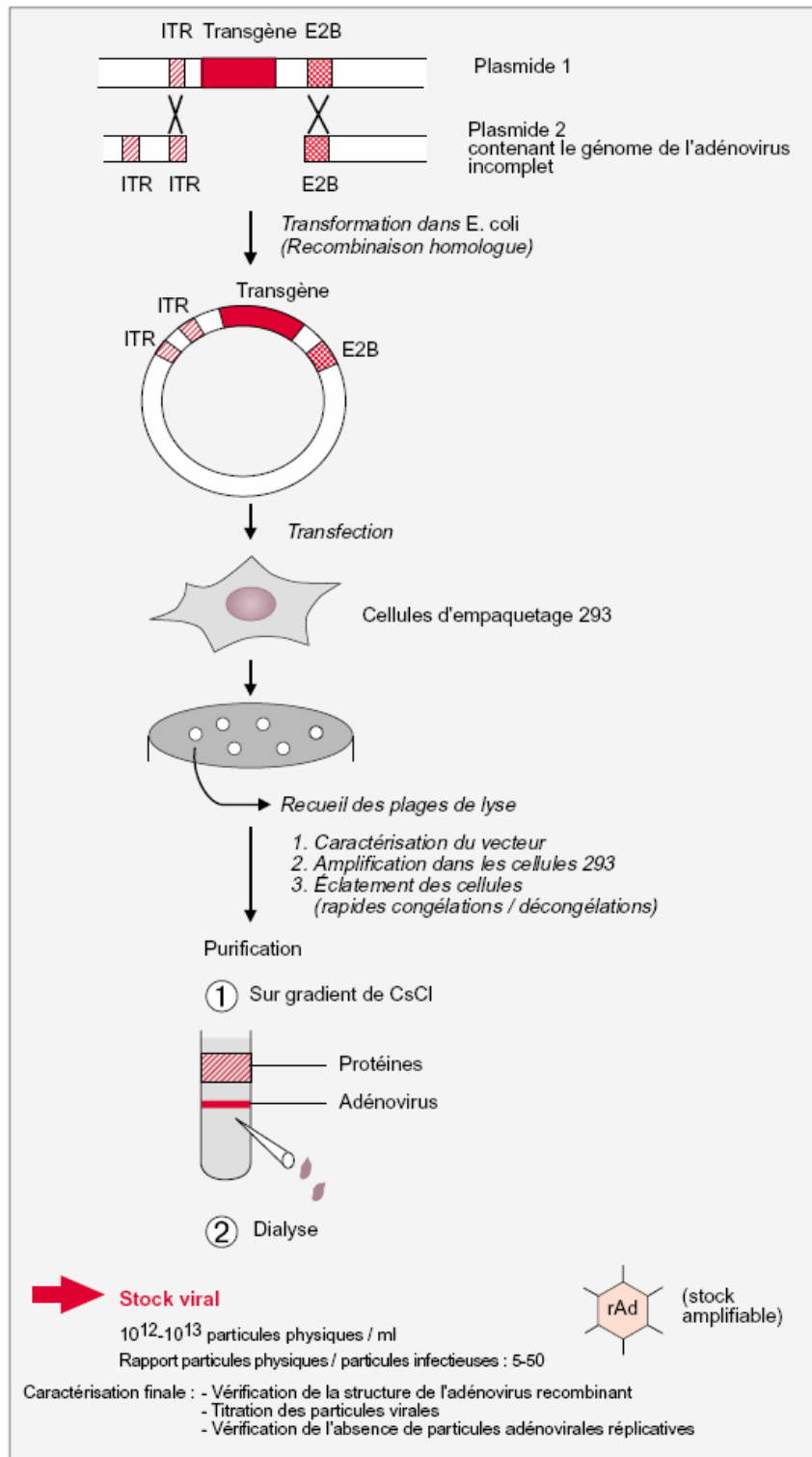


Figure 34 : Principes de construction et d'amplification d'un vecteur adénoviral (Danos, 1999)

Dans le cadre de ce travail, le kit de production de virus AdEasy® (Stratagene) utilise un adénovirus dérivé du sérotype 5, qui a subi une délétion des gènes E1 et E5.

L'amplification des virus se fait en utilisant des cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney) modifiées pour une meilleure adhérence, exprimant E1 et appelées Ad-293.

En raison du nombre limité de sites de restriction dans le génome viral, le gène d'intérêt n'est pas directement inséré dans le virus. Le gène est d'abord inséré dans un vecteur de transfert (un shuttle vector) qui l'associera par recombinaison homologue au plasmide viral pAdEasy-1® (Figure 35). Après recombinaison, et sélection du plasmide, celui-ci est amplifié et enfin transfecté dans les cellules Ad-293, qui vont produire des particules virales.

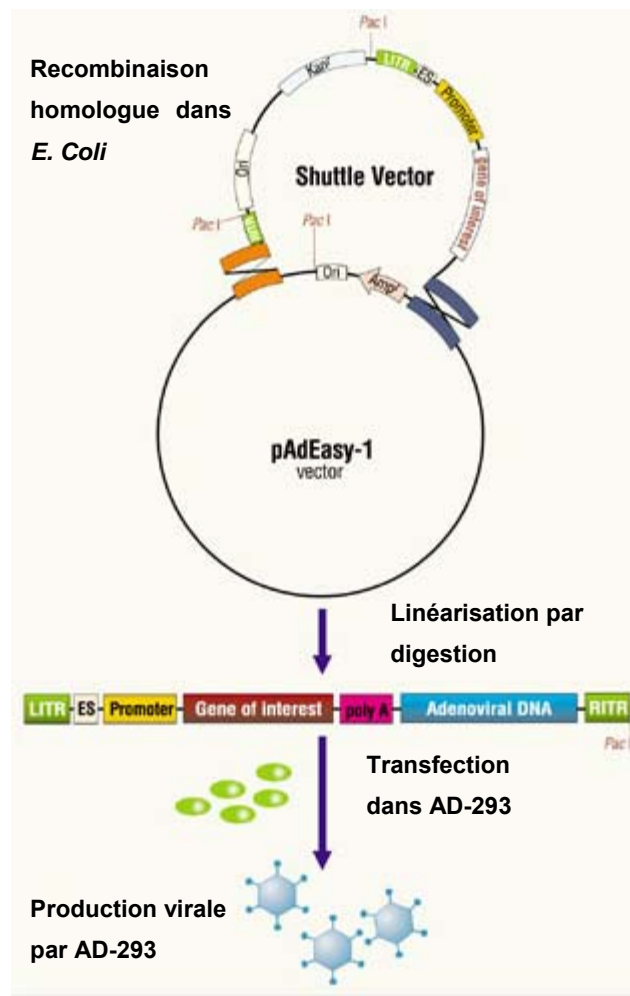


Figure 35 : Représentation schématique du système développé par Stratagene®. Le gène d'intérêt est inséré dans un vecteur de transfert (shuttle vector). Le plasmide obtenu est linéarisé par digestion enzymatique et est cotransfecté avec le plasmide viral pAdEasy-1 dans Escherischia Coli. Les plasmides adénoviraux recombinants sont sélectionnés et validés par utilisation d'enzymes de restriction. Le plasmide adénoviral est alors linéarisé et transfecté dans des cellules Ad-293 pour produire des particules virales recombinantes.

Il faut noter que le vecteur de transfert contient non seulement un site de clonage multiple, mais également le gène codant pour une protéine fluorescente verte : la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette GFP est une protéine extraite d'une méduse *Aequorea victoria*, de faible toxicité et de haute stabilité. Elle a la particularité d'émettre de la fluorescence sous UV sans l'ajout de substrat ou de co-facteurs (longueur d'onde excitatrice, $\lambda_{ex} = 385$ nm, longueur d'onde émise $\lambda_{em} = 508$ nm). Le gène de la GFP est aujourd'hui utilisé comme gène rapporteur, comme marqueur cellulaire ou encore comme marqueur moléculaire. Les cellules infectées par l'adénovirus recombinant vont donc être repérables par simple observation microscopique.

(b) Adénovirus utilisés et amplification

Deux vecteurs adénoviraux ont été construits :

- Un adénovirus bicistronique, Ad β_3 -AR, codant pour l'isoforme C du récepteur β_3 -AR humain et la protéine GFP. Ce vecteur a été synthétisé suivant la méthode précédemment décrite et à l'aide du plasmide contenant la séquence d'ADN complémentaire codant pour cette isoforme du récepteur β_3 -AR humain (pcDNA₃- β_3 C) ;
- Un adénovirus codant pour la protéine GFP, AdGFP, servant de vecteur contrôle.

Les deux virus recombinants sont ensuite amplifiés, pour obtenir des solutions à un titre viral élevé. Des cellules Ad-293 dans une cinquantaine de boîtes de 150 mm de diamètre (10^7 cellules environ par boîte) sont infectées par du milieu de culture sans sérum [(Dubelco's Modified Eagle Medium 4500 (DMEM) (Invitrogen) + 1% pénicilline/streptomycine)] contenant un volume de solution stock de virus (objectif 1 à 10 MOI). Le milieu de culture des Ad-293 (DMEM 4500 + 1% pénicilline/streptomycine + 10% FBS) est retiré et est remplacé par un volume de 9 à 10 ml de la solution virale. Les cellules sont alors incubées 1 H 30 à 2 H à 37°C. Le milieu est complété par 9 à 10 ml de milieu de culture complet. Après 24 à 72 H, lorsque l'effet cytopathique de l'adénovirus apparaît (plages de lyses cellulaires), les cellules et le milieu sont récupérés, centrifugés 15 min. à 6 000 G à 4°C pendant 15 min.. Le culot ainsi que 40 ml de surnageant sont récupérés. L'ensemble subit ensuite 3 cycles de congélation/décongélation pour faciliter la libération des particules virales par lyse cellulaire. Une nouvelle centrifugation à 2 000 RPM permet de séparer les plus gros débris cellulaires (culot) de la solution adénovirale (20-30 ml). Deux ultracentrifugations successives (30 000 RPM pendant 2 H à 4°C, puis 35 000 RPM pendant 18 H à 4°C) sur deux gradients de chlorure de césium permettent de purifier la solution adénovirale. Enfin, une série de 3

dialyses élimine le chlorure de césium et produit une solution concentrée de particules virales dans un tampon de stockage contenant 10% de glycérol. Le stock ainsi généré peut être conservé à - 80° C. Au final, la solution adévirale est à un titre compris entre 10^{10} et 10^{13} pfu/ml (plaque forming unit = unité formant plaque = nombre de particules virales fonctionnelles). Ce titre est évalué en routine par mesure des particules physiques par densité optique (absorbtion 260 nm) et confirmé par méthode de mesure des plaques ou plaque de lyse.

(c) Infection des cellules endothéliales

Le milieu de culture des cellules endothéliales est retiré, et une solution adévirale infectante est appliquée sur les cellules. Cette solution est constituée du milieu de base de culture des cellules endothéliales (EBM) sans sérum auquel un volume de solution adévirale stock a été ajouté. Le volume de la solution infectante doit être suffisant pour couvrir le fond de la boîte de culture, soit 500 μ L à 1 ml par puit pour les plaques 6 puits ou 2 à 3 ml pour une boîte de Pétri de diamètre de 100 mm. La quantité de solution adévirale stock ajoutée est calculée en fonction de la MOI souhaitée (dans la plupart des protocoles 500 MOI). La solution infectante est laissée en contact avec les cellules pendant 1 H 30 à 2 H, le temps de l'internalisation du virus à 37°C. Puis la solution infectante est retirée, et remplacée par un volume suffisant de milieu de culture complet, et les cellules infectées sont maintenues en incubateur pour une durée optimale d'expression du gène d'intérêt (8 H pour les HMVEC-D et 15 H pour les HUVEC). Dans l'ensemble des protocoles, 3 conditions étaient réalisées : une infection par l'Ad β_3 -AR, une infection par l'AdGFP et une condition contrôle (uniquement application d'EBM). Pour tester l'efficacité de l'infection, nous avons ponctuellement réalisé une estimation du taux de cellules exprimant la GFP avec la technique dite « FACS » (Fluorescent Activated Cell Sorter).

C. Lignées de souris utilisées pour les approches *ex vivo* et *in vivo*

1. Expériences *in vivo*

Deux lignées de souris sont utilisées pour les expériences de mesure d'angiogenèse *in vivo*. Il s'agit d'une part de souris homozygotes déficientes en récepteur β_3 -AR (β_3 -KO), Ardb3^{tm1Lowl} (dons des Docteurs P. Valet (INSERM, Hôpital Rangueil, Toulouse, France) et B.B. Lowell (Harvard Medical School, Boston, Mass)) et d'autre part, de la lignée sauvage ayant permis la construction de cette lignée β_3 -KO : la lignée FVB/N (Friend Leukaemia Virus B). Les animaux utilisés sont des mâles de 8 semaines de poids compris entre 25 et 30 g. Durant toute

la durée de l'expérience, ils sont nourris avec une alimentation standard et de l'eau est fournie *ad libitum*. Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Comité d'Ethique local.

2. Expériences *ex vivo*

Des souris C57Bl6 ont été utilisées pour ces expériences. Les animaux employés sont des mâles de 8 semaines, ayant un poids compris entre 25 et 30 g. Durant toute la durée de l'expérience, ils sont nourris avec une alimentation standard et de l'eau est fournie *ad libitum*. Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Comité d'Ethique local.

D. Méthodes d'étude de l'angiogenèse

1. Méthodes *in vitro*

(a) Culture de cellules endothéliales sur une matrice de Matrigel®

- Matrigel®

Le Matrigel® (BD Bioscience) est un extrait soluble de membrane basale d'un sarcome murin (Engelbreth-Holm-Sarm tumor) qui a la particularité de prendre une texture gélatineuse à température ambiante, en formant une véritable matrice extracellulaire artificielle (Kleinman et coll., 1986). Les principaux composants du Matrigel® sont la laminine, le collagène IV, l'entactine et l'héparane sulfate protéoglycane. Le Matrigel® contient également des facteurs de croissance, des collagénases et des activateurs du plasminogène (McGuire et Seeds, 1989). Une forme purifiée et appauvrie en facteurs de croissance a été développée par Taub et coll. (Taub et coll., 1990) : Growth Factor Reduced Matrigel®. La méthode de ces auteurs réduit de façon considérable les quantités de facteurs de croissance présentes à l'exception du TGF- β (Tumor Growth Factor- β) qui peut être lié au collagène. Les principaux composants demeurent la laminine, le collagène IV et l'entactine, alors que les quantités d'héparane sulfate protéoglycane sont diminuées de 40 à 50%. Les compositions en facteurs de croissance sont indiquées dans le Tableau 16.

Paramètres	Matrigel®.	Growth Factor educed Matrigel®
bFGF (pg/ml)	0-0,1	0-0,1
EGF (ng/ml)	0,5-1,3	<0,5
IGF-1 (ng/ml)	15,6	5
PDGF (pg/ml)	12	<5
NGF (ng/ml)	<0,2	<0,2
TGF- β (ng/ml)	2,3	1,7
% de protéine qui gélatinise	80	83

Tableau 16 : Compositions des différents Matrigel®.

Dans le cas de l'étude des effets angiogéniques du récepteur β_3 -AR dans les cellules endothéliales HMVEC-D, nous n'avons utilisé que la forme purifiée et appauvrie en facteur de croissance. Pour des raisons de simplicité, nous la désignerons comme GFR Matrigel®.

Placées dans cette matrice, les cellules endothéliales constituent des structures de type capillaire sous forme de tubes s'organisant en réseau. L'intensité de cette réponse est un reflet de leurs propriétés angiogéniques.

- Protocoles expérimentaux

Les cellules endothéliales utilisées sont des HMVEC-D. Infectées la veille des expériences, les cellules sont laissées 20 H en l'absence de sérum et de facteur de croissance dans du milieu de base EBM. Le nombre de cellules nécessaire est de $4 \cdot 10^4$ par puit d'une plaque 24 puits (P24).

Dans des puits de P24, 330 μ L d'une solution contenant 1/3 de GFR Matrigel® et 2/3 de milieu de base EBM sont coulés et laissés 30 min. à 37° dans un incubateur pour que la gélatinisation ait lieu. Parallèlement, les cellules endothéliales sont détachées par trypsinisation (Trypsine 0,5%-EDTA Gibco), l'action de la trypsin est interrompue par addition d'une solution de PBS/BSA 4% (Bovine Serum Albumin, Sigma). La suspension cellulaire est centrifugée (1000 RPM, pendant 5 min. à 4°C). Une fois le surnageant retiré, le culot est suspendu dans un volume d'EBM suffisant pour obtenir une concentration cellulaire de 20-30.10⁴/ml (comptages successifs en cellule de Bürcker). Un volume de 200 μ L de cette

solution ainsi que 200 μ L d'EBM sont alors répartis dans chaque puit contenant le GFR Matrigel®.

- Analyse des résultats

La formation des tubes est observée à l'aide d'un microscope inversé (Axiovert 25 Zeiss) avec un objectif X5 ou X10 et l'acquisition des images se fait à l'aide d'un système vidéo Pixera Pro. L'intensité de la réponse angiogénique est évaluée à la 20^{ème} H de la mise en culture sur GFR Matrigel®, par la mesure de la longueur en μ m du réseau le plus dense formé par puit dans chaque condition. Cette mesure se fait à l'aide du programme Image J.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm erreur standard (S.E.M) de n expériences.

L'analyse statistique permettant la comparaison des 3 conditions (cellules infectées par Ad β_3 AR, AdGFP et CTRL) est réalisée par ANOVA à une voie, suivi d'un test de Bonferroni. (P < 0,05 étant considéré comme significatif). Les calculs statistiques sont réalisés avec le logiciel SigmaStat®2.03 (SSPS Inc.).

(b) Sphéroïdes de cellules endothéliales en gel de collagène

Cette technique permet une évaluation dans un système à 3 dimensions de la différenciation et de l'activité angiogénique de cellules endothéliales.

- Constitution des sphéroïdes d'HUVEC

Des HUVEC à 80-90% de confluence, sont infectées 6 H avant d'être utilisées pour générer des sphéroïdes cellulaires. Les cellules endothéliales sont détachées par trypsinisation (Trypsine 0,5%-EDTA Gibco Invitrogen). L'action de la trypsinase est interrompue par addition de milieu EGM-MV. La suspension cellulaire est centrifugée (1 000 RPM, pendant 5 min. à 4°C). Une fois le surnageant retiré, le culot est suspendu dans un volume d'EBM suffisant pour obtenir une concentration cellulaire de 30.10^4 /ml (comptages successifs en cellule de Bürcker). Trois cent mille cellules (soit 1 ml de la suspension cellulaire) sont placées dans 60 ml de milieu de base EBM contenant 0,2% de carboxyméthylcellulose (Sigma). Dans des puits à fond arrondi de 4 plaques 96 puits (Greiner Bio-One), 150 μ l de la suspension cellulaire sont coulés, soit environ 750 cellules par puits. Pendant 18 H les cellules sédimentent dans les puits des plaques placées dans un incubateur à 37°C (Figure 36). Dans ces conditions, on obtient un sphéroïde d'une taille définie et contenant 750 cellules endothéliales par puits. Les 400 sphéroïdes ainsi créés sont récupérés et inclus dans un gel de collagène.

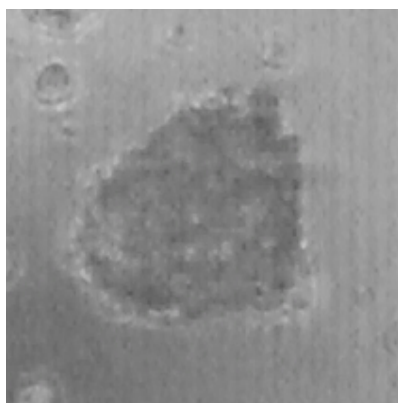


Figure 36 : Aspect d'un sphéroïde d'HUVEC en cours de constitution (12^{ème} H).
Grossissement X10.

- Gel de collagène

Le collagène utilisé est du collagène de type I, extrait de la queue de rat (BD Biosciences). Le collagène de type I est un hétérotrimère de 300 nm de long composé de 2 chaînes polypeptidiques α_1 et une chaîne α_2 . Il gélatinise à température ambiante et dans sa formulation, il est fortement acide.

Pour obtenir les 8 ml de solution de collagène nécessaires pour le nombre de sphéroïdes générés, 4 ml d'une solution contenant 80% de milieu de base EBM additionnée de 20% de carboxyméthylcellulose et de 20% de FCS ainsi que 4 ml de collagène de type I additionné de 50 μ l d'HBSS 10X (Hanks' Balanced Salt Solution Gibco Invitrogen), de 90 μ L d'HEPES (Sigma) et de 400 à 600 μ L de NaOH 0,2N, sont mélangés.

Après avoir été récupérés dans leur milieu initial, les sphéroïdes sont centrifugés 3 min. à 500 G et à température ambiante. Les solutions précédemment préparées sont déposées délicatement sur les sphéroïdes, l'ensemble homogénéisé et 1 ml de ce mélange est coulé dans 8 puits de P24. Après 30 min. d'incubation à 37°C, le gel a pris et 200 μ L d'une solution d'EBM contenant l'agent à tester sont répartis sur chaque puits. La plaque est placée dans un incubateur pendant 24 H à 37°C.

- Analyse des résultats

Après 24 H, l'angiogenèse est quantifiée par la mesure en μ m de la longueur cumulée des structures capillaires bourgeonnantes issues de 10 sphéroïdes pour chaque condition. La formation des tubes est observée à l'aide d'un microscope inversé (Axiovert S100, Zeiss) avec un objectif X20 et l'acquisition des images se fait à l'aide d'un système vidéo AxioCam

(Zeiss) couplé au programme Axiovision (Zeiss). La mesure se fait à l'aide du programme Image J.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm erreur standard (S.E.M) de n expériences.

L'analyse statistique de l'effet de l'infection par Ad β_3 AR et AdGFP par rapport à la condition contrôle (CTRL) est réalisée par une ANOVA à une voie suivie d'un test de Bonferonni. L'effet d'un traitement sur la réponse angiogénique induite par la surexpression du récepteur β_3 -AR est analysé statistiquement par une ANOVA à deux voies., $P < 0,05$ étant considéré comme significatif). Les calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel SigmaStat®2.03 (SSPS Inc.).

2. Méthodes *ex vivo*

Des anneaux d'aorte thoracique de souris sont mis en culture dans des gels de collagène afin d'évaluer l'effet de la stimulation β_3 -AR sur la réponse angiogénique.

(a) Prélèvements

Des souris C57Bl6 sont anesthésiées (injection intrapéritonéale de 85 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine), et grâce à une aiguille de 26-gauge, du sang est prélevé au niveau cardiaque. Ce sang est centrifugé (5 min., 3 000 RPM) afin d'obtenir du sérum autologue.

L'aorte thoracique est prélevée et déposée dans une boîte de Pétri contenant du DMEM sans sérum, sur glace. L'aorte est débarrassée de tout tissu conjonctivo-adipeux et découpée en anneaux de 1 mm. Ces anneaux sont placés dans un gel de collagène.

(b) Gel de collagène

Une solution de collagène de type I à une concentration de 1,5 mg/ml, est préparée de la manière suivante :

- 7,5 ml d'une solution à 2 mg/ml de collagène extrait de queue de rat (CollagenR, Serva),
- 1 ml de DMEM 10X (Minimal Essential Medium, Promo Cells)
- 1,5 ml de NaHCO₃ (15,6 mg/ml)
- Ajustement du pH à 7,4

(c) Protocole expérimental

Dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre, on dispose 3 anneaux d'agarose de 17 mm de diamètre dans lesquels un puits de 10 mm a été réalisé (Figure 37). Un volume de 200 μ L de

la solution de collagène est coulé dans ces puits, puis le collagène est placé en incubateur à 37°C pour se polymériser. Les anneaux aortiques sont ensuite placés dans les puits ainsi qu'un volume complémentaire de 200 µL de solution de collagène. Les boîtes de Pétri sont enfin remplies avec 6 ml de milieu de culture pour cellules endothéliales, MCDB 131 (Life Technologies LTD) supplémenté avec 25 mmol/L de NaHCO₃, 2,5% de sérum autologue, 1% de glutamine (Sigma), 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco). Les agents pharmacologiques sont ajoutés à ce milieu pour modifier la réponse angiogénique.

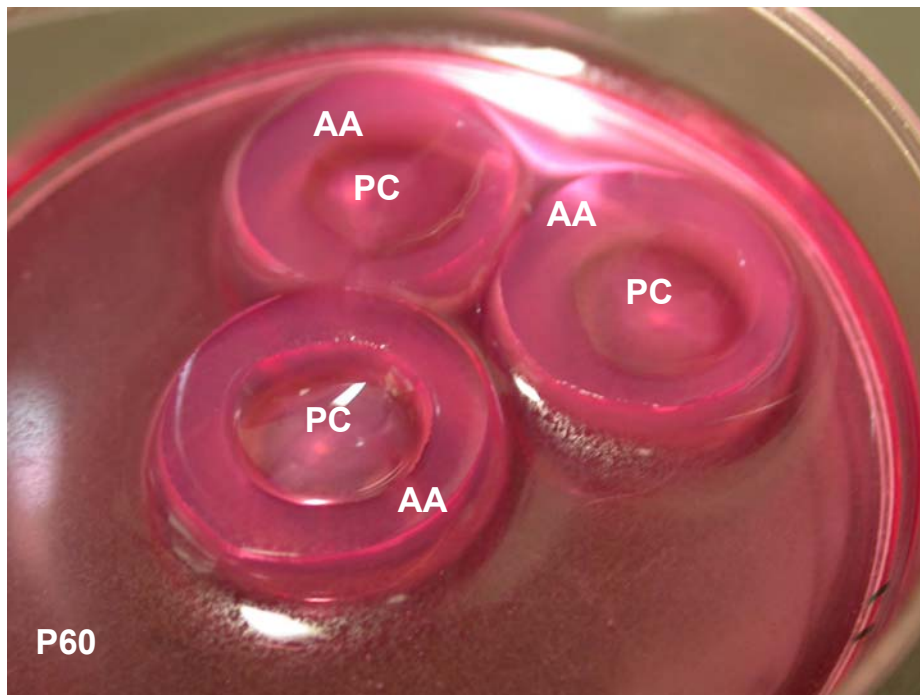


Figure 37 : Anneaux aortiques placés dans un gel de collagène. P60 : boîte de Pétri de 60 mm de diamètre. AA : anneau d'agarose ; PC : puits de collagène.

(d) Analyse des résultats

Placés dans l'environnement précédemment décrit, les anneaux aortiques ont tendance à former spontanément des tubes capillaires. Le nombre de ces tubes capillaires reflète l'intensité de la réponse angiogénique.

La formation des tubes est observée à l'aide d'un microscope inversé (Axiovert 25 Zeiss) et l'acquisition des images se fait à l'aide d'un système vidéo Pixera Pro. Le nombre de tubes est évalué aux 5^{ème}, 7^{ème}, 9^{ème} et 12^{ème} jours après le début de l'expérience.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± erreur standard (S.E.M) de n expériences. La comparaison statistique de l'effet de l'agoniste β_3 -AR sur l'angiogenèse par

rapport à des anneaux contrôles est réalisée par une ANOVA à deux voies pour mesures répétées ($P < 0,05$ étant considéré comme significatif). Les calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel SigmaStat®2.03 (SSPS Inc.).

3. Méthodes *in vivo*

Pour évaluer la qualité de l'angiogenèse chez des souris dont le gène codant pour le récepteur β_3 -AR est invalidé, nous avons étudié le flux sanguin cutané dans un modèle d'ischémie de membre postérieur.

(a) Modèle d'ischémie de membre postérieur chez la souris

Sous loupe binoculaire, après anesthésie (injection intrapéritonéale de 85 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine), dans des conditions d'asepsie chirurgicale, une incision cutanée de 3-4 mm et la résection des tissus sous cutanés et aponévrotiques permettent d'aborder les vaisseaux fémoraux. Après avoir repéré le nerf fémoral et ses principales branches, la veine et l'artère fémorales communes sont ligaturées à leur partie proximale par un fil de soie tressé 5/0 (Perma-Hand Seide, Ethicon). L'artère et les veines saphènes sont ligaturées à leur partie distale avec le même type de fil. Les vaisseaux sont ensuite réséqués entre les 2 ligatures en respectant le nerf. La peau est refermée avec 3 points séparés de Prolène 4/0 (Ethicon).

(b) Mesure du flux sanguin cutané

Pour la mesure de la perfusion cutanée, un appareil de mesure de vélocimétrie laser-Döppler (Moor LDI, Moor Instruments Ltd, Axminster, Devon, UK) est utilisé. Un faisceau laser de basse énergie (longueur d'onde 633 nm) balaye une zone cutanée déterminée (dans notre cas, 7,5X3,7 cm). La concentration et la circulation des globules rouges à 2-3 mm de profondeur dans le tissu, entraînent une dispersion et un élargissement des longueurs d'ondes des rayonnements réfléchis, analysés par photodétecteur (Opazo Saez et coll., 2005). Les données sont recueillies et analysées grâce à un logiciel spécifique (Moor LDI 3.01, Moor Instruments Ltd, Axminster, Devon, UK). Ces modifications sont liées à l'hétérogénéité du flux sanguin qui est exprimé en unités arbitraires de perfusion (Perfusion Unit = PU). Elles sont visualisées sous forme d'une image colorée suivant un code de couleur : le bleu correspondant à une absence de flux (mesure faite sur le plan de travail) et le rouge à un flux sanguin maximal (mesure faite sur l'artère fémorale de la souris).

Les mesures sont réalisées sur un animal anesthésié (injection intrapéritonéale de 85 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine) et placé sur un tapis chauffant à 37°C pour

minimiser les variations de température qui influencent le débit sanguin cutané. La zone à analyser (la moitié postérieure de l'animal placé sur le dos) a été préalablement épilée. Les mesures sont effectuées avant la chirurgie, après la chirurgie puis à J3, J7, J14 et J21.

(c) Analyse des résultats

La mesure d'un flux sanguin moyen est réalisée grâce au programme spécifique fourni par le fabricant (Moor LDI 3.01, Moor Instruments Ltd, Axminster, Devon, UK). La zone de mesure du flux sanguin est limitée à la face ventrale des deux membres postérieurs. Le flux sanguin moyen relatif ou ratio de flux sanguin, est calculé par le rapport entre le membre droit ischémique et le membre gauche sain. L'animal est donc son propre témoin de variation de flux sanguin.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm erreur standard (S.E.M) de n expériences.

La comparaison statistique entre les 2 souches de souris (β_3 KO et FVB) de la néo-angiogenèse au cours du temps est effectuée par une ANOVA à deux voies pour mesures répétées ($P < 0,05$ étant considéré comme significatif). Les calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel SigmaStat®2.03 (SSPS Inc.).

4. Substances pharmacologiques utilisées

Les substances pharmacologiques utilisées dans les divers protocoles d'étude de l'angiogenèse sont énumérées dans le Tableau 17.

Substances pharmacologiques	Propriétés pharmacologiques	Solvant	Concentrations utilisées
bFGF (basic fibroblast growth factor) (GicoBRL Life Technologies)	Facteur de croissance	Eau distillée	30 ng
DETA-NONOate (3,3 bis (aminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazène) (Sigma)	Donneur de NO de demi-vie longue: 3400 min.	Eau distillée	10 μ M

L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) (Sigma)	Inhibiteur des NO synthases	Eau distillée	100 μ M
Ly 294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) (Calbiochem)	Inhibiteur non spécifique des PI3-kinases	DMSO	15 μ M
PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavone) (Calbiochem)	Inhibiteur des MAP kinases / MEK	DMSO	10 μ M
SR 58611A [(RS)-N-[(25)-7-ethoxycarbonylmethoxy-1,2,3,4-tetrahydronapht-2-yl]-(2)-2-(3-chlorophenyl)-2-hydroethanamide hydrochloride] (Sanofi)	Agoniste β_3 -AR	Eau distillée	1 nM

Tableau 17 : Liste des substances pharmacologiques utilisées lors de l'étude de l'angiogénèse.

IV. Biologie moléculaire

A. Préparation des ARNs totaux

Des préparations d'ARNs ont été réalisées pour rechercher l'expression des transcrits codant pour le récepteur β_3 -AR dans l'artère mammaire interne humaine. Pour cela, un protocole d'extraction utilisant le trizol (Gibco BRL, France), technique dérivée de la méthode de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987), a été utilisé. Les échantillons disséqués sont congelés dans l'azote liquide pour être conservés à -80°C . Ils sont ensuite broyés au polytron dans un volume de trizol de 1 ml pour 100 mg de tissu. Cet homogénat est incubé 5 min. à température ambiante puis centrifugé à 4°C pendant 10 min. à 12 000 G afin d'éliminer les graisses, les polysaccharides et les ADN de hauts poids moléculaires. Une fois le surnageant collecté, 200 μl de chloroforme sont ajoutés par ml de trizol. Après une centrifugation à 4°C de 15 min. à 12 000 G, la phase aqueuse contenant les ARNs totaux est récupérée et mise à précipiter avec 500 μl d'isopropanol par ml de trizol. Afin d'optimiser cette précipitation, les préparations sont incubées 15 min. à température ambiante puis centrifugées à 4°C pendant 10 min. à 12 000 G afin de former un culot d'ARN. Ce dernier est lavé avec 1 ml d'éthanol 75 % par ml de trizol avant de subir une nouvelle centrifugation à 4°C pendant 5 min. à 7 500 G. Les culots sont alors partiellement séchés et repris dans un volume adéquat d'eau. Afin d'obtenir une dissolution optimale, les préparations sont placées à 65°C pendant 10 min. puis immédiatement stockées dans la glace. La qualité et les concentrations de nos extraits sont estimées par spectrophotométrie *via* le rapport des densités optiques 260/280 nm. Ce rapport doit être supérieur à 1,6 et proche de 2 afin d'exclure toute contamination par des sels ou des protéines. Une unité de DO à 260 nm correspond à 40 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN. Parallèlement, une migration des ARNs par électrophorèse sur gel d'agarose permet d'évaluer leur qualité. Les ARNs ribosomiaux, majoritaires dans ce type de préparation, sont visualisés par deux bandes correspondant aux ARNs ribosomiaux de 28 et 18S. La qualité de ces acides ribosomiaux reflète la qualité des ARNs messagers.

B. Reverse transcription-amplification par polymérisation en chaîne

Les ARNs messagers ainsi obtenus sont ensuite reverse-transcrits en ADN complémentaires pour subir l'amplification par PCR.

1. La reverse transcription

Les ARNs messagers sont réverse-transcrits en ADN complémentaires sur la base d'oligonucléotides dits « oligo dT » d'une longueur de 12 à 18 bases qui vont pouvoir s'hybrider aux queues polyadénylées des messagers. Cette zone d'hybridation sert de site d'initiation pour une ADN polymérase ARN dépendante, la M-MLV (Gibco BRL, France). Après une dénaturation de 10 min. à 70°C, les ARNs sont incubés 1 heure à 37°C dans le milieu réactionnel suivant :

- 1,5 µl d'oligo dT à 500ng/ml,
- 4 µl de tampon commercial « first-strand buffer » 5X,
- 1 µl de dNTPs à 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),
- 1 µl de DTT 0,1 M,
- 1 µl d'eau ou de M-MLV à 200U/µl.

La réaction de réverse-transcription est arrêtée par chauffage à 93°C pendant 3 min.s. Des incubations contrôles non réverse-transcrites (NRT) sont réalisées sur la base du même milieu réactionnel, exceptée l'enzyme qui est remplacée par un volume d'eau. Ces réactions ont pour but de mettre en évidence d'éventuelles présences d'ADN génomique source d'artéfact pour la PCR.

2. L'amplification par réaction en chaîne de polymérisation

Les ADNs complémentaires ainsi synthétisés sont amplifiés par PCR qui consiste en une amplification d'un fragment défini d'ADN par hybridation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques. Un cycle de PCR comporte différentes étapes à des températures définies :

- une phase de dénaturation de l'ADN matriciel à 94°C pendant 30 secondes,
- une phase d'hybridation de 1 min. des amorces spécifiques des extrémités de la portion d'ADN à amplifier à une température propre à chaque couple d'oligonucléotides,
- une phase de synthèse du brin d'ADN à 72°C pendant 1 min.

Une PCR est composée d'un nombre adapté de cycles d'amplification, de 30 à 40, en fonction du niveau d'expression du transcrit recherché. Le mélange réactionnel est le suivant :

- 2,5 µl d'ADNc,
- 2,5 µl de tampon commercial 10X (500 nM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH = 9),
- 0,5 µl d'oligonucléotide sens (20 pmol/l),
- 0,5 µl d'oligonucléotide anti-sens (20 pmol/l),

- 0,150 µl de Taq DNA polymérase (Amersham, France),
- qsp 25 µl d'eau.

Une fois la PCR réalisée, 5 µl des différentes incubations avec ou sans reverse-transcription sont mis à migrer sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (0,5 mg/ml). Pour chaque réaction d'amplification, les contrôles suivants sont effectués :

- un non reverse-transcrit pour la mise évidence d'ADN génomique,
- un point positif sur la base d'un plasmide contenant le transcrit d'intérêt,
- un point négatif où l'ADN matriciel est remplacé par de l'eau pour mettre en évidence une éventuelle contamination de notre mélange réactionnel par un ADN extérieur à nos préparations reverse-transcrites.

Nom	longueur	Sens	Séquence	Taille d'amplification
α_{1A} -AR-S	23	Forward	5' TGATTTC AAGCCCTCTGAAACAG 3'	224 pb
α_{1A} -AR-AS	23	Reverse	5' ATGTCCTTGTGTTGCCCTTCCAC 3'	
β_1 -AR-S	19	Forward	5' GCTGCAGACGCTCACCA 3'	212 pb
β_1 -AR-AS	20	Reverse	5' GCGAGGTAGCGGTCCAG 3'	
β_2 -AR-S	18	Forward	5' CACAGCCATTGCCAAGTTCG 3'	287 pb
β_2 -AR-AS	25	Reverse	5' CGGGCCTTATTCTTGGTCAGC 3'	
β_3 -AR-S	17	Forward	5' ACCTGGCTGTGACCAAC3'	122 pb
β_3 -AR-AS	19	Reverse	5' ACTGGCTCATGATGGGCGC 3'	
LIPE-S	17	Forward	5' GCTCAACTCCTTCCTGG 3'	459 pb
LIPE-AS	19	Reverse	5' AAGGGGTTCTTGACTATGG 3'	

Tableau 18 : Séquences et températures d'hybridation des oligonucléotides utilisés comme amorces au cours de nos études de RT-PCR. pb : paires de base

V. Etudes biochimiques

A. Immuno-empreintes

Deux types de protocole d'immuno-empreinte sont utilisés, un premier pour l'étude de l'expression du récepteur β_3 -AR dans les artères mammaires internes et un second pour l'étude de l'expression du récepteur β_3 -AR, et de la phosphorylation de différentes protéines dans les cellules endothéliales infectées par les adénovirus recombinants.

1. Protocole pour les artères mammaires internes

(a) Préparation des extraits protéiques

Les échantillons disséqués sont congelés dans l'azote liquide pour être conservés à -80°C . Les tissus sont broyés dans du tampon RIPA (PBS 1X, Nonidet P40 1%, déoxycholate de sodium 0,5% et SDS 0,1%) en présence d'inhibiteurs de protéase (« Complete », Boehringer, France). Ces homogénats sont centrifugés à 100 000 G durant 10 min. à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires ainsi que les noyaux. Les concentrations protéiques des surnageants ainsi obtenus, correspondant à des lysats cellulaires totaux, sont évaluées par dosage colorimétrique *via* le réactif de Bradford (Biorad, France) après lecture à 595 nm.

(b) Gels de protéines et analyse par immuno-empreinte

Les gels de protéines Tris/Glycine sont constitués d'une partie résolutive et d'une partie dite de concentration qui sont coulées successivement. Les compositions des gels sont indiquées dans le Tableau 19.

Composition	Gel résolusif	Gel de concentration
eau	4 ml	3,4 ml
Acrylamide 30%	3,3 ml	0,830 ml
Tris	2,5 ml de solution à 1,5M pH=8,8	0,63 ml de solution à 1M pH=6,8
SDS 10%	100 μl	50 μl
Persulfate d'ammonium	100 μl	50 μl
Temed	4 μl	5 μl

Tableau 19 : Compositions des gels de protéines pour les protocoles d'immuno-empreinte sur les extraits protéiques d'AMI.

Les échantillons sont dénaturés 5 min. à 95°C dans le tampon de charge (Tris/HCl 50 mM pH = 6,8, DTT 100 mM, SDS 2%, glycérol 10% et Bleu de bromophénol 0,1%) et mis à migrer (Tris 25 mM, glycine 250 mM pH=8,3 et SDS 0,1%). Suite à un électro-transfert sur un support HybondCsuper (Amersham, France) (tampon de transfert : Tris 15,5 mM et glycine 0,12 mM), les membranes sont incubées 30 min. à température ambiante dans du TBS/Tween 0,1% contenant 5% de lait. Cette étape a pour but d'éviter une fixation non-spécifique des immunosérums utilisés dans la suite du protocole.

Les premières incubations sont réalisées avec une solution au 1/500^{ème} d'anticorps primaires dirigés contre le récepteur β_3 -AR humain (don de J. Arch, Smithkline Beecham, Harlow, UK). Ces incubations sont réalisées sur la nuit à 4°C en TBS/Tween 0,1 %. Les membranes sont ensuite rincées 3 fois pendant 10 min. à température ambiante en TBS/Tween 0,1 %. Puis, elles sont incubées, toujours à température ambiante, en présence de solutions d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase (HRP : HorseRadish Peroxydase) (Sigma, France) au 1/10000^{ème} en TBS/lait 1%. Ces anticorps sont dirigés contre l'espèce qui a servi au développement des sérums primaires, à savoir le rat pour la forme humaine du récepteur β_3 -AR. Après révélation, à l'aide de la valise commerciale ECL plus (Amersham, France), les membranes sont analysées par autoradiographie.

2. Protocole pour les cellules endothéliales

(a) Préparation des extraits protéiques

Les extraits protéiques sont préparés à partir de cellules endothéliales à 80-90% de confluence dans des boîtes de Pétri de 35 mm. Les cellules infectées sont lavées 3 fois avec 1 ml de milieu EBM sans sérum, puis une fois avec 1 ml de PBS. Le PBS est éliminé et 100 μ l d'un tampon de lyse avec détergent (Tris HCl 20 mM, EDTA 2,5 mM, Triton 1%, déoxycholate de sodium 1%, SDS 0,1%, NaCl 100 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, Protease Inibitor Cocktail 1%) est appliqué. Les cellules sont récupérées avec le tampon après homogénéisation mécanique (scraper). Placé sur glace, chaque échantillon est ensuite soniqué 10 secondes et remis sur glace. Ces homogénats sont centrifugés à 10 000 G durant 10 min. à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants sont récupérés pour réaliser le dosage protéique. Les concentrations protéiques des surnageants, correspondant à des lysats cellulaires totaux, sont évalués par dosage colorimétrique grâce au kit BCA Protein Assay (Pierce) après lecture à 562 nm.

(b) Gels de protéines et analyse par immuno-empreinte

Les échantillons sont préparés de manière à obtenir 60 µg de protéines dans un volume final de 60 µl contenant 10 µl le tampon de charge (Tris/HCl 58 mM pH = 6,8, DTT 100 mM, SDS 2%, glycérol 10% et Bleu de bromophénol 0,1%). Les échantillons sont dénaturés 5 min. à 95°C dans le tampon de charge et 50 µL de chaque échantillon (soit 50 µg) mis à migrer dans les gels (composition voir Tableau 20) (Tampon de migration : Tris 25 mM, glycine 250 mM pH=8,3 et SDS 0,1%). Suite à un électro-transfert sur un support de nitrocellulose Trans-Blot® (Bio-Rad, USA) (tampon de transfert : Tris 25 mM et glycine 200 mM), les membranes sont incubées 60 min. à température ambiante dans du TBS/Tween 0,1% contenant 5% de lait. Cette étape a pour but d'éviter une fixation non-spécifique des immunsérums utilisés dans la suite du protocole. La membrane est coupée au niveau du poids moléculaire 70 kDa.

Composition	Gel résolutif	Gel de concentration
eau	2,91 ml	1,97 ml
Glycérol	0,1875 ml	-
Acrylamide 30%	2,5 ml	0,344 ml
Tris (0,4% SDS)	1.9 ml de solution à 1,5M pH=8,8	0,78 ml de solution à 0,5M pH=6,8
Persulfate d'ammonium	37,5 µl	31,25 µl
Temed	3,75 µl	3,25 µl

Tableau 20 : Compositions des gels de protéines de cellules endothéliales pour les protocoles d'immuno-empreinte sur les extraits protéiques de cellules endothéliales humaines.

Les premières incubations sont réalisées avec une solution au 1/500ème d'anticorps primaire dirigé contre le récepteur β_3 -AR humain (don de J. Arch, Smithkline Beecham, Harlow, UK) pour la partie de la membrane correspondant aux poids moléculaires inférieurs à 70 kDa et avec une solution au 1/1000^{ème} d'anticorps primaire dirigé contre la forme phosphorylée sur le résidu sérine 1177 de la NO synthase endothéliale (Cell Signaling Technology). Ces incubations sont réalisées sur la nuit à 4°C en TBS/Tween 0,1 %.

Les membranes sont ensuite rincées 4 fois pendant 15 min. à température ambiante en TBS/Tween 0,1 %. Puis elles sont incubées, toujours à température ambiante, en présence de solutions d'anticorps secondaires conjugués à la peroxydase au 1/2 500^{ème} en TBS/lait 1%. Ces anticorps sont dirigés contre l'espèce qui a servi au développement des sérums primaires, respectivement le rat pour la forme humaine du récepteur β_3 -AR et le lapin (Jackson

ImmunoResearch) pour la forme phosphorylée de la NO synthase endothéliale. Après révélation, à l'aide de 5 ml de luminol (PerkinElmer Life Science) et 5 ml d'H₂O₂, les membranes sont analysées par autoradiographie.

Pour être réutilisées, les membranes subissent un « stripping » entre chaque expérience pour être débarrassées des complexes anticorps primaires-anticorps secondaires : elles sont hydratées 1 H à température ambiante avec du TBS/Tween 0,1 %, puis incubées 15 min. avec le tampon de stripping (Restore® Western Blott Stripping Buffer, Pierce). Les membranes sont ensuite rincées 4 fois 15 min. avec du TBS/Tween 0,1 % et incubées 1 H dans une solution bloquante de TBS/Tween 0,1 % contenant 5% de lait. Les membranes sont ensuite réutilisées pour l'étude des protéines suivantes : NO synthase endothéliale; protéine kinase B (PKB/Akt) sous sa forme phosphorylée sur le résidu sérine 473 ou sa forme native; kinases ERK1/2 (Extracellular signal Regulated Kinases 1 et 2) sous leurs formes phosphorylées ou non (Tableau 21).

Enfin, la β -actine est également testée pour contrôler l'équivalence quantitative des dépôts et du transfert des protéines de chaque échantillon.

Antigènes	Anticorps primaires	Anticorps secondaires
Phospho-NO synthase endothéliale	Anticorps Cell Signaling 1/500 ^{ème}	Anti-lapin Jackson ImmunoResearch 1/5000 ^{ème}
NO synthase endothéliale	anticorps BD Biosciences 1/2500 ^{ème}	Anti-souris Jackson ImmunoResearch 1/5000 ^{ème}
Phospho-Akt	anticorps Cell Signaling Technology 1/1000 ^{ème}	Anti-lapin Jackson ImmunoResearch 1/5000 ^{ème}
Akt	anticorps Cell Signaling Technology 1/2500 ^{ème}	Anti-lapin Jackson ImmunoResearch 1/5000 ^{ème}
Phospho-ERK1/2	anticorps Cell Signaling Technology 1/1000 ^{ème}	Anti-souris Jackson ImmunoResearch 1/5000 ^{ème}
ERK1/2	anticorps BD Biosciences 1/2500 ^{ème}	Anti-souris Jackson ImmunoResearch 1/5000 ^{ème}
β -Actine	anticorps Sigma 1/10000 ^{ème}	Anti-souris Jackson ImmunoResearch 1/5000 ^{ème}

Tableau 21 : Origine et titre des différents anticorps utilisés lors des expériences d'immuno-empreintes.

B. Immunohistologie et Immunocytologie

1. Immunohistologie

L'expression protéique et la localisation du récepteur β_3 -AR ont été étudiées dans l'artère mammaire interne humaine. La fixation et la perméabilisation des tissus ont été réalisées selon les protocoles de Bittencourt et coll. (1992). Les tissus sont fixés dans une solution de PBS, paraformaldéhyde 4% et sucrose 20 % à 4°C. Les vaisseaux sont incubés une nuit dans une solution de PBS/sucrose 20 % à 4°C avant d'être congelés en isopentane à -65°C pendant une 1 min.. Les blocs de tissus ainsi réalisés sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Puis, à l'aide d'un cryostat, les aortes sont sectionnées en coupes d'une dizaine de micromètres d'épaisseur.

L'anticorps primaire dirigé contre le récepteur β_3 -AR humain est le même que celui utilisé pour les immuno-empreintes (don de J. Arch, Smithkline Beecham, Harlow, UK). L'anticorps secondaire est couplé à HRP (Sigma, France). Les complexes anticorps sont révélés avec la valise commerciale SK4200 (Vector, France).

Le protocole pour réaliser les immunomarquages est le suivant :

- incubation 2 fois 10 min. en PBS,
- traitement 10 min. dans une dilution d' H_2O_2 pour inhiber les activités peroxydasiques endogènes,
- rinçage 3 fois en PBS pendant 5 min.,
- incubation dans la solution d'anticorps primaire en PBS/triton 0,3%,
- rinçage 3 fois en PBS pendant 5 min.,
- incubation dans la solution d'anticorps secondaire en PBS/triton 0,3%,
- rinçage 3 fois en PBS pendant 5 min.,
- révélation, rinçage et montage en milieu d'observation.

Pour s'assurer de la spécificité de l'immunsérum dirigé contre le récepteur β_3 -AR, l'anticorps primaire a été préalablement incubé une nuit en l'absence ou en la présence du peptide ayant été utilisé lors de l'immunisation (excès de cinq fois en faveur du peptide).

2. Immunocytologie

Sur des cellules endothéliales (HUVEC et HMVEC-D) cultivées sur des boîtes de 35 mm et infectées par les deux adénovirus recombinants, un cytomarquage par l'anticorps dirigé contre le récepteur β_3 -AR humain est réalisé en appliquant le protocole suivant (volumes par boîte):

- lavage 3 fois avec 1 ml de milieu EBM sans sérum,

- rinçage 1 fois avec 1 ml de PBS/1% BSA,
- fixation avec 1 ml paraformaldéhyde 2%
- lavage 3 fois avec 1ml de PBS/1% BSA,
- incubation 1 H à température ambiante avec un anticorps primaire anti- β_3 -AR humain : 1/500^{ème} dans du PBS/1% BSA,
- lavage 3 fois avec 1 ml de PBS/1% BSA à température ambiante,
- incubation 30 min. à température ambiante avec l'anticorps secondaire de lapin anti-rat (Dakocytomation) : 1/300^{ème} dans PBS/1% BSA
- lavage 3 fois avec 1 ml de PBS/1% BSA,
- incubation 30 min. à température ambiante avec l'anticorps tertiaire couplé à un fluorochrome rouge dérivé de la rhodamine (TRITC : Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate) ($\lambda_{ex} = 547 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 572 \text{ nm}$) de chèvre anti-lapin (Jackson ImmunoResearch) : 1/300^{ème} dans PBS/1% BSA,
- lavage 3 fois avec 1 ml de PBS/1% BSA,
- montage de la lamelle avec du milieu d'observation Vectashield (Vector) avec DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, qui permet la visualisation de l'ADN des noyaux sous forme d'une fluorescence bleue ($\lambda_{ex} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 355 \text{ nm}$),
- l'observation se fait sous microscope inversé Axiovert S100 (Zeiss), avec des objectifs X10 et X20,
- acquisition des images par AxioCam (Zeiss) couplé au programme Axiovision (Zeiss).

RÉSULTATS

I. Caractérisation du récepteur β_3 -adrénergique dans l'artère mammaire interne humaine

A. Introduction

Très peu de travaux ont évalué la présence et le rôle fonctionnel du récepteur β_3 -AR dans le système vasculaire humain. *In vivo*, Wheeldon et coll. se sont intéressés aux effets d'un précurseur du BRL 37344, le BRL 35135, sur les paramètres hémodynamiques de volontaires sains. L'administration de cet agent est responsable d'un effet chronotrope positif par activation du baroréflexe secondaire à une vasodilatation (Wheeldon et coll., 1994). Néanmoins, dans cette étude il semble que l'effet vasodilatateur soit en relation avec l'activation des récepteurs β_2 -AR. De plus, il a été montré chez l'homme, qu'un agoniste β_3 -AR partiel, le CGP 12177A induit une faible augmentation du flux sanguin au niveau du tissu adipeux sous cutané (Barbe et coll., 1996). Il faut souligner que dans ce travail, le flux sanguin est évalué très indirectement grâce à des techniques de microdialyse. En effet, les auteurs s'intéressent essentiellement aux effets des différents agonistes β -ARs sur la lipolyse. Enfin, pour être exhaustif, une étude clinique évaluant chez des hommes obèses, l'effet de l'administration d'un nouvel agoniste β_3 -AR, le L-796,568, sur le métabolisme lipidique, n'a pas mis en évidence de modifications significatives de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle après 28 jours de traitement (Larsen et coll., 2002).

Des approches *in vitro*, ont démontré la présence du récepteur β_3 -AR dans les vaisseaux humains. Ainsi, grâce à des techniques immunohistochimiques, Anthony et coll. ont pu mettre en évidence l'expression de ce récepteur au niveau des vaisseaux du tractus digestif (Anthony et coll., 1998). Le récepteur β_3 -AR a également été retrouvé au niveau de l'endothélium des microcoronaires humaines, dont la stimulation est responsable d'un effet vasodilatateur dépendant du NO et de l'EDHF (Dessy et coll., 2004). Les effets tocolytiques des agonistes β_3 -AR ont conduit des auteurs à rechercher les effets de ces substances dans les lits vasculaires ombilicaux et placentaires. Dans les artères ombilicales humaines, le BRL 37344 est responsable d'un faible effet vasodilatateur (Dennedy et coll., 2002). Sur des prélèvements d'artères placentaires humaines, le SR 59119A, un agoniste β_3 -AR, induit une vasorelaxation endothélium-indépendante associée à une augmentation de l'AMPc intracellulaire sans modification des taux de GMPc intracellulaire (Rouget et coll., 2005). Enfin, la présence du récepteur β_3 -AR a été montrée dans le corps caverneux humain (Cirino et coll., 2003). Dans ce tissu, le BRL 37344, agoniste β_3 -AR préférentiel, induit une

vasodilatation *via* la production de GMPc par la guanylate cyclase soluble, indépendamment de la voie du NO. Pour expliquer ces résultats, les auteurs évoquent l'activation possible de la guanylate cyclase soluble par le site de régulation indépendant du NO décrit par Stasch et coll. (2001). Le couplage du récepteur β_3 -AR à la voie de l'AMPc n'a pas été exploré dans cette étude.

La présence des récepteurs β_3 -ARs a également été suggérée dans les artères mammaires internes (AMI) (Shafiei et coll., 2000). Le cyanopindolol, agoniste β_3 -AR partiel mais également agoniste des récepteurs β_1 -ARs de faible affinité, et le BRL 37344, induisent une vasodilatation sur des anneaux désendothélialisés d'AMI. Cependant, cette approche pharmacologique n'inclut pas l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur β_3 -AR et ces résultats restent préliminaires. De plus, aucune caractérisation moléculaire et biochimique n'a été conduite.

L'AMI est un des greffons vasculaires les plus utilisés lors des chirurgies de revascularisation myocardique. Des phénomènes aigus comme le vasospasme, ou plus tardifs comme le remodelage conduisant à la sténose anastomotique rendent nécessaire la connaissance de la pharmacologie et de la physiologie de ce type de vaisseau (Rosenfeldt et coll., 1999).

Dans la mesure où les agonistes et antagonistes β -ARs font partie de l'arsenal thérapeutique utilisé dans ce contexte, nous avons recherché, par des approches complémentaires (moléculaire, biochimique et pharmacologique), la présence et la fonction du récepteur β_3 -AR dans les AMI.

B. Article 1

Characterization of beta3-adrenoceptors in human internal mammary artery and putative involvement in coronary artery bypass management.

Rozec B, Serpillon S, Toumaniantz G, Seze C, Rautureau Y, Baron O, Noireaud J, Gauthier C.

J Am Coll Cardiol. 2005, **46**:351-9.

C. Conclusions et perspectives

Cette étude donne une caractérisation complète du récepteur β_3 -AR dans les AMI, par la mise en évidence du transcrit, de la protéine et du rôle fonctionnel de ce récepteur.

Dans les AMIs humaines, nous avons montré une expression endothéliale du récepteur β_3 -AR. La stimulation de ce récepteur par le SR 58611A produit une vasodilatation qui n'est pas modifiée en présence de nadolol, un antagoniste β_1 -AR et β_2 -AR, mais est inhibée en présence de L-748,337, un antagoniste spécifique du récepteur β_3 -AR humain. Cette relaxation vasculaire est dépendante de l'activation des NO synthases. Il semble donc que la localisation et la voie de signalisation du récepteur β_3 -AR dans l'AMI soient identiques à celles qui ont été mises en évidence dans d'autres lits vasculaires, les microcoronaires humaines (Dessy et coll., 1995), ainsi que dans l'aorte thoracique de rat (Trochu et coll., 1999; Rautureau et coll., 2002).

Nos résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par Shafiei et coll. dans le même lit vasculaire (Shafiei et coll., 2000). Dans leur étude purement pharmacologique, ces auteurs ont montré que le BRL 37344 est responsable d'une vasodilatation concentration-dépendante, sur des anneaux d'AMI désendothélialisés. Néanmoins, dans leur étude, ils n'ont pas testé le rôle potentiel de l'endothélium, ni l'effet d'antagonistes β_3 -ARs. Dans une étude plus ancienne, une équipe décrit le faible effet vasodilatateur de l'isoprénaline (un agoniste β -AR non spécifique) sur des anneaux d'AMI précontractés par un homologue du thromboxane A2 et le blocage partiel de cette relaxation par le propranolol, indiquant ainsi la présence d'un récepteur β -AR atypique (He et coll., 1989). De plus, dans cette même étude, les auteurs montrent que la relaxation induite par l'isoprénaline est moins importante lorsque les anneaux sont précontractés par du potassium et que, dans ce cas, elle est complètement inhibée par le propranolol. Ce résultat peut s'expliquer notamment par l'implication des canaux potassiques dans la relaxation induite par l'activation du récepteur β_3 -AR (Rautureau et coll., 2002).

L'utilisation de l'AMI comme greffon vasculaire au cours des pontages aortocoronariens constitue un progrès majeur de la chirurgie de revascularisation myocardique. La connaissance de la pharmacologie de ce vaisseau doit permettre une meilleure prise en charge postopératoire de ces patients. Etant donnée la présence du récepteur β_3 -AR dans les coronaires humaines et sa résistance aux phénomènes de désensibilisation, les effets relaxants des agonistes β_3 -ARs pourraient être particulièrement intéressants, après un pontage aortocoronarien chez les patients porteurs de cardiopathie ischémique qui présentent fréquemment au cours de cette période péri-opératoire un tonus adrénergique augmenté (Plunkett et coll.,

1997). Les phénomènes de désensibilisation des autres sous-types de récepteurs β -ARs au cours de la période postopératoire (Booth et coll., 1998), pourraient dévoiler les effets des récepteurs β_3 -ARs. L'association de l'effet inotrope négatif (Gauthier et coll., 1996), de l'activation de la voie du NO (effet lusitrope positif potentiel) (Gauthier et coll., 1998) et de l'effet vasodilatateur (AMI et coronaires) induits par l'activation des récepteurs β_3 -ARs pourrait avoir un effet bénéfique sur la balance énergétique myocardique. De plus, un des risques importants des pontages aortocoronariens est la survenue d'un spasme du greffon vasculaire (dans 2 à 20% des cas pour l'AMI), qui est responsable d'une chute de la perfusion myocardique et peut avoir des conséquences dramatiques (Carrel et coll., 1995). Si ce spasme est associé à une diminution du débit cardiaque, il serait intéressant d'utiliser un agent agoniste β -AR, ayant un effet inotrope positif (par activation des récepteurs β_1 et β_2 -AR) associé à des propriétés β_3 -ARs (vasodilatatrices au niveau du greffon vasculaire et des coronaires). Inversement, en cas de spasme associé à un débit cardiaque satisfaisant, un antagoniste β_1 et β_2 -AR ayant des effets agonistes β_3 -AR pourrait limiter la consommation myocardique en oxygène et permettre une vasodilatation de l'AMI. De tels agents seraient également indiqués en dehors du contexte particulier et à distance de la chirurgie. Un β -bloquant de troisième génération, le nébivolol, possède certaines de ces caractéristiques. Antagoniste β_1 -AR hautement sélectif, il est également doté de propriétés agonistes β_3 -AR et vasodilatatrices NO-dépendantes (Gosgnach 2001 ; de Groot et coll., 2003). Il a par ailleurs été déjà testé en postopératoire immédiat de pontage aortocoronarien avec une excellente tolérance et un effet bénéfique sur le débit cardiaque (Goldstein et coll., 1993). Ces caractéristiques ont également été confirmées dans une étude clinique de grande échelle, chez des patients âgés et porteurs d'insuffisance cardiaque (étude SENIORS) (Flather et coll., 2005).

II. Le nébivolol : un agoniste β_3 -adrénergique cardiovasculaire

A. Introduction

Actuellement, les β -bloquants sont classés en 3 générations, la première comporte les β -bloquants non sélectifs (comme le propranolol, le pindolol, le sotalol et le timolol), les β_1 -bloquants sélectifs constituant la seconde (comme le métoprolol et le bisoprolol, alors que l'aténolol et l'acébutolol possèdent une sélectivité plus faible) et la 3^{ème} génération est représentée par des β -bloquants ayant des propriétés vasodilatatrices (Toda, 2003). Parmi les composés appartenant à cette 3^{ème} génération (carvédilol, céliprolol, bucindolol), le nébivolol, est un des β -bloquants le plus sélectif des récepteurs β_1 -ARs (Brixius et coll., 2001). Il s'agit d'un mélange racémique de 2 énantiomères, le D-nébivolol (ou SR₃ nébivolol) et le L-nébivolol (RS₃-nébivolol). Le profil hémodynamique obtenu après administration du nébivolol est tout à fait original. En effet, le nébivolol provoque une diminution de la pression artérielle et des résistances périphériques, sans que la fonction ventriculaire gauche soit altérée et avec une augmentation du volume d'éjection (Mangrella et coll., 1998). C'est l'ensemble de ces constatations, renforcées par un ensemble d'études cliniques, qui ont conduit à indiquer l'administration du nébivolol dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (hypertension artérielle systémique, insuffisance cardiaque).

L'étude de la pharmacologie de ce β -bloquant révèle qu'il est dépourvu d'activité sympathomimétique intrinsèque (Janssens et coll., 1989; Brixius et coll., 2001) et d'effet agoniste inverse (Bundkirchen et coll., 2003). A titre de comparaison, le bucindolol, un autre β -bloquant de 3^{ème} génération doté de propriétés agonistes β_3 -ARs, est non cardiosélectif et aurait une activité sympathomimétique intrinsèque (Toda, 2003). Classiquement, les effets antagonistes β_1 -ARs sont attribués au D-nébivolol (Bundkirchen et coll., 2003) et les propriétés vasodilatatrices à l'énantiomère de type L (Mangrella et coll., 1998). Il semble également que certains métabolites du nébivolol soient responsables d'actions cardiovasculaires (Broeders et coll., 2000). Dans plusieurs études *in vitro*, il a été montré que le nébivolol possède des propriétés inotropes négatives (Bundkirchen et coll., 2001; Brixius et coll., 2001; Bundkirchen et coll., 2003) contrastant avec les constatations faites *in vivo*. Par ailleurs, les effets vasculaires du nébivolol ont été attribués à la stimulation potentielle des récepteurs β_3 -ARs (Gosgnach et coll., 2001; De Groot et coll., 2003; Dessy et coll., 2005). L'abrasion de l'endothélium abolit la relaxation provoquée par le nébivolol dans l'aorte thoracique de rat (Cosentino et coll., 2002). La vasodilatation induite par le nébivolol est

également dépendante de la voie du NO (Ritter et coll., 2001). Dans une étude sur les voies de signalisation impliquées dans les effets du nébivolol sur des cellules endothéliales humaines (HUVEC), Gosgnach et coll. ont observé que la production de nitrites (reflet de la synthèse de NO) induite par l'application de nébivolol est inhibé par le bupranolol (antagoniste β_1 - β_2 - et β_3 -AR mais également antagoniste du site de faible affinité des récepteurs β_1 -ARs) mais pas par le nadolol (antagoniste β_1 - et β_2 -AR) (Gosgnach et coll., 2001).

L'ensemble de ces données suggère que le nébivolol est doté de propriétés agonistes β_3 -ARs. Néanmoins, dans l'ensemble de ces études, aucun antagoniste spécifique du récepteur β_3 -AR, n'a été testé.

Alors que l'intérêt clinique de ce produit est avéré, les mécanismes responsables des effets bénéfiques du nébivolol ne sont pas parfaitement connus en particulier l'importance de ses effets agonistes β_3 -ARs. Dans ce contexte, nous nous sommes donc attachés à préciser les mécanismes de la vasodilatation induite par le nébivolol et notamment ses effets sur les récepteurs adrénergiques au niveau vasculaire (notamment α_1 et β_3 -AR) ainsi qu'à démontrer les propriétés agonistes β_3 -ARs du nébivolol dans le myocarde ventriculaire humain.

B. Article 2

Mixed beta3-adrenoceptor agonist and alpha1-adrenoceptor antagonist properties of neбиволol in rat thoracic aorta.

Rozec B, Quang TT, Noireaud J, Gauthier C.

Br J Pharmacol. 2006, **147**:699-706

**C. Résumé accepté sous forme de présentation affichée au congrès de
l'American Heart Association-2006**

Nebivolol decreases human ventricular contractility by activating beta 3-adrenoceptors.

Bertrand ROZEC, Mortéza ERFANIAN, Karine LAURENT, Jean-Noël TROCHU,
Chantal GAUTHIER

Circulation Supp. 2006

Background. Nebivolol is a β -blocker of third generation used in the treatment of heart failure. It associates selective β_1 -adrenergic antagonist properties with vasodilating endothelial effects mediated by NO. Only few studies suggested that this vasodilatation could result from a putative activation of β_3 -adrenergic receptors (β_3 -ARs). The aim of the present study was to assess whether nebivolol could activate β_3 -ARs in human heart. **Method.** The effect of nebivolol (0.1 nM-10 μ M) upon the developed peak tension was tested in endomyocardial biopsies from human non-rejecting transplanted hearts. Samples were stimulated at 0.6 Hz in organ baths superfused with oxygenated Tyrode ($37\pm 0.5^\circ\text{C}$). Tension was recorded at steady-state using a mechanoelectric force transducer. **Results.** Nebivolol induced a concentration-dependent decrease in peak tension (E_{max} obtained at 10 $\mu\text{M} = -55\pm 4\%$, $n=6$) which was similar to that obtained with a preferential β_3 -AR agonist, BRL37344 (BRL, E_{max} at 1 $\mu\text{M} = -45\pm 2\%$, $n=12$). As obtained for BRL effects, the pre-treatment with 10 μM nadolol, a $\beta_{1,2}$ -AR antagonist, did not modify nebivolol-induced negative inotropic effect. Conversely, the nebivolol effect was significantly reduced by 64% ($n=6$, $p<0,05$) in the presence of 1 μM L-748,337, a selective β_3 -AR antagonist, and by 60% ($n=6$, $p<0,05$) after pre-treatment with 100 μM L-NMMA, a NOS inhibitor, as for the BRL effect which was reduced by 56% ($n=7$, $p<0,05$) and by 51% ($n=10$, $p<0,05$) in the presence of L-748,337 and L-NMMA respectively. **Conclusion.** Our study demonstrated that nebivolol-induced negative inotropic effect result from a β_3 -AR and NO pathway activation in human heart. The vasodilating properties of nebivolol previously described in human microcoronary arteries associated with its negative inotropic effect could improve the energetic balance in heart. Those effects could explain the amelioration of hemodynamic parameters obtained in patients with heart failure after nebivolol administration as described in clinical trials.

D. Résultats

1. Comparaison de l'effet du nébivolol et du BRL 37344 sur l'amplitude de contraction des biopsies endomyocardiques humaines.

Nous avons évalué en parallèle les effets de l'application de concentrations croissantes de nébivolol et de BRL 37344 (un agoniste préférentiel β_3 -AR) sur la tension développée par des biopsies endomyocardiques humaines. Comme cela a été précédemment démontré (Gauthier et coll., 1996), le BRL 37344 induit un effet inotrope négatif sur les préparations, avec un effet maximal à 1 μ M ($E_{\max} = -45 \pm 2\%$, $n=12$) (Figure 38). A 10 μ M, le BRL 37344 produit une augmentation de l'amplitude de contraction est observée probablement en raison des effets β_1 - et β_2 -ARs du BRL 37344 (Gauthier et coll., 1996). Dans les mêmes gammes de concentrations, le nébivolol induit un effet inotrope négatif similaire. A la concentration maximale testée, 10 μ M le nébivolol induit une réduction de plus de 50% de la contractilité de base ($E_{\max} = -55 \pm 4\%$, $n=6$) (Figure).

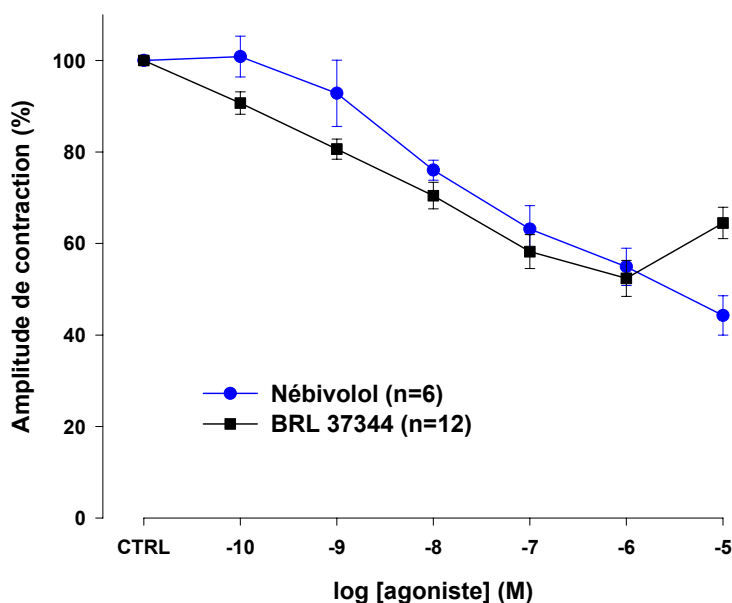


Figure 38 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope négatif du BRL 37344 et du nébivolol sur des biopsies endomyocardiques humaines. Au début de chaque expérience, la préparation est perfusée par la solution de Tyrode, jusqu'à l'obtention d'un état stable (CTRL). Les solutions d'agonistes sont ensuite perfusées durant 10 à 15 min. jusqu'à l'obtention d'un état stable. La réponse obtenue est exprimée en pourcentage de l'amplitude de contractilité au pic comparée au contrôle (CTRL).

2. Effet d'un antagoniste β_1 - et β_2 -AR, le nadolol, sur les propriétés inotropes négatives du BRL 37344 et du nébivolol.

Afin de s'affranchir d'une action sur les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs, les préparations sont prétraitées par 10 μ M de nadolol et ce traitement est maintenu pendant toute la durée des expériences. Les valeurs de base (CTRL) de l'amplitude de contraction des préparations sont obtenues après 10-15 min. de perfusion de la solution de Tyrode contenant le nadolol. Ce prétraitement n'entraîne pas de modification significative de l'effet inotrope négatif obtenu avec le BRL 37344 et le nébivolol, en présence de cet antagoniste β_1 - et β_2 -AR (Figure 39)

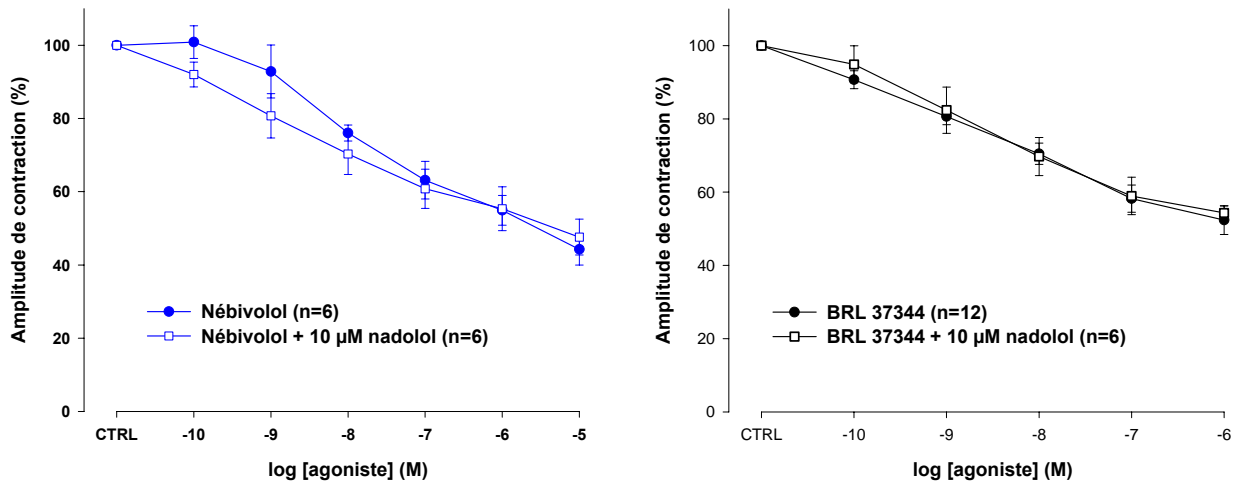


Figure 39 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope négatif du BRL 37344 et du nébivolol sur des biopsies endomyocardiques humaines en présence ou non de 10 μ M de nadolol (antagoniste β_1 - et β_2 -AR). Au début de chaque expérience, la préparation est perfusée par la solution de Tyrode-bicarbonate contenant ou non 10 μ M de nadolol, jusqu'à l'obtention d'un état stable (CTRL). Les solutions d'agonistes sont ensuite perfusées durant 10 à 15 min. jusqu'à l'obtention d'un état stable. La réponse obtenue est exprimée en pourcentage de l'amplitude de contractilité au pic comparée au contrôle (CTRL).

3. Effet d'un antagoniste β_3 -AR sélectif, le L-748,337I, sur les propriétés inotropes négatives du BRL 37344 et du nébivolol.

Le L-747,338, dont les propriétés antagonistes β_3 -ARs ont été mises en évidence sur un système de ré-expression hétérologue de la forme humaine du récepteur (Candelore et coll., 1999), a été utilisé dans nos expériences à une concentration de 1 μ M. Dans ces conditions, nous avons observé une réduction significative de l'effet inotrope négatif (réduction de 64% de l' E_{max} à 10 μ M, $p < 0,01$, $n=6$) du nébivolol (Figure 40). Le nombre d'expériences réalisées dans les mêmes conditions avec le BRL 37344 étant trop faible ($n=2$), nous ne pouvons que constater une tendance similaire (Figure). Néanmoins, des expériences précédentes menées en présence de 0,1 μ M de L-748,337, ont mis en évidence une réduction significative (réduction de 56% de l' E_{max} à 1 μ M, $n=7$, $p < 0,01$) de l'effet inotrope négatif du BRL 37344.

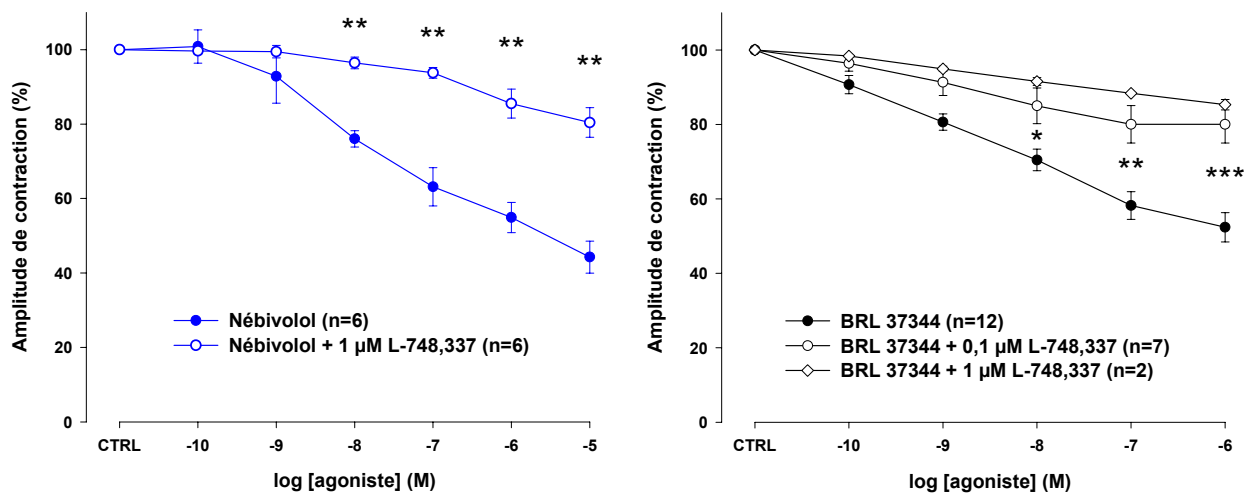


Figure 40 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope négatif du BRL 37344 et du nébivolol sur des biopsies endomyocardiques humaines en présence ou non de 1 μ M de L-748,337 (antagoniste β_3 -AR). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus amplitude de contraction en absence de L-748,337 ; les tests statistiques n'ont été réalisés que sur les expériences avec un $n \geq 6$. Au début de chaque expérience, la préparation est perfusée par la solution de Tyrode contenant ou non 0,1 ou 1 μ M de L-748,337, jusqu'à l'obtention d'un état stable (CTRL). Les solutions d'agonistes sont ensuite perfusées durant 10 à 15 min. jusqu'à l'obtention d'un état stable. La réponse obtenue est exprimée en pourcentage de l'amplitude de contractilité au pic comparée au contrôle (CTRL)

4. Implication de la voie du NO dans les effets inotropes négatifs du BRL 37344 et du nébivolol.

Dans des travaux précédents, il a été établi que les effets inotropes négatifs des agonistes β_3 -ARs sont dépendants de l'activation de la voie du NO par le biais d'une protéine G_i (Gauthier et coll., 1998). Nous avons voulu confirmer ce couplage pour le BRL 37344 mais également pour le nébivolol. Effectivement, en présence de 100 μM de L-NMMA, un inhibiteur de NO synthase, nous avons pu mettre en évidence une diminution significative (réduction de 60% de l' E_{max} à 10 μM , $n=6$, $p<0,05$) de l'effet inotrope négatif du nébivolol (Figure 41). La même tendance est observée pour le BRL 37344 en présence de 100 μM de L-NMMA. Les statistiques n'ont pas pu être réalisées en raison d'un nombre trop limité d'expériences ($n=2$) (Figure) mais précédemment nous avons établi que 10 μM de L-NMMA réduisaient significativement l'effet inotrope négatif de cet agoniste β_3 -AR (réduction de 51% de l' E_{max} à 1 μM , $n=10$, $p<0,01$) (données non montrées).

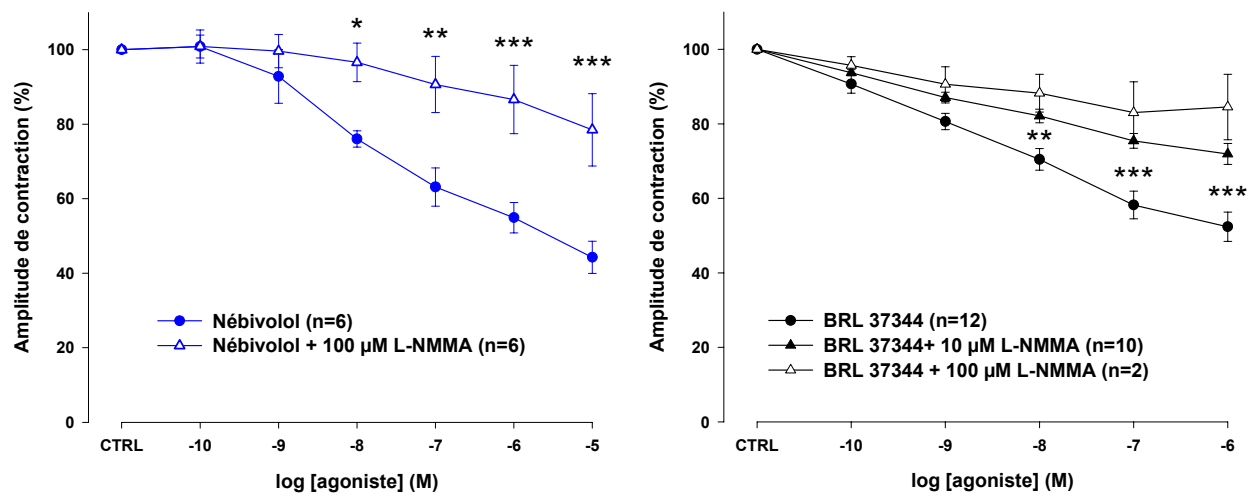


Figure 41 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope négatif du BRL 37344 et du néбиволол sur des biopsies endomyocardiques humaines en présence ou non de 100 μM de L-NMMA (inhibiteur NO synthase). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus amplitude de contraction en absence de L-NMMA ; les tests statistiques n'ont été réalisés que sur les expériences avec un $n \geq 6$. Au début de chaque expérience, la préparation est perfusée par la solution de Tyrode contenant ou non 10 ou 100 μM de L-NMMA, jusqu'à l'obtention d'un état stable (CTRL). Les solutions d'agonistes sont ensuite perfusées durant 10 à 15 min. jusqu'à l'obtention d'un état stable. La réponse obtenue est exprimée en pourcentage de l'amplitude de contractilité au pic comparée au contrôle (CTRL)

E. Conclusions et perspectives

Ces approches *in vitro* indiquent que le nébivolol a un profil pharmacologique complexe et présente des propriétés agonistes β_3 -ARs. Les effets agonistes β_3 -ARs de ce β -bloquant sont dans nos deux modèles expérimentaux dépendants de la voie du NO.

Pour la première fois, nous avons mis en évidence un effet antagoniste α_1 -AR non compétitif du nébivolol dans l'aorte thoracique de rat. Ce résultat est en désaccord avec les données classiquement retrouvées dans la littérature (Broeders et coll., 2000; Ritter, 2001). Cependant, il faut souligner que la plupart des études, anciennes, concluant à l'absence d'effet antagoniste α_1 -AR, étaient menés par le biais d'approche *in vivo* chez l'homme et le rat (Loots et De Clerck, 1990; Schneider et coll., 1990; Van Bortel et coll., 1997). Ces conditions expérimentales laissent supposer que de nombreuses interactions neurohormonales aient pu influencer le résultat. Le carvedilol, un autre β -bloquant de 3^{ème} génération, indiqué tout comme le nébivolol dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque, se comporte comme un antagoniste α_1 -AR (Toda, 2003). Néanmoins, à la différence du nébivolol, le carvedilol est un antagoniste compétitif des récepteurs α_1 -ARs (Nichols et coll., 1989). La nature (allostérique ou fonctionnelle) ainsi que l'importance de l'effet antagoniste α_1 -AR du nébivolol dans le système cardiovasculaire humain reste à préciser. S'il est classiquement admis que l'administration d'antagonistes α_1 -ARs sélectif ne diminue pas la mortalité dans le cadre de l'insuffisance cardiaque (Cohn et coll., 1986), des études expérimentales remettent en cause ces conclusions (Perlini et coll., 2006). En effet, les effets antagonistes α_1 -ARs du carvedilol et du nébivolol, associés aux autres actions de ces produits, pourraient avoir un effet bénéfique dans l'insuffisance cardiaque, en diminuant la post-charge ventriculaire et avoir un effet bénéfique sur le remodelage ventriculaire gauche par exemple.

Un des résultats importants de l'étude sur l'aorte thoracique de rat, a été de confirmer que la vasodilatation NO-dépendante induite par le nébivolol est due à l'activation de récepteurs β_3 -ARs endothéliaux. En effet, si la vasodilatation due au nébivolol n'est pas modifiée par le prétraitement des anneaux vasculaires par le nadolol, un antagoniste β_1 - et β_2 -AR, le L-748,337 un antagoniste sélectif du récepteur β_3 -AR (Candelore et coll., 1999), la diminue de façon significative. L'utilisation de l'endothéline-1 comme agent vasoconstricteur permet de s'affranchir des effets antagonistes α_1 -ARs. De plus, la désendothélialisation et l'utilisation d'un inhibiteur des NO synthases, démontrent la localisation endothéliale de la cible du nébivolol. Ce résultat est parfaitement en accord avec des données de la littérature suggérant

que le nébivolol possède des propriétés agonistes β_3 -ARs au niveau vasculaire, dans l'aorte thoracique de rat (De Groot et coll., 2003), dans les cellules endothéliales ombilicales humaines (Gosgnach et coll., 2001), et dans les microcoronaires murines et humaines (Dessy et coll., 2005). Il persiste néanmoins en présence de l'antagoniste β_3 -AR une vasodilatation résiduelle, qui peut d'une part s'expliquer par le fait qu'il s'agisse d'un antagoniste compétitif, d'autre part il est possible que le nébivolol ait d'autres cibles vasculaires. En effet, il a été évoqué la possibilité d'une implication des récepteurs à la sérotonine de type 1 dans le même lit vasculaire (Kakoki et coll., 1999).

Notre étude sur la contractilité du myocarde ventriculaire humain confirme que le nébivolol, comme le BRL 37344, un agoniste β_3 -AR préférentiel, produit un effet inotrope négatif concentration dépendant. Cet effet inotrope négatif n'est pas modifié en présence d'un antagoniste β_1 - et β_2 -AR, le nadolol. En revanche, le L-748,337 qui est un antagoniste hautement sélectif du récepteur β_3 -AR humain, réduit de manière significative l'effet dépresseur du nébivolol. De plus, l'inhibition non sélective des NO synthases, diminue significativement l'effet inotrope négatif du nébivolol. Les résultats obtenus dans des expériences menées en parallèle, avec le BRL 37344 sont comparables. De manière paradoxale, dans une étude publiée récemment, Brixius et coll., ne mettent pas en évidence d'activation de la NO synthase endothéliale par le nébivolol dans des trabécules de ventricule gauche de patient insuffisant cardiaque ou non (Brixius et coll., 2006). Ces auteurs, par des techniques d'immunohistochimie et d'immunocytochimie, n'observent aucune translocation ni phosphorylation sur la Ser¹¹⁷⁷ de la NO synthase endothéliale. Dans notre approche pharmacologique, nous avons testé un inhibiteur non spécifique des NO synthases. Par ailleurs, de plus en plus d'études soulignent l'importance de la NO synthase neuronale dans la régulation de l'effet inotrope des agonistes β -ARs (Martin et coll., 2006). De même, une étude a montré un couplage possible des récepteurs β_3 -ARs avec la NO synthase neuronale dans l'oreillette de rat (Sterin-Borda et coll., 2006). Il ne faut donc pas exclure un couplage du récepteur β_3 -AR avec la NO synthase neuronale au niveau du myocarde ventriculaire. Enfin, il convient de souligner les variations d'expression et de couplage des NO synthases en fonction de la provenance du prélèvement myocardique : dans notre cas, les prélèvements sont effectués au niveau du septum interventriculaire dans le ventricule droit de patients transplantés cardiaques. Il s'agit donc de cœurs dénervés, et l'analyse histologique des autres biopsies réalisées simultanément exclue toute réaction aiguë de rejet. Brixius et coll., ne fournissent pas de précision sur la localisation des prélèvements ventriculaires gauches (paroi

libre, septum interventriculaire). De plus, les prélèvements sains proviennent de coeurs explantés, non utilisés et pour lesquels les délais d'utilisation ne sont pas précisés.

Bien que, de plus en plus d'études soulignent l'intérêt de l'utilisation du nébivolol dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, notamment en terme d'amélioration de la fonction ventriculaire (Flather et coll., 2005), ses cibles cellulaires ne sont encore que partiellement connues. Il faut en particulier souligner qu'il n'y a pas de corrélation directe chez l'homme entre la diminution de la pression artérielle et l'amélioration de la performance cardiaque (Mangrella et coll., 1998). Ceci indique que seule la diminution de postcharge par le biais de ses effets vasodilatateurs ne permet pas d'expliquer l'amélioration de la fonction ventriculaire. Chez l'homme, la vasodilatation induite sur les microcoronaires par le nébivolol (Dessy et coll., 2005) contribue certainement à l'amélioration de la perfusion myocardique. Compte tenu de l'effet inotrope négatif qu'elle induit, la stimulation β_3 -AR pourrait avoir un effet bénéfique, dans l'insuffisance cardiaque au moins au stade précoce. En effet, en s'opposant aux effets de la stimulation β_1 - et β_2 -AR, le récepteur β_3 -AR pourrait limiter les effets cardiotoxiques des catécholamines, en particulier la surcharge calcique cardiomyocytaire décrite dans l'insuffisance cardiaque. De plus, le couplage à la voie du NO laisse envisager une amélioration de la fonction diastolique (effet lusitrope négatif) et donc de la fonction ventriculaire gauche globale (Massion et coll., 2005).

En conclusion, il peut être suggéré que la combinaison des effets β_3 -ARs du nébivolol permet d'une part de réduire la consommation d'oxygène myocardique (MvO_2) directement par un effet cardiomyocytaire NO-dépendant et indirectement par une diminution des contraintes mécaniques du ventricule gauche (diminution de la postcharge par la vasodilatation périphérique). D'autre part, les effets vasodilatateurs sur la microcirculation coronaire permettent d'augmenter le débit sanguin myocardique et donc l'apport en oxygène. Dans ce contexte, il paraît intéressant de prodiguer aux patients insuffisants cardiaques un traitement susceptible de combiner ces effets à une action β_1 -bloquante, dont l'indication est déjà reconnue dans le contexte de l'insuffisance cardiaque. Le nébivolol possède, semble-t-il, l'ensemble de ces propriétés, pouvant rendre compte de son efficacité et de sa tolérance dans les études cliniques.

III. Effets pro-angiogéniques du récepteur β_3 -adrénergique

A. Introduction

L'endothélium joue un rôle crucial dans de très nombreuses fonctions vasculaires telles que la vasomotricité, la perméabilité, les phénomènes de thrombose et d'hémostase ainsi que l'angiogenèse (Sumpio et coll., 2002). De multiples facteurs angiogéniques augmentent l'expression et l'activité de la NO synthase endothéliale (Hood et coll., 1998). Le NO ainsi produit, agit sur la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Cooke, 2003) mais il peut également induire la production de VEGF par les cellules musculaires lisses vasculaires (Dulak et coll., 2000). La plupart des fonctions endothéliales sont régulées par des voies de signalisation dépendantes de récepteurs endothéliaux. Certains de ces récepteurs couplés aux protéines G, une fois activés, sont susceptibles de moduler la réponse angiogénique. Il a été démontré que la stimulation des récepteurs de type 2 de l'angiotensine II inhibe l'effet pro-angiogénique du VEGF (Bendorff et coll., 2003). Inversement, la stimulation des récepteurs de type 1 à la bradykinine, présents sur les cellules endothéliales, induit une réponse pro-angiogénique par le biais d'une sécrétion autocrine, NO-dépendante de FGF (Parenti et coll., 2001).

Le système nerveux sympathique est largement impliqué dans le maintien de l'homéostasie et la physiopathologie cardiovasculaire. Au niveau vasculaire, les différents sous-types de récepteur adrénériques ont été mis en évidence dans les cellules musculaires lisses et endothéliales avec des fonctions et une répartition variables suivant le lit vasculaire et les espèces considérées (Guimaraes et Moura, 2001). L'effet de la stimulation α_1 -AR sur la prolifération, l'hypertrophie et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires est connu. La stimulation α_1 -AR contribue au remodelage vasculaire que l'on observe dans les phénomènes de resténose par exemple (Zhang et coll., 2004). En revanche, le rôle des catécholamines dans l'angiogenèse n'a été que très peu étudié. Néanmoins, un travail *in vivo* rapporte un effet pro-angiogénique des catécholamines (Chalothorn et coll., 2005). Dans cette étude, la réponse angiogénique à l'ischémie est diminuée chez des souris déficientes en dopamine β -hydroxylase, enzyme nécessaire à la synthèse des catécholamines. Par ailleurs, la stimulation de la sécrétion paracrine de facteurs de croissance par la noradrénaline pourrait favoriser une réponse pro-angiogénique au niveau du myocarde (Weil et coll., 2003) et du tissu adipeux (Tonello et coll., 1999).

L'activation des récepteurs β -ARs est responsable d'une vasodilatation qui est en partie endothélium-dépendante (Guimaraes et Moura, 2001). Il a été démontré que les récepteurs β_2 -ARs endothéliaux sont responsables d'une vasorelaxation dépendante du NO (Ferro et coll., 2004; Iaccarino et coll., 2002). De plus, une étude récente de cette même équipe indique que le récepteur β_2 -AR endothélial joue un rôle capital dans la prolifération cellulaire et la production de VEGF par les cellules endothéliales. Les auteurs soulignent en particulier l'implication de ces récepteurs dans la néoangiogenèse en réponse à l'ischémie (Iaccarino et coll., 2005).

Il est maintenant admis que les récepteurs β_3 -ARs sont présents au niveau de l'endothélium vasculaire de nombreuses espèces (rat, souris, homme) et que leur stimulation induit une vasorelaxation (Trochu et coll., 1999; Dessy et coll., 2004; Dessy et coll., 2005; Rozec et coll., 2005). Cette réponse fonctionnelle est largement dépendante de la production de NO. De plus, un β_1 -bloquant ayant des propriétés agonistes β_3 -ARs, le nébivolol, est capable d'induire une réponse pro-angiogénique dans un modèle *in vitro* d'angiogenèse sur des anneaux aortiques murins. Cet effet disparaît chez les souris β_3 KO (Dessy et coll., 2005). Une étude révèle également que la stimulation β_3 -AR favorise la prolifération et la migration de cellules endothéliales rétiniennes humaines (Steinle et coll., 2003).

Dans la mesure où le NO est un médiateur fondamental de l'angiogenèse (Cooke, 2003) et qu'il joue un rôle central dans les effets de la stimulation β_3 -AR, nous avons évalué le rôle pro-angiogénique potentiel de ce récepteur.

**B. Résumé accepté sous forme de présentation orale au congrès de
l'American Heart Association-2006**

**Beta 3 adrenoceptors promote proangiogenic effects in mouse and human endothelial
cells.**

Rozec B, Jnaoui K, Desajardins F, C. Belge, Ghisdal P, Frerart F, Gauthier C, Feron
O, Dessy C, Balligand JL

Circulation Supp. 2006

β -adrenoceptors (β AR) play a key role in vascular homeostasis, in part endothelium dependent. We recently showed that endothelial β_3 AR mediate a sustained production of NO and vasodilation of human resistance arteries. Since NO is also a key mediator of angiogenesis, we assessed the effect of β_3 AR activation on angiogenesis and blood pressure (BP) regulation in vivo and in vitro.

BP was measured by implanted telemetry in conscious mice. Compared to FVB controls, mice deficient in β_3 AR (β_3 KO) had higher SBP (124.1 ± 0.6 vs 114.1 ± 1.8 , $n=9$ each, $p<0.001$), DBP (100.5 ± 0.7 vs 95.41 ± 1.6 , $n=9$ each, $p<0.01$) than FVB and abolition of their circadian cycle, confirming the physiologic importance of β_3 AR in vivo. In a mouse aortic ring angiogenesis assay, 1nM of β_3 AR agonist SR58611A induced neocapillary tube formation (tubes/ring on day 12: 20.3 ± 2.4 vs control 13.7 ± 1.3 , $n=10$ each, $p<0.05$). A replication-deficient adenovirus was generated to overexpress human β_3 AR in endothelial cells (Ad β_3). β_3 AR overexpression induced phosphorylation of Protein Kinase B (PKB/Akt) in infected human microvascular endothelial cells (HMVEC). In subsequent angiogenesis assays infection of HMVECs-D on Matrigel coated plates with Ad β_3 resulted in a doubling of the length of capillary-like structures ($99.1 \pm 10.6 \mu\text{m}$) vs control AdGFP ($47.4 \pm 17.5 \mu\text{m}$, $n=3$, $p<0.05$). Likewise, using collagen gel-embedded spheroids of HUVECs, infection with Ad- β_3 enhanced the cumulative length of outgrowing sprouts ($171.8 \pm 7.9 \mu\text{m}$, $n=7$) vs control AdGFP ($96.1 \pm 5.8 \mu\text{m}$, $n=4$, $p<0.01$). The NO synthase inhibitor L-NAME ($100 \mu\text{M}$) attenuated the effect ($109.3 \pm 6.4 \mu\text{m}$, $n=6$, $p<0.05$). Moreover, PI3 kinase inhibitor, LY294002 ($15 \mu\text{M}$) significantly reduced the proangiogenic effect of β_3 AR adenovirus ($81.9 \pm 12.9 \mu\text{m}$, $n=6$, $p<0.05$). Finally, in a hindlimb ischemia model, cutaneous blood flow (normalized to contralateral limb, by laser Doppler) was also less at day 7 in β_3 KO ($75.9 \pm 3\%$) vs FVB controls ($92.5 \pm 3\%$, $n=4$ each, $p<0.05$)

We conclude that the β_3 AR activates PKB/Akt pathway and mediates a NO-dependent proangiogenic effect in vivo and in vitro. Given the resistance of β_3 AR to homologous desensitization, this novel pathway may support a proangiogenic effect in response to ischemia with prolonged catecholamine stimulation.

C. Résultats

1. Effet de la stimulation β_3 -adrénergique sur la réponse angiogénique

Nous avons évalué les effets d'un agoniste β_3 -AR préférentiel, le SR 58611A, sur la réponse angiogénique d'anneaux d'aorte thoracique de souris C57Bl6 cultivées dans un gel de collagène. En présence de 1 nM de SR 58611A, une augmentation significative du nombre de microtubes est observée dès le 7^{ème} jour par rapport à des anneaux contrôles ($8 \pm 1,63$ n=10 vs $3,9 \pm 0,55$, n = 10 ; p<0,05). Ce résultat se confirme au cours des mesures réalisées aux 9^{ème} ($14,3 \pm 2,16$ n = 10 vs $7,9 \pm 0,86$ n=10, p<0,05) et 12^{ème} jours ($20,3 \pm 2,42$ n=10 vs $13,7 \pm 1,28$ n = 10, p<0,05).

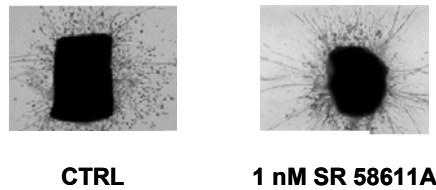


Figure 42 : Exemples de réponse angiogénique observée au 12^{ème} jour sur un anneau aortique contrôlé et un anneau traité par le SR 58611A.

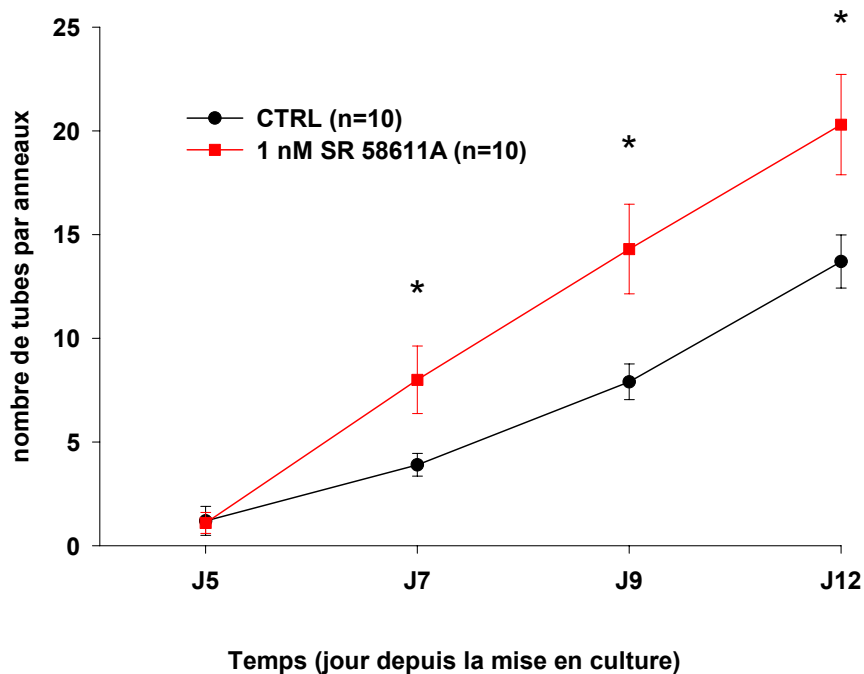


Figure 43 : Effets pro-angiogéniques du SR 58611A (1 nM), agoniste préférentiel du récepteur β_3 -AR. La réponse angiogénique est exprimée comme étant la moyenne (\pm S.E.M) du nombre de microtubes vasculaires générés par un anneau aortique au 5^{ème} (J5), 7^{ème} (J7), 9^{ème} (J9) et 12^{ème} (J12) jours. N=10 dans chaque condition. * : $p < 0,05$ vs contrôle (CTRL).

2. Augmentation de l'expression du récepteur β_3 -AR dans des cellules endothéliales humaines (HUVEC ou HMVEC-D) suite à l'infection par adénovirus Ad β_3 AR

Les lignées de cellules endothéliales humaines que nous avons utilisées, n'expriment pas en culture le récepteur β_3 -AR de manière détectable. Nous avons utilisé un adénovirus bicistronique, l'Ad β_3 AR, porteur du gène de ce récepteur et d'une protéine fluorescente, la GFP, afin de surexprimer le récepteur β_3 -AR humain. Un adénovirus porteur uniquement du gène de la GFP, AdGFP, nous a permis de réaliser des expériences contrôles.

Afin de confirmer l'efficacité de l'infection des cellules endothéliales par l'Ad β_3 AR en terme d'expression de la protéine, nous avons réalisé des expériences d'immuno-

empreintes à partir d'extraits protéiques cellulaires en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur β_3 -AR humain.

Nous avons infecté avec des niveaux de MOI (Multiplicity of infection = nombre de particules virales par cellule) croissants (100-500-2500 MOI) d'Ad β_3 AR, des HMVEC-D pour moduler le niveau d'expression de la protéine. Parallèlement, nous avons constitué des groupes contrôles d'HMVEC-D non infectées ou infectées avec l'AdGFP aux mêmes MOI (100-500-2500 MOI) (Figure 44). Dans les cellules non infectées, l'expression d'un éventuel récepteur β_3 -AR endogène n'est pas détectable. La présence d'une bande à un poids moléculaire de 40 kDa signe l'expression du récepteur dans sa forme non glycosylée (le récepteur compte 408 acides aminés). Le niveau d'expression de la protéine est bien directement corrélé à la charge virale appliquée aux cellules. Le niveau d'expression optimal est fixé pour la suite des expériences à 500 MOI.

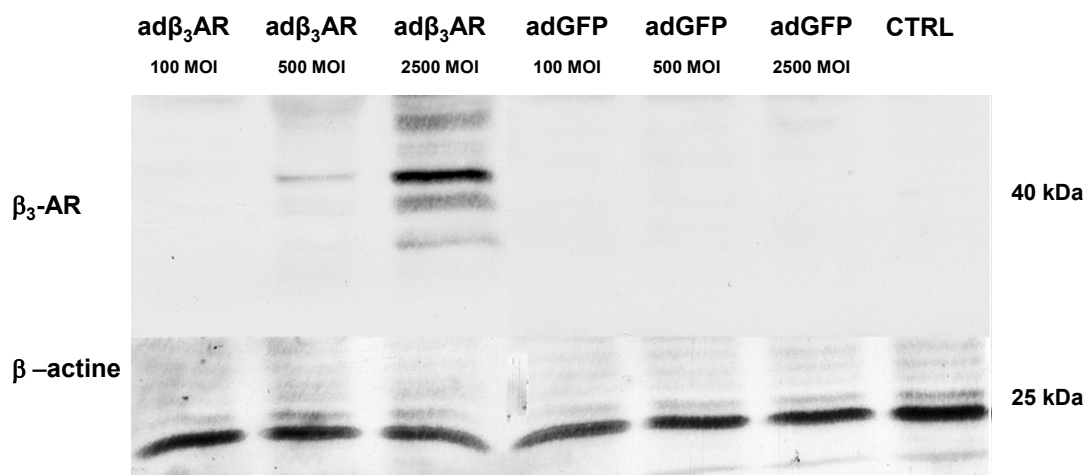


Figure 44 : Immunoempreinte analysant le niveau d'expression du récepteur β_3 -AR humain dans des cellules HMVEC-D infectées à des MOI croissantes (100-500-2500) avec les virus ad β_3 AR et adGFP. L'équivalence de charge protéique est confirmée par l'immuno-empreinte de la β -actine. Les poids moléculaires sont indiqués sur la droite de l'image. CTRL : cellules non infectées.

Pour optimiser encore le niveau d'expression du récepteur β_3 -AR avec ce vecteur, nous avons comparé plusieurs délais entre la fin de l'exposition à la solution adénovirale (500 MOI, pendant 1 H 30 à 2 H) et la préparation des extraits protéiques des cellules HMVEC-D (6 H, 18 H et 24 H). Cette cinétique d'expression nous a permis de déterminer que le niveau optimal est obtenu 6 H après le début d'infection (Figure 45). Par ailleurs, il faut signaler la

présence d'un marquage à des poids moléculaires d'environ 25 kDa, lors des durées d'expression de 18 H. Ces bandes évoquent une possible dégradation du récepteur.

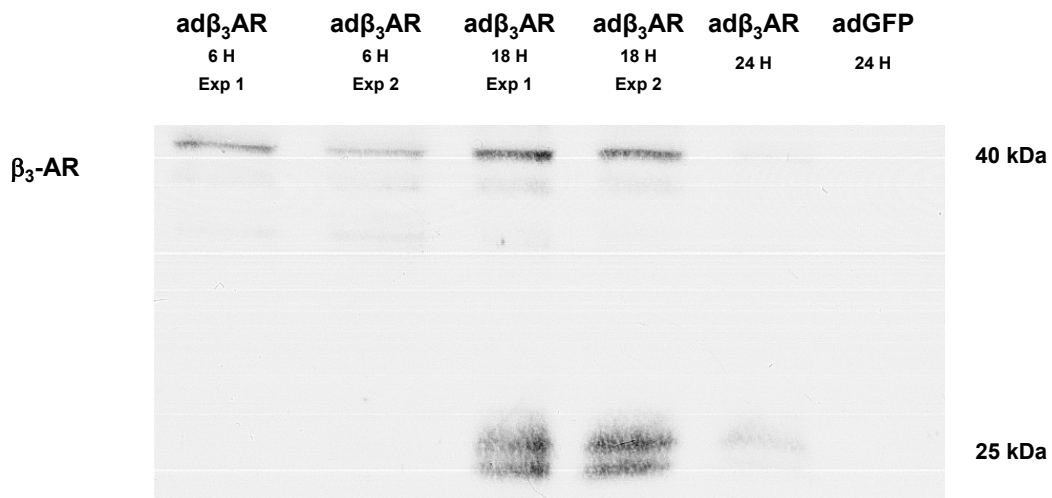


Figure 45 : Immunoempreinte analysant le niveau d'expression du récepteur β_3 -AR humain dans des cellules HMVEC-D infectées avec 500 MOI d' $\text{ad}\beta_3\text{AR}$ ou d' adGFP en fonction des délais (6 H, 18 H ou 24 H) après infection. Deux expériences indépendantes ont été réalisées à 6 H et à 18 H. Les poids moléculaires sont indiqués sur la droite de l'image.

Par immuno-marquage de cellules endothéliales (HMVEC-D et HUVEC) en culture avec un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur β_3 -AR humain, nous avons confirmé l'expression du récepteur (Figure). En effet, nous avons retrouvé un marquage membranaire par l'anticorps anti- β_3 -AR humain des cellules infectées par l' $\text{Ad}\beta_3\text{AR}$. Ce marquage est absent en cas d'infection par l' AdGFP et en l'absence d'infection. L'efficacité de l'infection par les 2 adénovirus est confirmée par la présence d'une fluorescence verte (les 2 adénovirus portant le gène de la GFP). Il n'y a pas de marquage non spécifique par l'anticorps secondaire ou tertiaire.

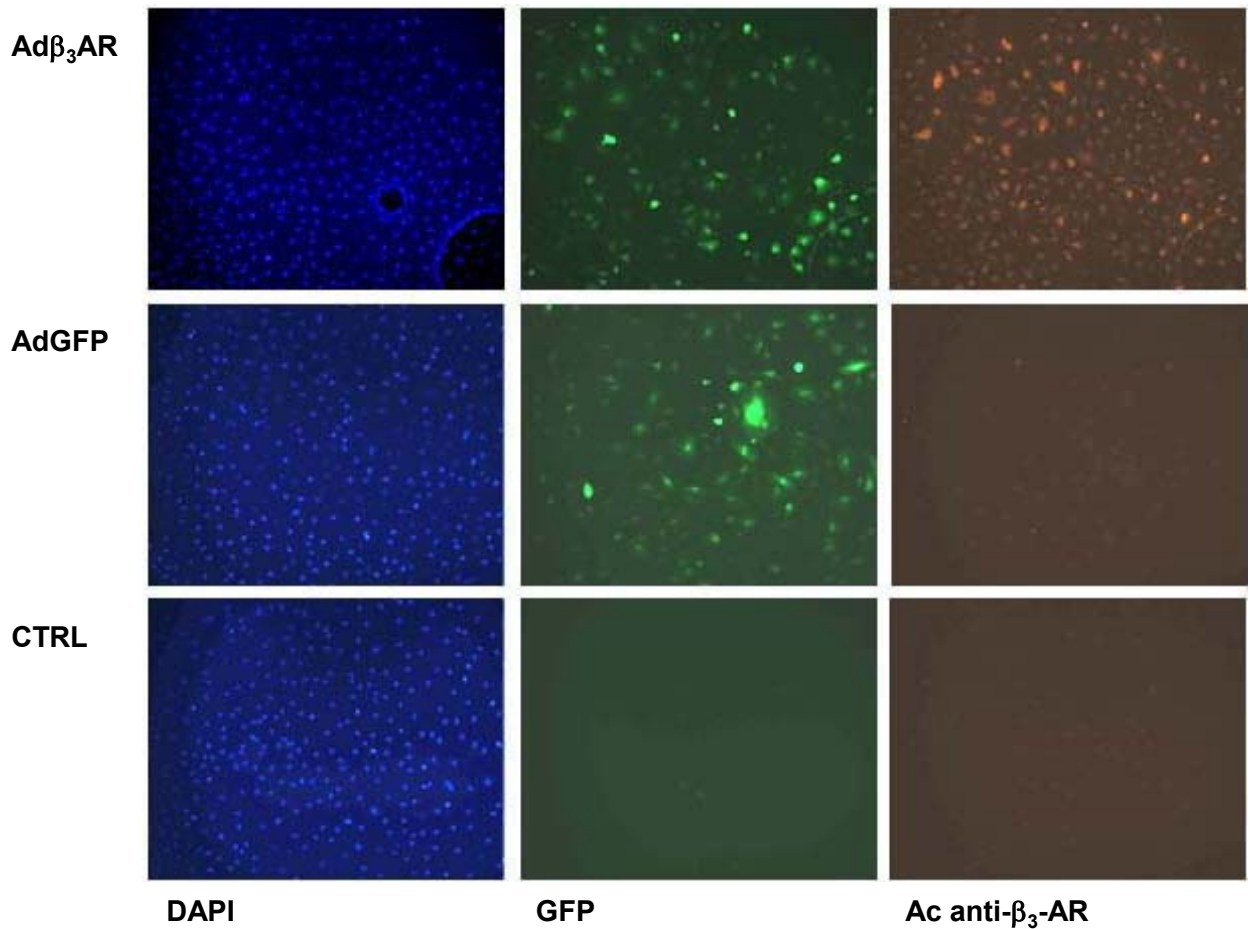


Figure 46 : Immunocyto marquage de cellules endothéliales HMVEC-D infectées ou non par 500 MOI d'Ad β_3 AR ou d'AdGFP. L'acquisition des images est faite à un grossissement X10. Le milieu de montage contient du DAPI permettant la mise en évidence des noyaux et donc une évaluation des densités cellulaires. La fluorescence verte (GFP) confirme l'efficacité de l'infection par les adénovirus. L'absence de fluorescence rouge en présence d'anticorps anti-récepteur β_3 AR humain (Ac anti- β_3 -AR) révélée par l'anticorps tertiaire couplé à un fluorochrome (TRITC, rouge), atteste de l'absence ou du bas niveau d'expression de la protéine .CTRL : cellules non infectées.

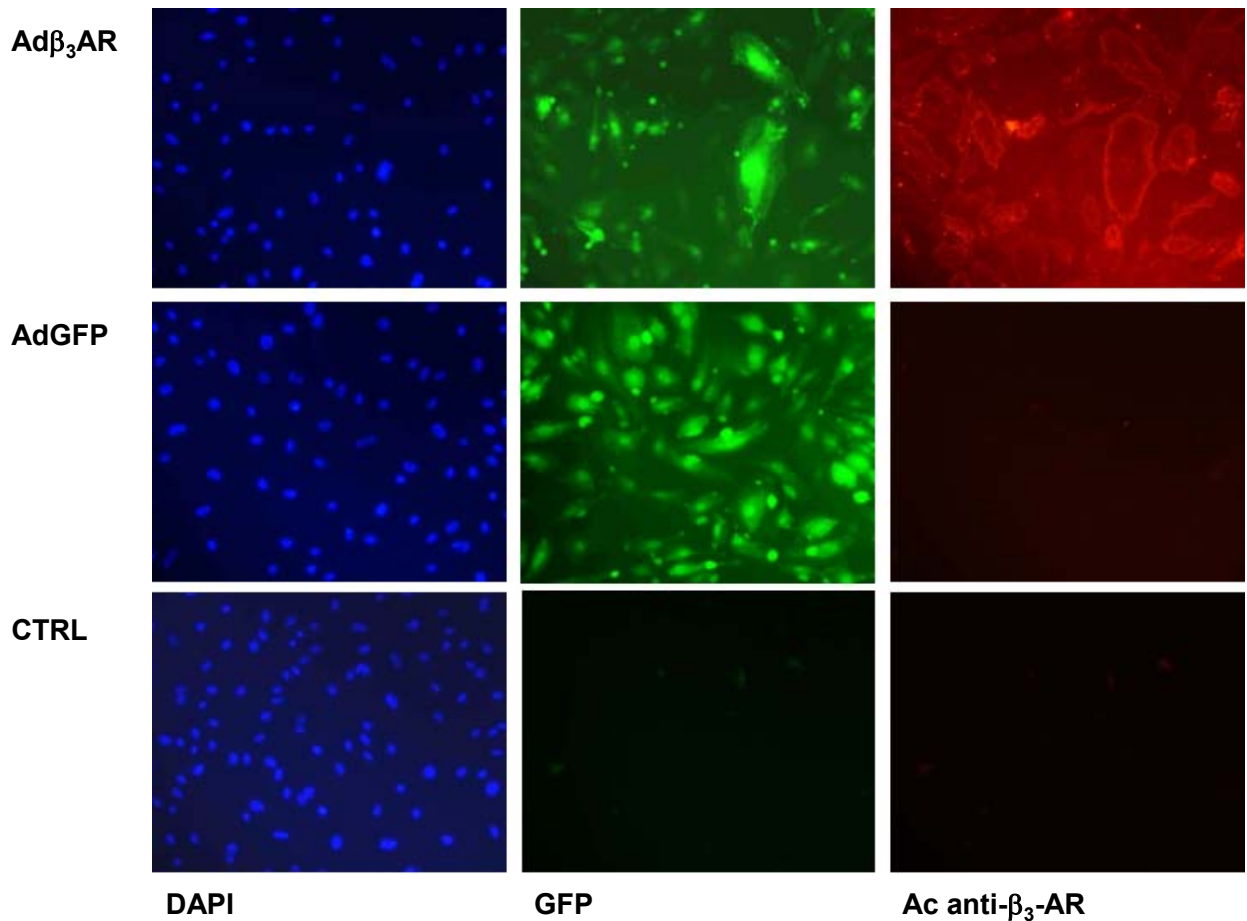


Figure 47 : Immunocytomarquage de cellules endothéliales HUVEC infectées ou non par 500 MOI d'ad β_3 AR ou d'adGFP. L'acquisition des images est faite à un grossissement X20. A ce grossissement, il est possible de constater la localisation membranaire du récepteur. Le milieu de montage contient du DAPI permettant la mise en évidence des noyaux et donc une évaluation des densités cellulaires. La fluorescence verte (GFP) confirme l'efficacité de l'infection par les adénovirus. L'absence de fluorescence rouge en présence d'anticorps anti-récepteur β_3 AR humain (Ac anti- β_3 -AR) révélée par l'anticorps tertiaire couplé à un fluorochrome (TRITC, rouge), atteste de l'absence ou du bas niveau d'expression de la protéine. CTRL : cellules non infectées.

Après infection avec 500 MOI des deux adénovirus, il ressort que plus de 80% des cellules expriment la GFP (mesure par FACS) (Figure 48 et Tableau 22).

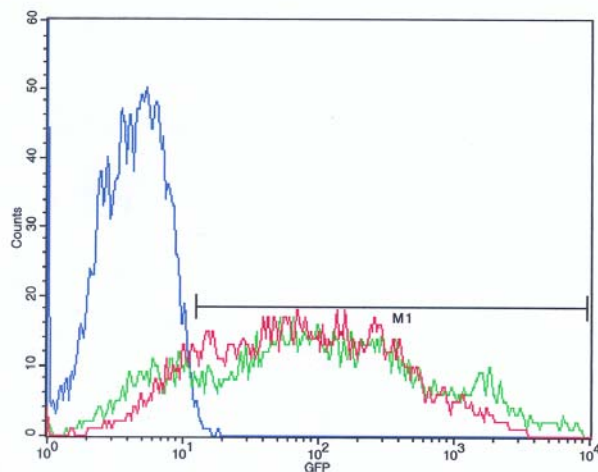


Figure 48 : Diagramme représentant le nombre de cellules (Count) en fonction de l'intensité de la fluorescence (GFP) obtenue par FACS. M1 est la fenêtre de mesure des cellules fluorescentes. La courbe bleu représente les cellules non infectées, la courbe rouge les cellules infectées par 500 MOI d'Ad β_3 AR et la courbe verte les cellules infectées par 500 d'AdGFP.

Protocoles	Taux de cellules fluorescentes
Cellules non infectées	0,78%
Cellules infectées par 500 MOI d'Ad β_3 AR	85,55%
Cellules infectées par 500 MOI d'AdGFP	80,61%

Tableau 22 : Détermination par FACS du taux de cellules HMVEC-D fluorescentes et donc exprimant la GFP après infection ou non par 500 MOI d'Ad β_3 AR ou d'AdGFP.

3. Evaluation de la réponse angiogénique *in vitro* de cellules endothéliales humaines surexprimant le récepteur β_3 -AR

(a) Culture d'HMVEC-D sur GFR-Matrigel®

Après infection de cellules endothéliales HMVEC-D par 500 MOI d'Ad β_3 AR ou d'AdGFP, la réponse angiogénique, estimée par la longueur (en μm) du réseau de structures capillaires formé par ces cellules mises en culture durant 20 H sur un gel de GFR-Matrigel®, est significativement augmentée pour les cellules surexprimant le récepteur β_3 -AR humain ($93,16 \pm 10,63 \mu\text{m}$, n = 3) par rapport au cellules infectées par l'AdGFP ($47,37 \pm 17,50 \mu\text{m}$, n = 3) ou non infectées ($43,39 \pm 13,06 \mu\text{m}$, n = 3).

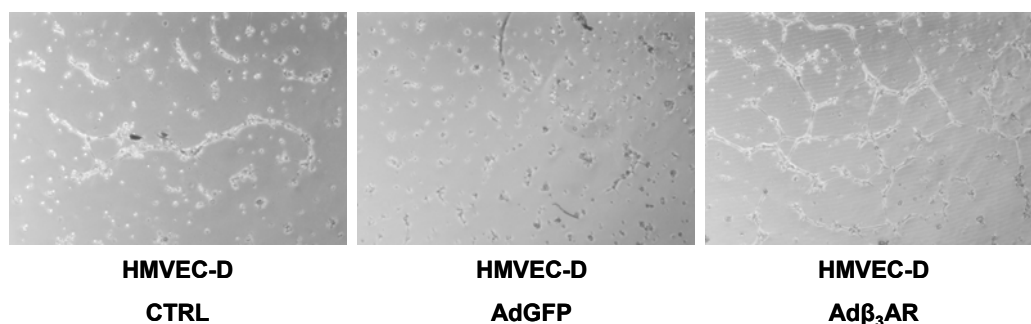


Figure 49 : Exemples de réseaux de structures capillaires constitués par des HMVEC-D sur GFR Matrigel® après 20 H. Les cellules HMVEC-D ont été préalablement infectées par les adénovirus Ad β_3 AR ou AdGFP. CTRL : cellules non infectées.

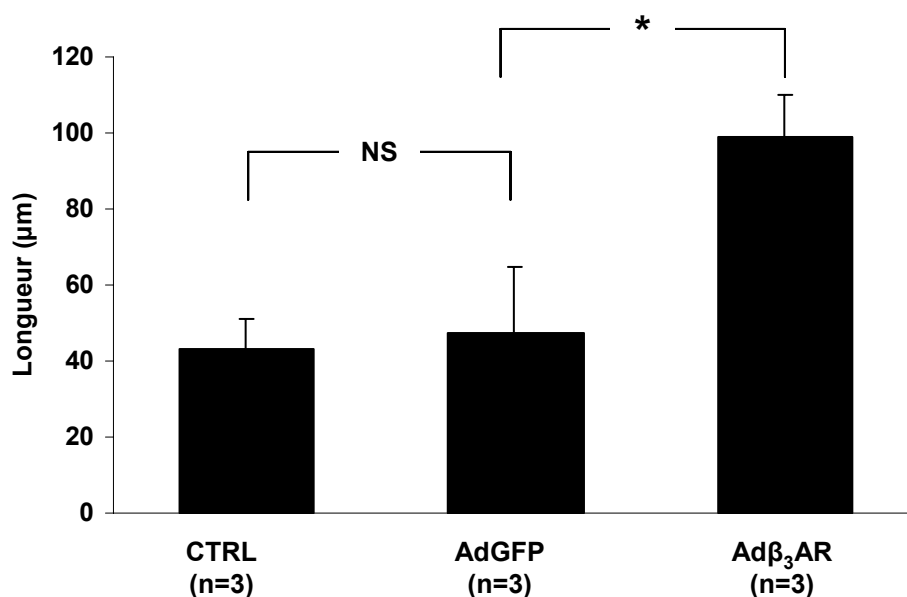


Figure 50 : Longueur en μm du réseau de structures capillaires constitué par des HMVEC-D sur GFR Matrigel® après 20 H. Les cellules HMVEC-D ont été infectées ou non préalablement avec 500 MOI d'Ad β_3 AR ou d'AdGFP. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Il s'agit de 3 expériences indépendantes où les 3 conditions ont été analysées (Ad β_3 AR, AdGFP ou CTRL). CTRL : cellules non infectées. *, $p < 0,05$ versus CTRL ; NS, non significatif.

(b) Sphéroïdes d'HUVEC sur gel de collagène

Afin de valider ce modèle, nous avons testé l'effet d'un facteur de croissance, le bFGF (basic fibroblast growth factor, GicoBRL Life Technologies) à raison de 30 ng/ml pendant 24 H et d'un donneur de NO, le DETA-NONOate (3,3 bis (aminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazène) (Sigma), à une concentration de 10 μM pendant 24 H. Dans les 2 cas, une augmentation significative de la longueur des structures capillaires bourgeonnantes à la surface des sphéroïdes d'HUVEC est obtenue (Figures 51 et 52) : la longueur est multipliée par un facteur 4 par rapport aux conditions contrôles ($58,78 \pm 5,88$, $n=6$) par traitement avec le bFGF ($224,22 \pm 15,89$ μm , $n=4$). La formation de structures capillaires est fortement stimulée par le DETA-NONOate qui est un donneur de NO à libération prolongée (demi-vie : 3 400 min.) ($134,11 \pm 8,64$ μm , $n=6$) mais dans une moindre mesure qu'avec le bFGF.

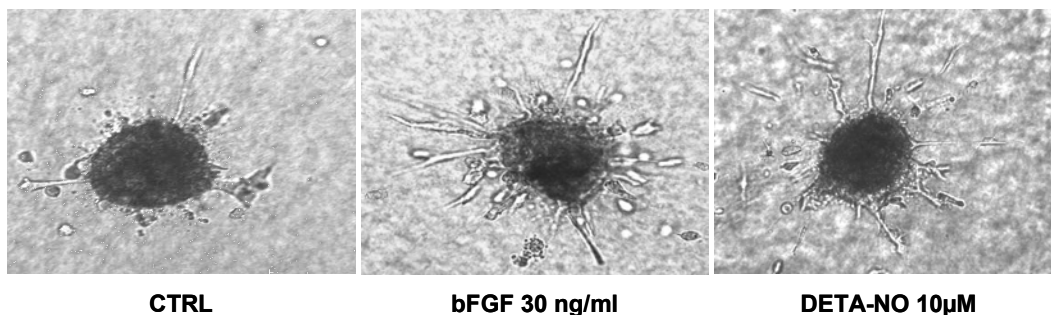


Figure 51 : Exemple de sphéroïdes dans des conditions de base (CTRL) et en présence de 30 ng/ml de bFGF, de 10µM de DETA-NONOate. Grossissement X20

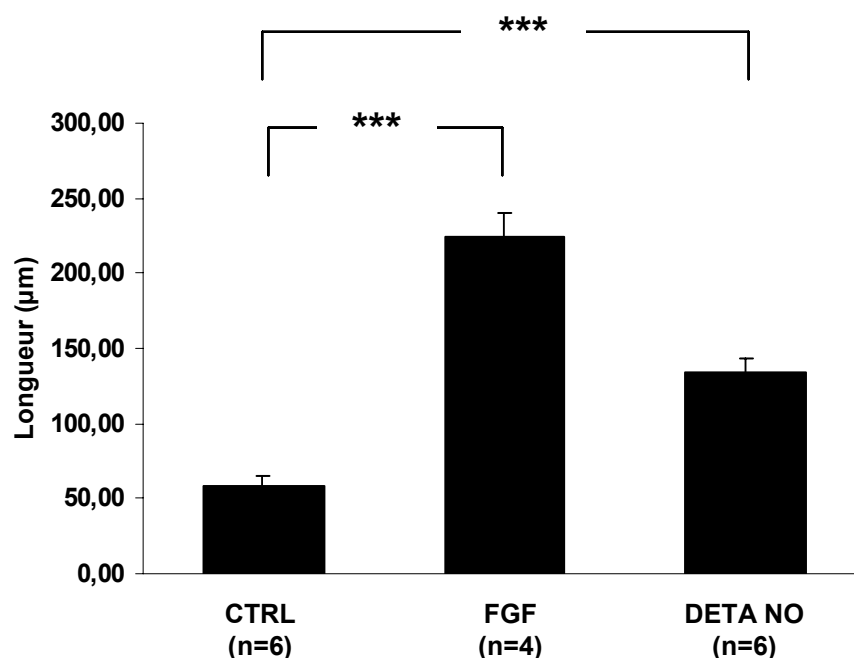


Figure 52 : Effet de 30 ng/ml de bFGF (FGF) et de 10µM de DETA-NONOate sur la longueur de structures capillaires générées par les sphéroïdes d'HUVEC. La longueur cumulée des tubes issus de 10 sphéroïdes d'HUVEC en 24 H est exprimée en µm. ***, $p < 0,001$ versus CTRL.

La longueur cumulée de tubes formés en 24 H par 10 sphéroïdes déposés dans un gel de collagène est augmentée de manière significative, lorsque les cellules endothéliales HUVEC utilisées surexpriment le récepteur β_3 -AR humain après infection par 500 MOI d'Ad β_3 AR ($171,75 \pm 7,96$ µm, n = 7) par rapport à des sphéroïdes de cellules non infectées ($58,78 \pm 5,88$ µm, n = 6) ou infectées avec 500 MOI d'AdGFP ($96,05 \pm 5,81$ µm, n = 4) (Figure 54). Il convient de remarquer que l'infection par l'AdGFP, double la réponse angiogénique observée

par rapport aux conditions CTRL, cependant pour une même charge virale, l'effet de l'Ad β_3 AR est significativement supérieur à cette réponse non-spécifique.

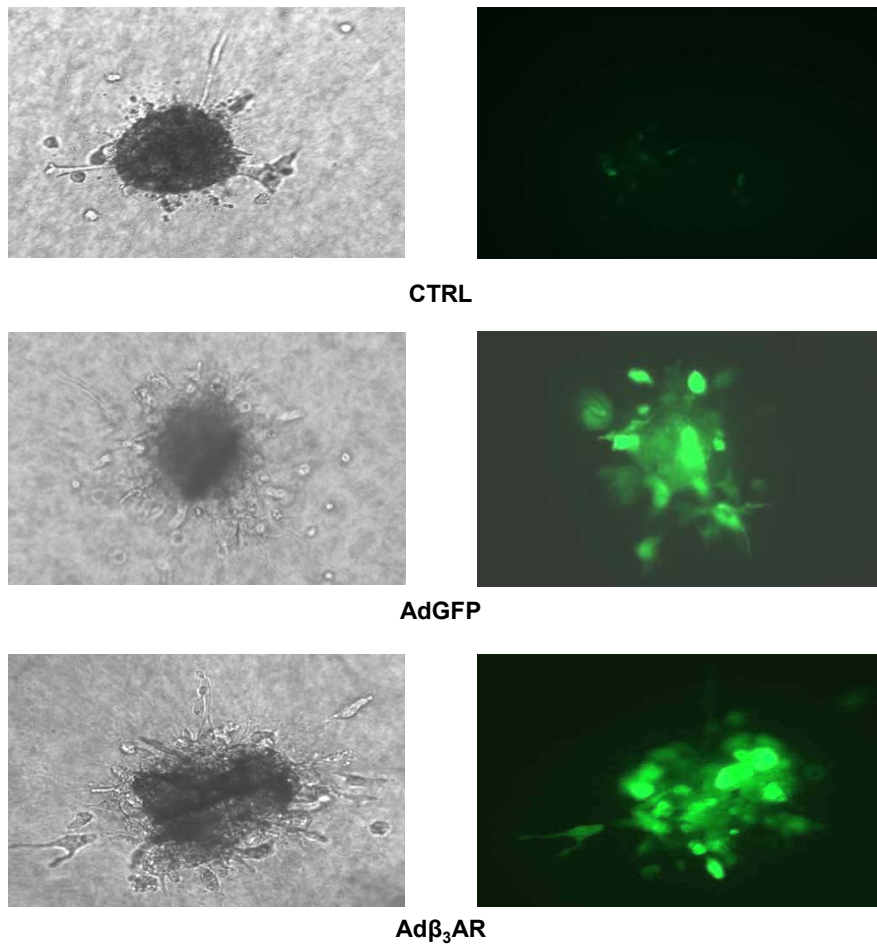


Figure 53 : Exemple de sphéroïdes d'HUVEC infectées ou non par 500 MOI d'Ad β_3 -AR ou d'AdGFP. CTRL : cellules non infectées. Colonne de droite : aspect des sphéroïdes en lumière UV ($\lambda_{ex} = 385$ nm). Grossissement X20.

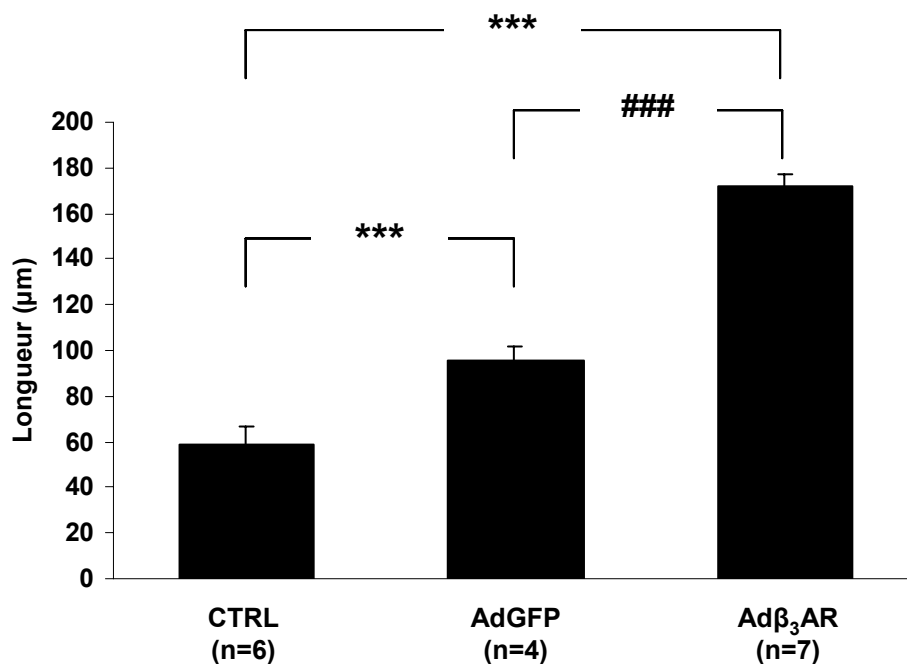


Figure 54 : Effet de la surexpression du récepteur β_3 -AR sur la formation de structure tubulaire à partir de sphéroïdes d'HUVEC placés dans un gel de collagène. La longueur cumulée des tubes issus de 10 sphéroïdes d'HUVEC en 24 H est exprimée en μm . Les cellules sont infectées ou non (CTRL) préalablement par 500 MOI d'adénovirus Ad β_3 AR ou AdGFP. Le nombre d'expériences indépendantes (n) est indiqué dans chaque condition. ***, $p < 0,001$ versus CTRL ; ###, $p < 0,001$ versus AdGFP.

4. Voies de signalisations impliquées dans la réponse angiogénique induite par la surexpression du récepteur β_3 -AR humain

Afin de préciser les voies de signalisation potentiellement impliquées dans la réponse angiogénique induite par la surexpression du récepteur β_3 -AR humain dans les HUVEC, nous avons évalué l'effet d'antagonistes spécifiques de certaines protéines clefs de la transduction du signal β_3 -AR. Parallèlement, nous avons cherché à mettre en évidence l'activation par phosphorylation de certaines de ces protéines par des techniques d'immuno-empreinte.

(a) Rôle de la voie du NO dans la réponse angiogénique induite par la surexpression du récepteur β_3 -AR humain.

Afin de préciser le rôle de la voie du NO dans la réponse angiogénique des HUVEC infectées par Ad β_3 AR, nous avons testé l'effet de l'application de 100 μM de L-NAME (N ω -Nitro-L-

arginine methyl ester hydrochloride) (Sigma) dans le gel de collagène pendant 24 H, après que les HUVEC des sphéroïdes aient été infectées par Ad β_3 -AR. L'intensité de la réponse angiogénique induite par la surexpression du récepteur β_3 -AR ($171,75 \pm 7,96 \mu\text{m}$, n = 7) est réduite de moitié par cet inhibiteur non spécifique de NO synthase ($109,27 \pm 6,4 \mu\text{m}$, n=6) (Figure 55). Une partie de l'effet pro-angiogénique induit par la surexpression du récepteur β_3 -AR humain persiste de manière significative en présence de L-NAME par rapport aux conditions contrôles.

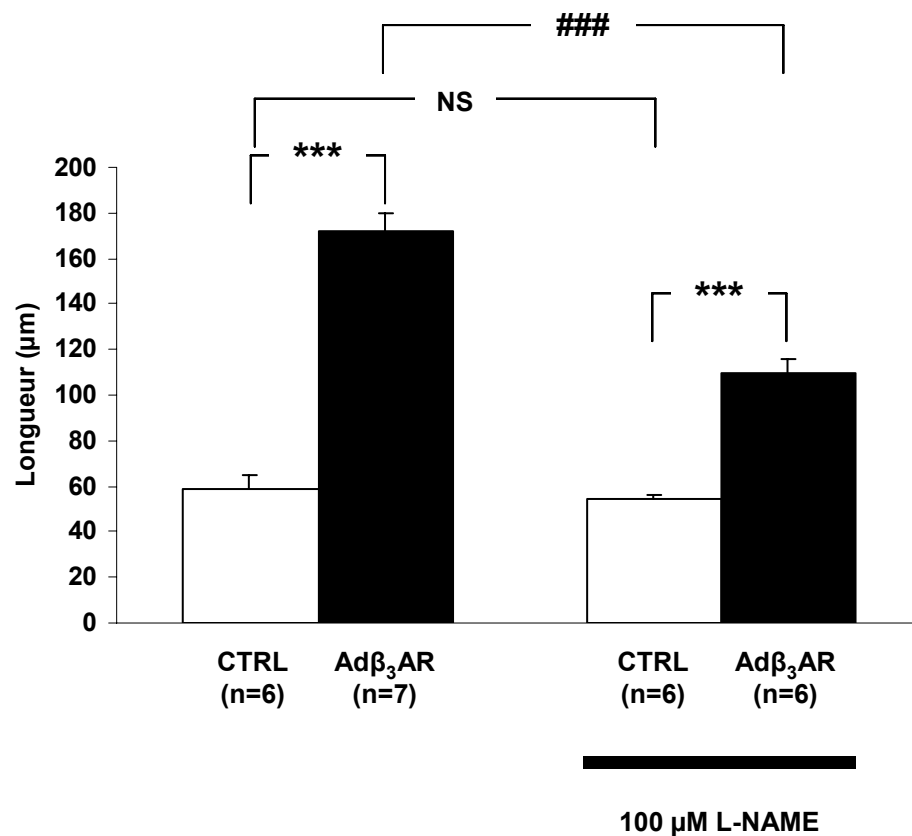


Figure 55 : Effet du L-NAME (inhibiteur de NO synthase) sur l'effet pro-angiogénique de la surexpression du récepteur β_3 -AR humain dans des HUVEC. La longueur cumulée des tubes issus de 10 sphéroïdes d'HUVEC en 24 H est exprimée en μm . Les cellules sont infectées ou non (CTRL) préalablement par 500 MOI d'adénovirus Ad β_3 AR. Des sphéroïdes d'HUVEC infectées sont traités 24 H avec $100 \mu\text{M}$ de L-NAME. Le nombre d'expériences indépendantes (n) est indiqué dans chaque condition. ***, $p < 0,001$ versus CTRL ; ###, $p < 0,001$ versus Ad β_3 AR sans L-NAME ; NS : non significatif

Par ailleurs, nous avons cherché à mettre en évidence la phosphorylation de la sérine 1177 de la NO synthase endothéliale, dans la mesure où ce phénomène constitue un de ses modes d'activation. Dans toutes les conditions (cellules non infectées ou infectées par les deux types d'adénovirus), nous n'avons pas mis en évidence la présence de la NO synthase endothéliale phosphorylée en Ser-1177. (Figure 56).

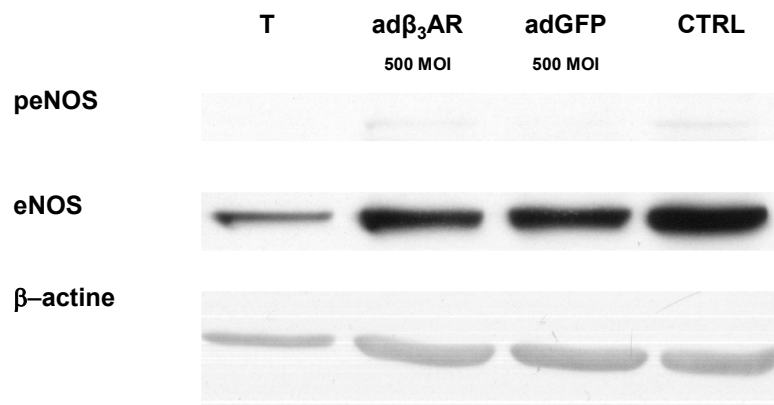


Figure 56 : Exemple d'immuno-empreinte réalisée pour mettre en évidence la forme phosphorylée de la NO synthase endothéliale (peNOS). La phosphorylation de eNOS n'est détectée dans aucune condition expérimentale, alors que la forme non phosphorylée est présente (eNOS) et que la charge protéique est équivalente pour les 3 conditions, Adβ₃-AR, AdGFP et CTRL, comme l'atteste l'immuno-empreinte de la β-actine. CTRL : cellules non infectées. T : cellules sans sérum pendant 2 H.

(b) Implication de la voie Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Protein kinase B (PI3-Kinase/Akt-PKB) dans la réponse angiogénique induite par la surexpression du récepteur β₃-AR humain

Pour préciser l'implication potentielle de la voie PI3-kinase-Akt/PKB dans la transduction du signal induit par la surexpression du récepteur β₃-AR, les sphéroïdes d'HUVEC infectées avec 500 MOI d'Adβ₃AR ont été traités par 15 μM de Ly 294002 (Calbiochem), un inhibiteur hautement spécifique de PI3-kinase (kinase responsable de la phosphorylation du phosphatidylinositol) (Gerhardt et coll., 1999). Cet inhibiteur étant dissout dans du DMSO, nous avons réalisé des expériences contrôles sur des sphéroïdes d'HUVEC infectées ou non par Adβ₃AR en présence de la même quantité de solvant. Après 24 H d'incubation en présence de cet inhibiteur, la longueur des tubes générés par les sphéroïdes de cellules surexprimant le récepteur β₃-AR est significativement réduite ($81,86 \pm 5,25 \mu\text{m}$, n=6) par

rapport aux sphéroïdes en présence de DMSO ($115,77 \pm 10,28$, $n=4$) (Figure 57). Cependant, cette inhibition n'est que partielle, puisqu'il persiste une réponse angiogénique chez les sphéroïdes d'HUVEC infectées par Ad β_3 AR en présence de Ly 294002 par rapport aux conditions de base.

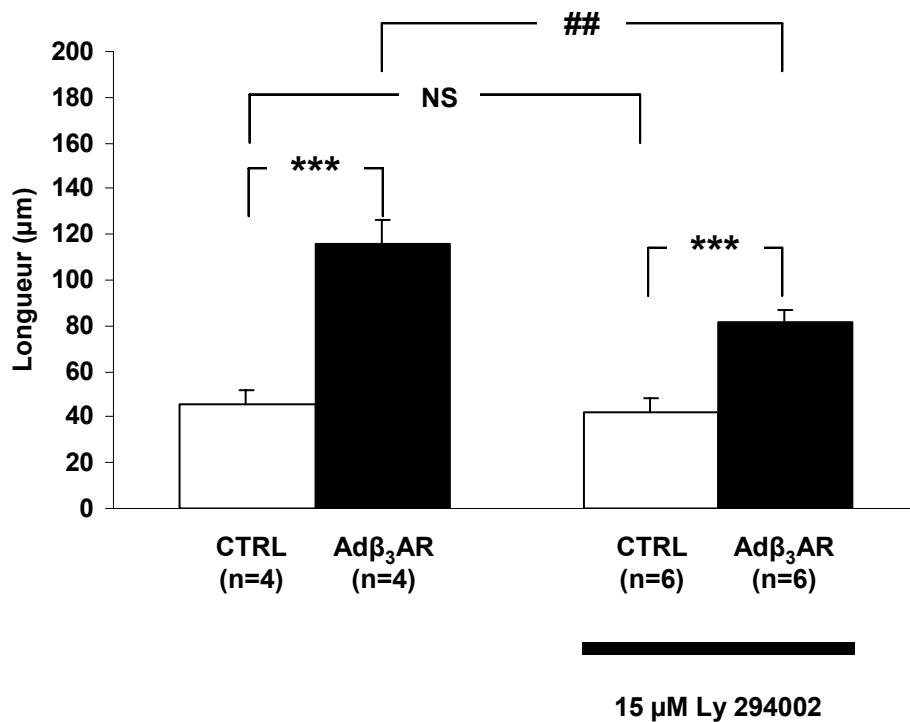


Figure 57 : Effet du Ly 294002 (inhibiteur de PI3-kinase) sur l'effet pro-angiogénique de la surexpression du récepteur β_3 -AR humain dans des HUVEC. La longueur cumulée des tubes issus de 10 sphéroïdes d'HUVEC en 24 H est exprimée en μm . Les cellules sont infectées ou non préalablement par 500 MOI d'adénovirus Ad β_3 AR. Des sphéroïdes d'HUVEC infectées sont traités 24 H avec 15 μM de Ly 294002 ou en présence de DMSO (solvant du Ly 294002). Des expériences sont menées en parallèle avec les mêmes traitements sur des sphéroïdes de cellules non infectées (CTRL). Le nombre d'expériences indépendantes (n) est indiqué dans chaque condition. ***, $p < 0,001$ versus CTRL ; ##, $p < 0,01$ versus Ad β_3 AR sans Ly 294002 ; NS : non significatif

De plus, par immuno-empreinte, nous avons montré, dans les HUVEC infectées par 500 MOI d'Ad β_3 AR, une nette augmentation de la forme phosphorylée d'Akt-PKB (la phosphorylation et donc l'activation de cette protéine kinase sont régulées par les taux de phosphatidyl-inositol-triphosphate produit par la PI3 kinase) (Figure 58)

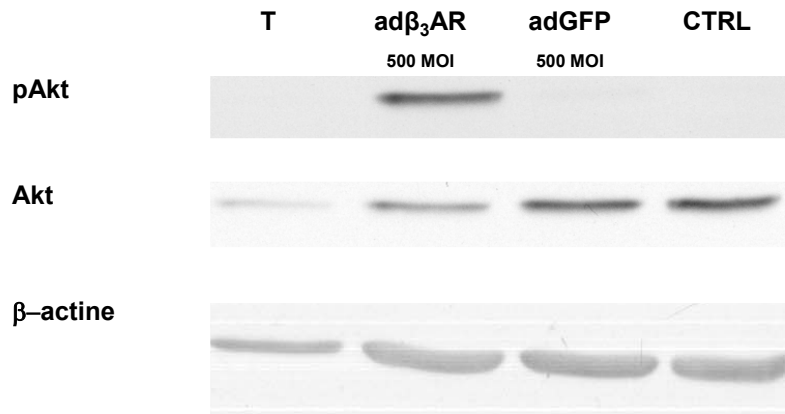


Figure 58 : Exemple d'immuno-empreinte mettant en évidence la forme phosphorylée de Akt-PKB (pAkt). La phosphorylation de cette protéine est très nette dans les cellules HUVEC infectées par Ad β_3 AR par rapport aux deux autres conditions pour une charge protéique équivalente pour les 3 conditions Ad β_3 -AR, AdGFP et CTRL comme l'atteste l'immuno-empreinte de la β -actine. CTRL : cellules non infectées. T : cellules sans sérum pendant 2 H.

La même constatation est faite sur des cellules endothéliales HMVEC-D infectées. Il semble par ailleurs que cette phosphorylation d'Akt-PKB soit directement proportionnelle au niveau d'expression du récepteur β_3 -AR dans ces cellules (Figure 59).

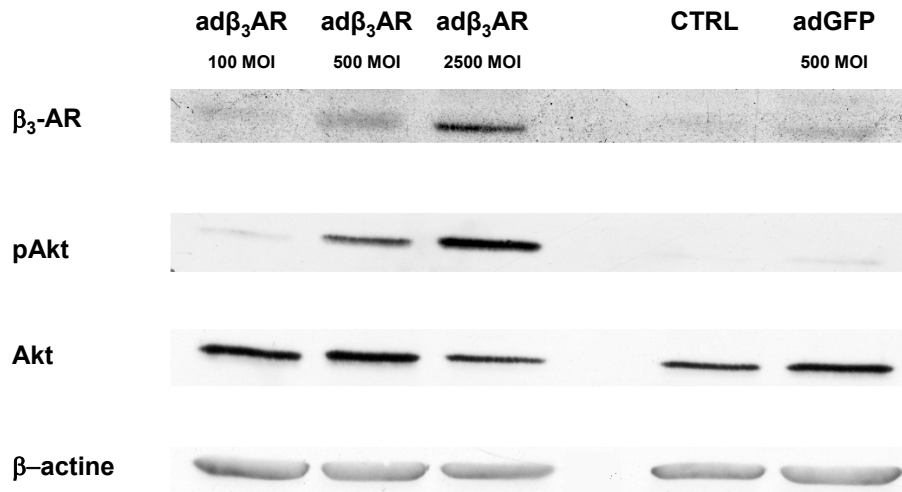


Figure 59 : Immuno-empreinte mettant en évidence la relation entre le niveau d'expression du récepteur β_3 -AR humain dans des cellules HMVEC-D infectées par Ad β_3 AR à des MOI croissantes (100-500-2500 MOI) et l'intensité de la phosphorylation d'Ak-PKBt (pAkt). L'importance de la forme phosphorylée est à rapporter avec la forme non phosphorylée (Akt). La charge protéique est équivalente dans tous les échantillons comme l'atteste l'immuno-empreinte de β .actine.

(c) Participation de la voie Extracellular Receptor-activated Kinase 1/2 (ERK1/2)

Au cours de l'angiogenèse, l'activation de la voie ERK1/2 est classiquement décrite (Munoz-Chapuli et coll., 2004). De plus, dans différents modèles cellulaires, il a été démontré que la stimulation du récepteur β_3 -AR humain induit l'activation de la voie ERK 1/2 (Robay et coll., 2004). Nous avons donc voulu évaluer une possible activation de cette voie de signalisation au cours de la surexpression du récepteur β_3 -AR dans les cellules endothéliales.

Des sphéroïdes d'HUVEC infectées ou non par 500 MOI d'Ad β_3 AR ont été mis en présence pendant 24 H de 10 μ M de PD 98059, un inhibiteur sélectif de MEK1 (Mitogene activated kinase Kinase 1). Pour s'affranchir des effets potentiels du solvant de ce composé, le DMSO, nous avons mené en parallèle une série d'expériences où les sphéroïdes étaient

incubés 24 H en présence d'une concentration équivalente de DMSO. Dans ces conditions, nous avons constaté une potentialisation de la formation de structures capillaires en présence de PD 98059 dans les sphéroïdes de cellule infectées par Ad β_3 AR (respectivement $181,21 \pm 23,52 \mu\text{m}$, n=4 et $115,28 \pm 10,28 \mu\text{m}$, n=6 ; p<0,05) (Figure 60).

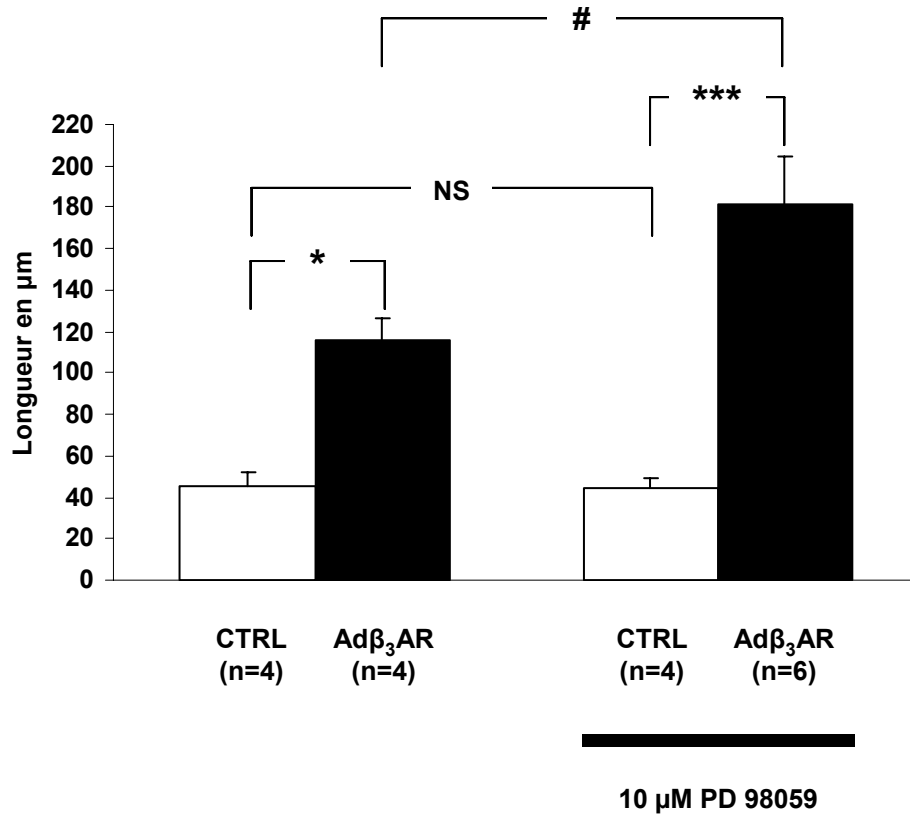


Figure 60 : Effet du PD 98059 (inhibiteur de ERK/MAPK) sur l'effet pro-angiogénique de la surexpression du récepteur β_3 -AR humain dans des HUVEC. La longueur cumulée des tubes issus de 10 sphéroïdes d'HUVEC en 24 H est exprimée en μm . Les cellules sont infectées ou non préalablement par 500 MOI d'adénovirus Ad β_3 AR. Des sphéroïdes d'HUVEC infectées sont traités 24 H avec 10 μM de PD 98059 ou en présence de DMSO (solvant du PD 98059). Des expériences sont menées en parallèle avec les mêmes traitements sur des sphéroïdes de cellules non infectées (CTRL. Le nombre d'expériences indépendantes (n) est indiqué dans chaque condition. *, p<0,05 ; ***, p<0,001 versus CTRL ; #, p<0,051 versus Ad β_3 AR sans PD 98059 ; NS : non significatif.

L'analyse des immuno-empreintes réalisées avec des anticorps spécifiques des formes phosphorylées ou non de ERK1/2 révèle l'activation de cette voie, sans qu'il soit possible de faire une différence entre les trois conditions suivantes : l'infection par Ad β_3 AR, par AdGFP ou l'absence d'infection. Il faut cependant remarquer que dans le cas des HUVEC, les cellules infectées présentent une très discrète diminution des formes phosphorylées de ERK1/2 (Figure 61). En revanche, dans les cellules sevrées en sérum pendant 2 H avant préparation des extraits protéiques, il n'y a pas d'activation de ERK1/2. Il semble donc que le fait de mettre les cellules en présence de sérum après une phase de sevrage de 2 H active cette voie.

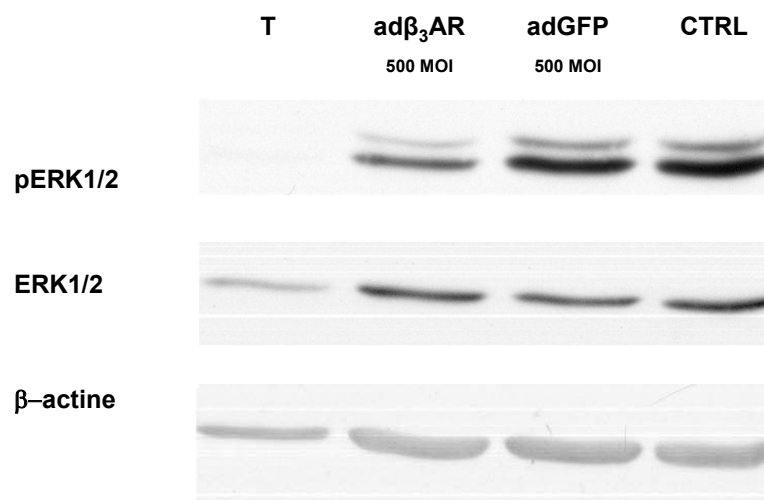


Figure 61 : Immuno-empreinte mettant en évidence les formes phosphorylées de ERK1/2 dans les HUVEC. Dans les conditions Ad β_3 -AR, Ad-GFP et CTRL (cellules non infectées,) on constate une phosphorylation nette de ces 2 protéines. En revanche, dans les extraits protéiques des cellules sevrées en sérum pendant 2 H (T) on ne retrouve pas de signal.

Dans le cas des HMVEC-D, un niveau comparable de phosphorylation de ERK1/2 est obtenu dans toutes les conditions expérimentales.

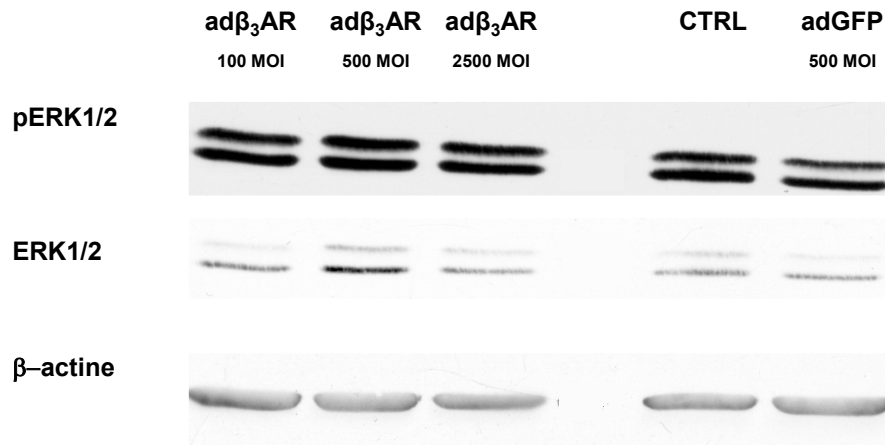


Figure 62 : Immuno-empreinte mettant en évidence les formes phosphorylées de ERK1/2 dans les HMVEC-D infectées (Ad β_3 AR à des MOI croissantes de 100-500-2500 MOI ou par 500 MOI AdGFP) ou non (CTRL). La charge protéique est équivalente dans tous les échantillons comme l'atteste l'immuno-empreinte de β -actine.

5. Importance physiopathologique du récepteur β_3 -AR dans les phénomènes d'ischémie *in vivo*

Le modèle d'ischémie du membre postérieur de souris nous a permis de constater l'importance du récepteur β_3 -AR dans les phénomènes de néoangiogenèse. En effet, lors du suivi sur 3 semaines du flux sanguin cutané après ligature-résection artérielle fémorale, nous avons constaté un retard de récupération de perfusion chez les souris β_3 -KO par rapport aux animaux contrôles, les souris FVB (Figure 63 et Figure 64). Le rapport du flux sanguin cutané du membre ischémique par rapport au membre sain (ratio de perfusion) est significativement plus bas au 7^{ème} et au 14^{ème} jour, chez les animaux déficients en récepteur β_3 -AR ($0,66 \pm 0,02$, $n = 6$ et $0,72 \pm 0,04$, $n = 4$) comparativement aux ratio de perfusion chez les souris FVB aux mêmes dates ($0,87 \pm 0,04$, $n = 6$ et $0,86 \pm 0,03$, $n = 6$). Au 21^{ème} jour, il n'existe plus de différence significative entre les 2 groupes d'animaux.

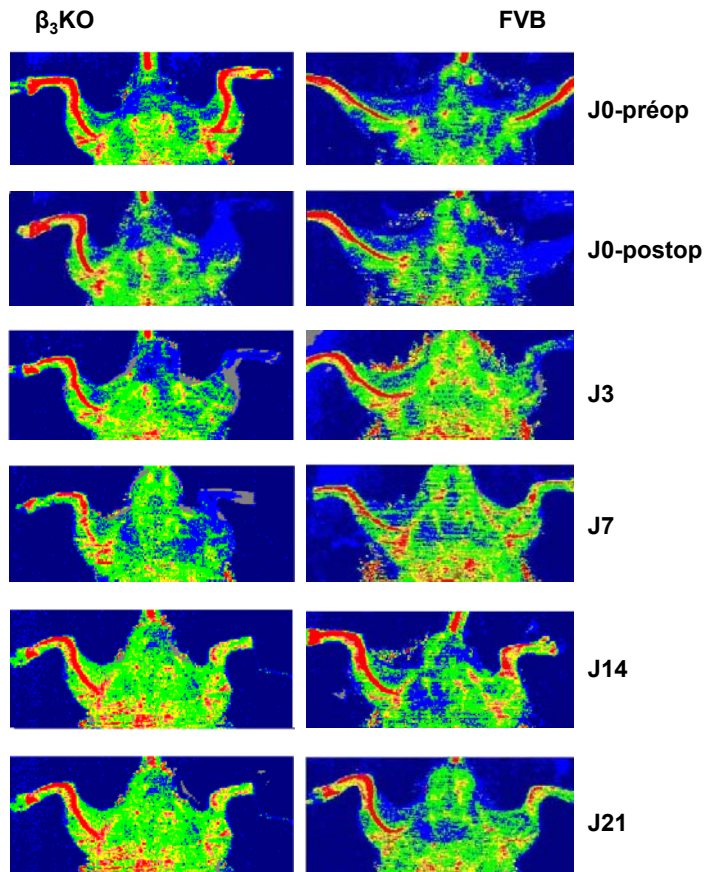


Figure 63 : Evaluation du flux sanguin cutané par mesure de vélocimétrie laser doppler en préopératoire (J0-préop), postopératoire (J0-postop) et aux 3^{ème} (J3), 7^{ème} (J7), 14^{ème} (J14) et 21^{ème} (J21) jours postopératoires, après ligature-résection de l'artère fémorale droite chez les souris β_3 KO et FVB. Dans une échelle de couleur allant du bleu (absence de flux sanguin) au rouge (flux sanguin maximal), la perfusion cutanée au niveau des 2 membres postérieurs des animaux est représentée. Un retard de récupération chez les animaux β_3 -KO est observé, avec une différence dans les flux sanguins aux 7^{ème} et 14^{ème} jours.

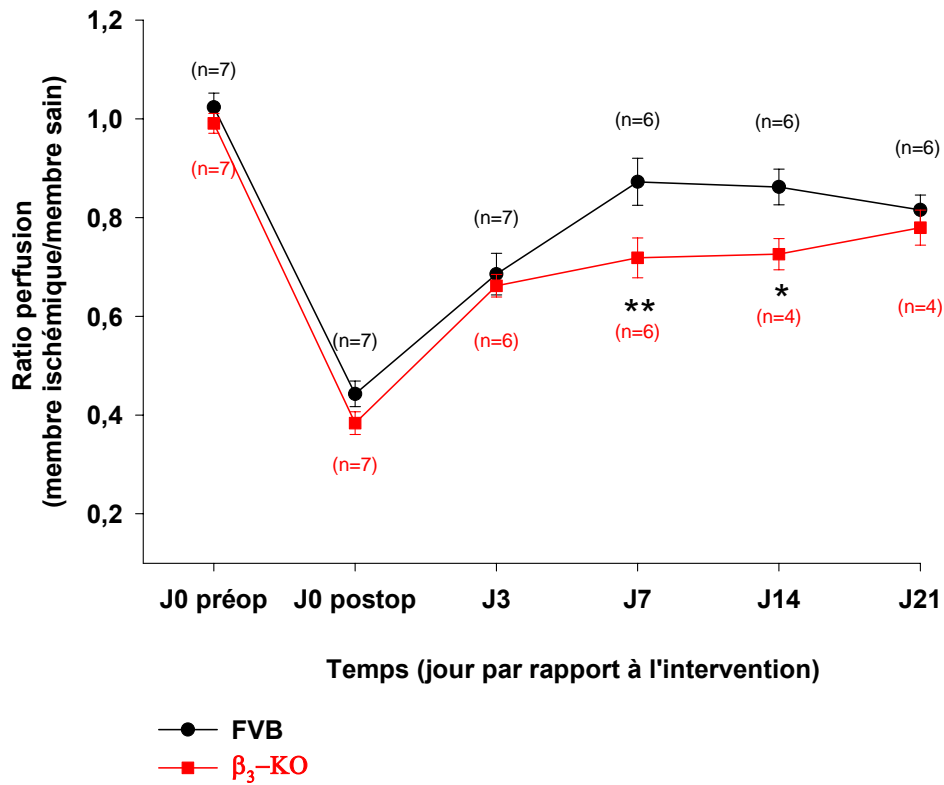


Figure 64: Courbe du ratio de perfusion en préopératoire (J0-préop), postopératoire (J0-postop) et aux 3^{ème} (J3), 7^{ème} (J7), 14^{ème} (J14) et 21^{ème} (J21) jours postopératoires, après ligature-résection de l'artère fémorale droite chez les souris β_3 -KO et FVB. Le nombre d'animaux par condition est rapporté entre parenthèses. * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus le ratio de perfusion des souris FVB.

D. Discussion

Dans ce travail, nous sommes parvenus à surexprimer le récepteur β_3 -AR humain, grâce à un vecteur adénoviral, dans des cellules endothéliales humaines et à révéler son rôle potentiel au cours de l'angiogénèse. La surexpression de ce récepteur, après infection avec l'Ad β_3 AR dans ces cellules endothéliales, entraîne une augmentation de la formation de structures tubulaires qui peuvent s'organiser en réseau au sein d'une matrice extracellulaire. La comparaison avec des cellules non infectées ou des cellules infectées avec l'AdGFP, véritable adénovirus contrôle, puisque ayant les mêmes caractéristiques que l'Ad β_3 AR en dehors de l'ADNc du récepteur, a permis de tenir compte d'effets non spécifiques de l'infection et des techniques de mise en culture dans les gels de GFR-Matrigel® ou de collagène. De plus, l'effet de la stimulation *ex vivo*, par un agoniste préférentiel β_3 -AR, des récepteurs endogènes sur la réponse angiogénique indique l'intérêt de l'activation d'une telle voie au cours des phénomènes ischémiques. Ce dernier point est d'ailleurs confirmé *in vivo* par le retard de néo-angiogénèse post-ischémique dans un modèle de ligature-résection de l'artère fémorale, chez les animaux transgéniques déficients en récepteur β_3 -AR par rapport à la souche d'origine. Les tests d'angiogénèse *in vitro* en présence de différents inhibiteurs et la mise en évidence de la phosphorylation de protéines clefs dans la transduction du signal par immuno-empreinte, nous ont permis de préciser l'implication de certaines voies de signalisations. Les voies du NO et de la PI3-Kinase/Akt-PKB jouent un rôle majeur dans la réponse angiogénique secondaire à la surexpression du récepteur β_3 -AR. En revanche, la voie ERK1/2 semble être activée dans toutes les conditions étudiées, mais paradoxalement son inhibition semble potentialiser la réponse pro-angiogénique à la surexpression du récepteur β_3 -AR.

En plus de l'activation induite par un ligand, un certain nombre de récepteurs couplés aux protéines G présentent une activité constitutive. Une activité constitutive se définit comme une activité spontanée, indépendante de la fixation d'un ligand qui conduit à une production de seconds messagers. On note qu'environ 40 % des récepteurs couplés aux protéines G humains testés présentent une activité basale (Seifert et Wenzel-Seifert, 2002). Plusieurs études ont révélé que les récepteur β_1 -ARs (Engelhardt et coll., 2001) et les récepteurs β_2 -ARs (Zhang et coll., 2000) présentent également cette propriété. Cette activité peut être importante même *in vivo*, notamment pour les récepteurs β_2 -ARs myocardiques (Varma et coll., 1999). La partie C-terminale et la 3^{ème} boucle intracellulaire des récepteurs

β_2 -ARs sont des régions impliquées dans la réponse constitutive du récepteur (Chakir et coll., 2003). De plus, la surexpression d'un récepteur, permet la constitution d'oligomères, soit entre les récepteurs surexprimés (homo-oligomérisation), soit avec d'autres récepteurs (hétéro-oligomérisation). Ces phénomènes peuvent avoir des effets sur l'activation du récepteur, sa désensibilisation et la transduction du signal (Breitwieser, 2004). L'ensemble de ces données, permet d'expliquer les effets observés lors de la surexpression du récepteur β_3 -AR humain sur la physiologie des cellules endothéliales, en l'absence d'agoniste.

Le NO est connu comme étant un des seconds messagers impliqués dans la transduction du signal β_3 -AR au niveau des cellules endothéliales. En effet, dans les études évaluant le rôle potentiel de ce récepteur sur la vasomotricité, il a été démontré que l'inhibition des NO synthases et l'abrasion de l'endothélium sont responsables d'une diminution, voir de l'abolition de l'effet vasodilatateur des agonistes β_3 -ARs dans différents lits vasculaires (Trochu et coll., 1999 ; Dessy et coll., 2004 ; Rozec et coll., 2005). De plus, le NO est fortement impliqué dans les phénomènes d'angiogenèse (Cooke, 2003). Dans notre étude, l'utilisation d'un inhibiteur des NO synthases, le L-NAME, diminue de manière significative la réponse pro-angiogénique observée lors de la surexpression du récepteur β_3 -AR humain. Le L-NAME inhibe de façon non spécifique les NO synthases. Dans les HUVEC, outre la NO synthase endothéliale il a été évoqué la présence potentielle de la NO synthase neuronale (Bachetti et coll., 2004). Il ne semble pas que la forme inductible de NO synthase soit détectable dans ce type cellulaire même en présence de molécules pro-inflammatoires (Bachetti et coll., 2004). De même, de façon préliminaire, nous n'avons pas trouvé par PCR en temps réel de différence de niveau d'expression de l'ARNm de la NO synthase inductible, dans des HUVEC infectées ou non par les 2 adénovirus (données non présentées). Dans les cardiomyocytes humains, il a été démontré que la stimulation β_3 -AR active la NO synthase endothéliale par le biais d'une protéine $G_{i/0}$ (Gauthier et coll., 1998). La régulation de l'activation de la NO synthase endothéliale semble varier avec la localisation du récepteur (atrial ou ventriculaire) et dépend de la translocation-interaction de l'enzyme avec le complexe calcium-calmoduline et/ou de phosphorylations-déphosphorylations (Brixius et coll., 2004). La stimulation β_3 -AR est responsable d'une vasodilatation endothélium-dépendante induite par la production de NO, mais indépendante de l'activation des protéines $G_{i/0}$ dans l'aorte thoracique de rat (Rautureau et coll., 2002). Dans les cellules endothéliales bovines (BAEC), Dessy et coll ont révélé qu'un antagoniste β_1 -AR pourvu de propriétés agonistes β_3 -ARs, le nébivolol, est responsable d'une activation de la NO synthase

endothéliale (Dessy et coll., 2005). Ces auteurs, dans le même travail, montrent qu'il n'y a pas de phosphorylation de la NO synthase endothéliale sur le résidu sérine 1177 (Ser¹¹⁷⁷) mais une déphosphorylation d'un résidu thréonine (Thr⁴⁹⁵) après traitement par nébivolol des BAEC. L'état de phosphorylation de ses deux sites de la NO synthase endothéliale constitue un mécanisme de régulation de l'enzyme. En effet, la phosphorylation de la Ser¹¹⁷⁷ (Dimmeler et coll., 1999b) et la déphosphorylation de la Thr⁴⁹⁵ (Fleming et coll., 2001) augmentent l'activité de la NO synthase endothéliale. Nous n'avons pas mis en évidence, dans nos conditions expérimentales, de phosphorylation de la NO synthase endothéliale sur la Ser¹¹⁷⁷ dans les cellules endothéliales surexprimant le récepteur β_3 -AR humain. La durée des expériences et les modalités de culture (matrice extracellulaire utilisée, conformation des cellules en sphéroïdes) peuvent expliquer ce résultat. Il reste donc dans nos modèles à préciser les modes de régulation de la NO synthase endothéliale.

L'activation de la voie PI3-kinase/Akt apparaît comme un élément essentiel dans la réponse angiogénique que nous avons observée lors de la surexpression du récepteur β_3 -AR humain. Ce résultat est conforté d'une part par l'effet d'un inhibiteur spécifique de cette voie, le Ly 294002, et d'autre part par la mise en évidence de la phosphorylation d'Akt lors de l'infection des cellules endothéliales par Ad β_3 AR. L'activation de cette voie est classiquement décrite dans les différentes étapes de l'angiogenèse. Elle est particulièrement importante dans les phénomènes de survie cellulaire mais aussi de prolifération et de différenciation ainsi que de morphogenèse (pour revue, voir Munoz-Chapuli et coll., 2004). L'activation d'Akt est notamment responsable de la stimulation par phosphorylation sur Ser¹¹⁷⁷ de la NO synthase endothéliale d'une façon dépendante de HSP90 (Heat Shock Protein 90) (Brouet et coll., 2001). Par ailleurs, Akt peut être responsable de l'activation de NF κ B, un promoteur de protéines anti-apoptotiques, mais également de la survivine, une protéine agissant sur le cycle cellulaire (Munoz-Chapuli et coll., 2004). L'activation de la voie de la PI3-kinase/Akt par la stimulation β_3 -AR a déjà été suggérée dans des cellules endothéliales choroïdiennes humaines (Steinle et coll., 2003).

Dans notre travail, l'inhibition de la voie ERK1/2 induit une augmentation de la réponse angiogénique des cellules endothéliales infectées par l'adénovirus Ad β_3 AR. Cette réponse semble paradoxale par rapport aux données de la littérature, où l'inhibition de cette voie de signalisation est traditionnellement associée avec une diminution de la réponse angiogénique en réponse à différents stimuli (Munoz-Chapuli et coll., 2004). De plus, il semble que dans nos expériences, la séquence de sevrage-réintroduction du sérum induise une

activation non spécifique de la voie ERK1/2 qui ne semble pas être modulée ni par l'infection par un adénovirus, ni par la surexpression du récepteur β_3 -AR humain. Néanmoins, il a été décrit un effet à la fois pro et anti-apoptotique de cette voie en particulier au niveau endothélial (Cuda et coll., 2002). Dans ce travail, les auteurs soulignent notamment que ERK1/2 peuvent entraîner une production délétère de radicaux libres par augmentation de l'activité de la NADPH-oxydase. De plus, une étude rapporte que l'inhibition de la formation d'un réseau de tubes endothéliaux sur Matrigel par un dérivé de la saponine, est liée à l'activation de la voie de ERK1/2 (Barthomeuf et coll., 2004). Dans les 2 cas, l'utilisation de l'inhibiteur spécifique de MEK1, le PD 98059, est à l'origine d'une augmentation de la survie cellulaire.

Dans les microcoronaires humaines, la vasorelaxation endothélium-dépendante induite par la stimulation β_3 -AR est secondaire à la production de NO mais implique également l'EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor) (Dessy et coll., 2004). La nature exacte de l'EDHF n'est pas parfaitement connue, mais de nombreuses études citent les acides époxyeicosatriéoniques (EET), comme des candidats potentiels (pour revue, voir Féléto et Vanhoutte, 2006). Ces produits sont issus du métabolisme de l'acide arachidonique par des cytochromes P450-époxygénases. Parmi les propriétés des EET, il est de plus en plus souvent fait état de leur action au cours de l'angiogenèse (pour revue voir Michaelis et Fleming, 2005). Ils seraient impliqués dans les phénomènes de dégradation de la matrice extracellulaire, de migration cellulaire ainsi que dans le recrutement de différents types cellulaires au cours de l'angiogenèse. Dans le cadre de nos travaux, il persiste une réponse angiogénique en présence d'inhibiteur des NO synthases dans les HUVEC surexprimant le récepteur β_3 -AR humain. Cette angiogenèse résiduelle pourrait donc être liée à l'activation de la voie de l'EDHF et la production d'EET par les HUVEC.

Le rôle des récepteurs β -ARs dans l'angiogenèse est peu connu. Il est rapporté que la stimulation des récepteurs β -ARs est responsable de la sécrétion de médiateurs de l'angiogenèse par différents types cellulaires. Dans le tissu adipeux de rat, la sécrétion de VEGF est augmentée sous l'effet d'agonistes β_3 -ARs (Fredriksson et coll., 2000). Chez l'homme, les agonistes β_2 -ARs sont susceptibles de stimuler la synthèse de facteurs pro-angiogéniques pouvant expliquer certains effets délétères de l'administration prolongée de ces produits sur les voies aériennes (Verhoeckx et coll., 2006). De même, un travail récent souligne l'effet pro-angiogénique sur des tumeurs ovariennes murines de la stimulation β_2 -AR (Thaker et coll., 2006). Très peu de travaux se sont intéressés aux effets de la stimulation des récepteurs β -ARs endothéliaux sur les phénomènes d'angiogenèse. Dans un travail utilisant

un vecteur adénoviral, Iaccarino et coll., ont révélé que la surexpression endothéliale du récepteur β_2 -AR augmente de manière significative la néoangiogenèse dans un modèle d'ischémie du membre postérieur chez le rat (Iaccarino et coll., 2005). Les auteurs décrivent une augmentation de la prolifération cellulaire et démontrent par ailleurs que les récepteurs β_2 -AR exercent un effet à la fois pro et anti-apoptotique respectivement par l'activation de la p38 MAPK et de la voie PI3-kinase/Akt. Concernant les récepteurs β_3 -ARs, il existe dans la littérature quelques éléments suggérant que leur activation pourrait être à l'origine d'effet pro-angiogénique. Ainsi, Dessy et coll. ont établi dans un modèle d'angiogenèse *ex vivo*, que le nébivolol exerce des effets pro-angiogéniques par le biais des récepteurs β_3 -ARs et de la NO synthase endothéliale (Dessy et coll., 2005). Dans un type très particulier de cellules endothéliales, des cellules choroïdiennes, Steinle et coll., ont montré que le BRL 37344, un agoniste β_3 -AR, favorise l'invasion, l'élongation et dans une moindre mesure la prolifération de ces cellules (Steinle et coll., 2005). Ils mettent également en évidence l'absence d'effet sur la formation de tube de l'inhibition de la phosphorylation ERK1/2 par le PD 98059. Ce composé semble même potentialiser l'effet du BRL 37344, ce qui va dans le sens de nos résultats.

L'absence de récepteur β_3 -AR ne compromet pas totalement la récupération de flux sanguin cutané chez les souris β_3 KO. Néanmoins, nous retrouvons un retard significatif par rapport aux souris FVB contrôles. Dans un modèle murin de diabète de type II, une équipe suggère que l'amélioration de cicatrisation cutanée observée chez les animaux traités par administration d'un agoniste β_3 -AR préférentiel, le SR 58611A, pourrait être due à des effets sur la microcirculation cutanée et l'angiogenèse (Schaeffer et coll., 2005).

Une des caractéristiques du récepteur β_3 -AR est de ne pas posséder les sites de phosphorylation par la PKA et la β -ARK, ce qui lui confère une résistance aux phénomènes de désensibilisation par rapport aux autres sous-types de récepteurs β -ARs (Liggett et coll., 1993). De plus, ce récepteur présente une faible affinité pour les catécholamines endogènes (Emorine et coll., 1994). Ces propriétés expliquent l'importance toute particulière que peut prendre le récepteur β_3 -AR au cours des pathologies associées à une augmentation du tonus sympathique (hypertension, insuffisance cardiaque, ischémie). Nos résultats montrent un effet pro-angiogénique du récepteur β_3 -AR et permettent d'envisager de nouveaux rôles de ce récepteur dans ces pathologies. Ils ouvrent également de nouvelles perspectives thérapeutiques aux produits ayant des propriétés agonistes β_3 -ARs, comme le nébivolol, en particulier dans les phénomènes ischémiques (artériopathie des membres inférieurs, cardiopathie ischémiques) mais également le diabète. Dans un avenir proche, il conviendra de

préciser dans quelle mesure, les effets pro-angiogéniques du récepteur β_3 -AR persistent notamment en présence de la dysfonction endothéliale associée à ces tableaux.

IV. Modification de la réponse β -adrénergique vasculaire au cours du choc endotoxémique chez le rat

A. Introduction

Le sepsis est associé à un taux très élevé de mortalité et demeure un véritable « challenge » thérapeutique en dépit des progrès récents de la réanimation (Annane et coll., 2005). Un des aspects fondamentaux du sepsis est l'existence d'une dysfonction cardiovasculaire, responsable d'une instabilité hémodynamique et d'un état de choc conduisant à son stade ultime à une défaillance multiviscérale (Bone et coll., 1992).

La défaillance vasculaire survenant au cours du choc septique, est liée d'une part à une altération de la contraction des cellules musculaires lisses (Landry et Oliver, 2001), mais également à une dysfonction endothéliale (Vallet, 2002). La perte des capacités contractiles des cellules musculaires lisses vasculaires est notamment due à l'augmentation de la synthèse de NO. En effet, différentes cytokines synthétisés lors du choc septique, et notamment le TNF- α , vont entraîner l'expression de la NO synthase inductible dans ces cellules (Titheradge, 1999). La production excessive de NO qui en résulte, va contribuer à la vasodilatation et rendre réfractaires les cellules musculaires lisses à l'action de vasoconstricteurs endogènes ou exogènes (Gunnnett et coll., 1998). Il est établi que les effets vasculaires des catécholamines, la vasopressine et l'angiotensine II, sont complètement abolis au cours du choc endotoxémique chez le rat (Schaller et coll., 1985). Par ailleurs, au cours du sepsis, des anomalies morphologiques et fonctionnelles des cellules endothéliales apparaissent. Effectivement, une perte de 20 à 35 % des cellules endothéliales à la surface intimale des vaisseaux est observée (Reidy et Bowyer, 1977; Leclerc et coll., 2000). Des fonctions essentielles de l'endothélium sont fortement altérées : la régulation de la vasomotricité (avec la perte de la vasorelaxation endothélium-dépendante), la perméabilité vasculaire (qui est augmentée), le contrôle de la coagulation (avec l'activation de la cascade de la coagulation responsable d'une coagulation intravasculaire disséminée) (Dauphinee et Karsan, 2006). L'association dysfonction musculaire lisse-dysfonction endothéliale au niveau de la microcirculation à des degrés variables suivant les lits vasculaires considérés, va être à l'origine d'une perturbation profonde des débits sanguins et donc de l'apport d'oxygène dans différents organes. Pour beaucoup d'auteurs, cette dysfonction microvasculaire joue un rôle central dans le choc septique et sa sévérité (Ince, 2005).

Parallèlement à cette atteinte vasculaire, de façon quasi constante lors du choc septique une dysfonction cardiaque est constatée. Différents mécanismes sont évoqués pour expliquer la dépression myocardique du sepsis. Parmi ceux-ci, de fortes perturbations du système β -AR sont mises en évidence. Certaines études décrivent une diminution du nombre de récepteurs β -ARs (Bernardin et coll., 1998) alors que d'autres suggèrent des anomalies de couplage des récepteurs β -ARs (Reithmann et coll., 1993).

Pour améliorer la perfusion des différents organes, l'utilisation d'agents vasopresseurs est classiquement recommandée en particulier certaines catécholamines comme la noradrénaline (Annane et coll., 2005). Néanmoins, cette utilisation doit être prudente en raison du risque de vasoconstriction excessive dans certains lits vasculaires, pouvant aggraver les dysfonctions d'organes (Ince, 2005). De même, en cas de dépression myocardique patente, des agents inotropes sont utilisés et en particulier les catécholamines (adrénaline, dobutamine). Il faut souligner que la plupart de ces agents vasopresseurs ou inotropes ne sont pas sélectifs d'un sous-type donné de récepteurs β -ARs.

La mise en évidence par Emorine et coll., d'un troisième sous type de récepteur β -AR chez l'homme a permis d'expliquer un certain nombre d'effets atypiques des catécholamines (Emorine et coll., 1989). Chez l'homme, au niveau cardiaque, la stimulation β_3 -AR est responsable d'un effet inotrope négatif dépendant de la voie du NO (Gauthier et coll., 1996; Gauthier et coll., 1998). Par ailleurs, le récepteur β_3 -AR est présent dans de nombreux lits vasculaires humains, et sa localisation est endothéliale. Ce récepteur est présent au niveau de l'endothélium de l'aorte thoracique de rat, où sa stimulation induit une vasodilatation NO-dépendante (pour revue, voire Rozec et Gauthier, 2006). De plus, les récepteur β_3 -ARs présentent des propriétés originales, comme la résistance au phénomène de désensibilisation, et sa faible affinité aux agonistes et antagonistes conventionnelles.

Il n'existe pas dans la littérature d'étude consacrée à la modification de la réponse β -AR vasculaire au cours du choc septique, tenant compte des différents sous-types de récepteurs. Nous avons voulu, dans un modèle de rat endotoxémique, et par une approche pharmacologique *in vitro*, évaluer à un stade précoce (correspondant chez l'homme à un stade précédent toute intervention thérapeutique, et notamment le remplissage vasculaire) les modifications des réponses β -ARs.

B. Résultats

1. Etude hémodynamique

Afin de confirmer l'apparition d'un état de choc après l'injection d'endotoxine intraveineuse (5mg/kg dans 1 ml), nous avons mesuré la fréquence cardiaque (FC) et la pression artérielle moyenne (PAM) durant 3 H chez des rats anesthésiés (anesthésie inhalée par isoflurane 2% en oxygène pur, les animaux sont laissés en ventilation spontanée) (Figure 65 et Figure 66).

La FC augmente graduellement chez les animaux ayant reçu l'endotoxine (groupe LPS) (Figure). Cette accélération de la FC devient significative 60 min. après le début de l'expérience pour atteindre un plateau à 90 min. La FC des animaux LPS est alors 30% supérieure environ à celle des animaux contrôles (CTRL). La tachycardie est présente jusqu'à la fin de l'expérience, même s'il apparaît une diminution progressive de la FC au cours des 30 dernières min..

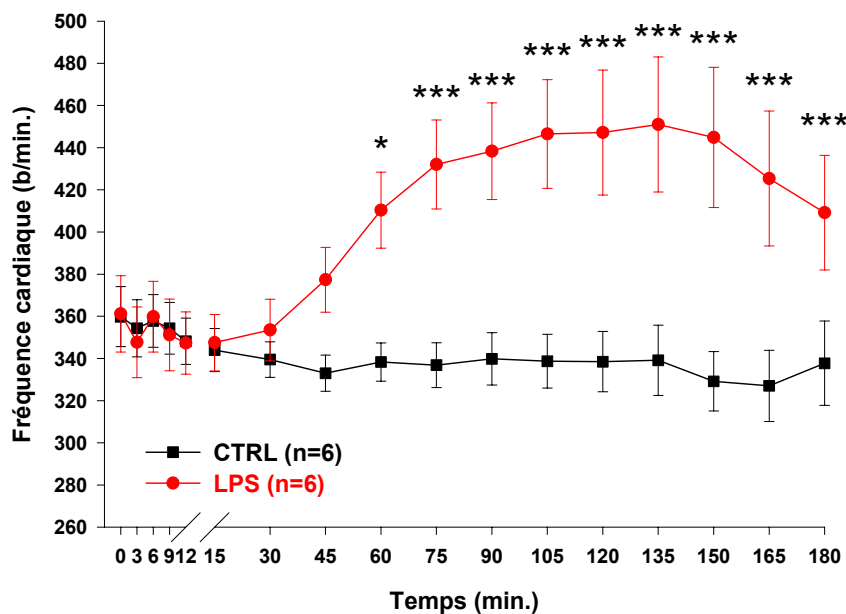


Figure 65 : Fréquence cardiaque (nombre de battements par minute b/min.) chez les rats (LPS) ayant reçu 5mg/kg IV d'endotoxine et les animaux contrôles (CTRL). L'injection est réalisée au temps 0 min., les mesures sont réalisées sur 180 min., toutes les 3 min. pendant les 15 premières min. puis toutes les 15 min. sur la période restante. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$ versus CTRL.

A la 3^{ème} min. après l'injection, une baisse transitoire, mais significative de la PAM chez les rats LPS par rapport aux animaux CTRL est constatée. La PAM du groupe LPS se normalise ensuite en 30 min., pour devenir équivalente à celle du groupe CTRL jusqu'à 1 H de mesures. Par la suite, la PAM diminue progressivement chez les animaux LPS, cette baisse devenant significative 2 H 30 après l'endotoxémie. Cette diminution est maximale lors des 2 dernières mesures et est de 30% par rapport aux rats CTRL.

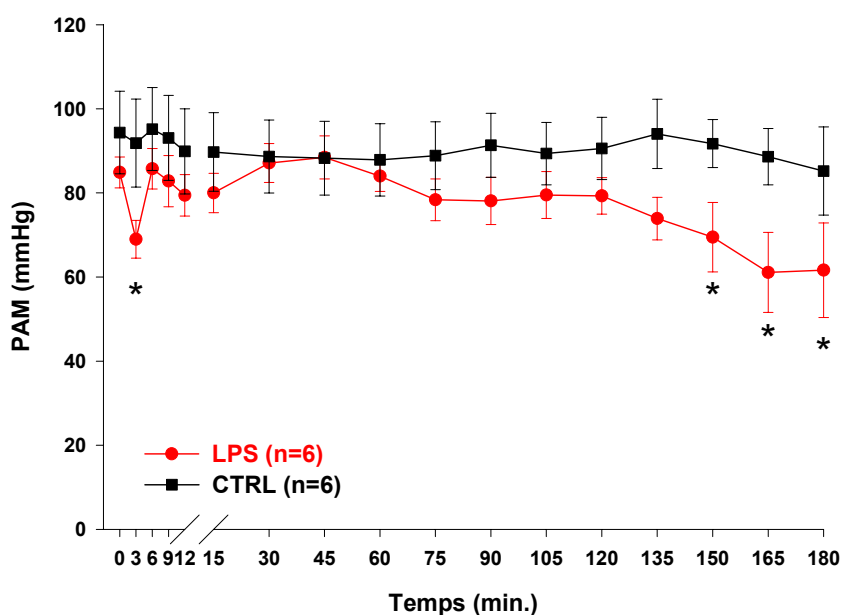


Figure 66 : pression artérielle moyenne (PAM) en mm de mercure (mmHg) chez les rats (LPS) ayant reçu 5mg/kg IV d'endotoxine et les animaux contrôles (CTRL). L'injection est réalisée au temps 0 minute, les mesures sont réalisées sur 180 min., toutes les 3 min. pendant les 15 premières min. puis toutes les 15 min. sur la période restante. * : $p < 0,05$ versus CTRL.

Ces mesures hémodynamiques simples après l'injection d'endotoxine, nous ont permis de valider notre délai de 3 H avant le sacrifice des animaux. En effet, l'association d'une hypotension et d'une tachycardie qui correspond à la définition de l'état de choc, est obtenue dans ce délai chez les rats endotoxémiques non réanimés.

2. Etude pharmacologique

Les aortes sont prélevées 3 H après l'administration IV de 5 mg/kg d'endotoxine (groupe LPS) ou un volume équivalent de sérum physiologique (groupe CTRL). Afin d'évaluer les modifications de la réponse contractile vasculaire au cours du choc endotoxémique, des courbes concentration-réponse de plusieurs agonistes sont réalisées sur des anneaux d'aortes des rats CTRL et LPS.

Tous les protocoles de cette étude ont été réalisés sur des anneaux d'aorte pour lesquels la présence d'un endothélium intact a été préalablement contrôlée par l'obtention d'une relaxation en réponse à l'acétylcholine, supérieure à 50% de la contraction obtenue en présence de phényléphrine.

(a) Contraction vasculaire en réponse à la phényléphrine

Il existe une forte altération de la contractilité à la phényléphrine (agoniste α_1 -AR) chez les rats LPS (Figure 67). Comme en atteste la diminution de l'efficacité ($E_{\max} = 1,53 \pm 0,26$ g soit $E_{\max} = 22,81 \pm 3,93$ % de la contraction maximale obtenue à $10 \mu\text{M}$ de phényléphrine chez les rats CTRL). De même, la puissance de la phényléphrine est plus faible sur les anneaux d'aorte thoracique des rats LPS ($pD_2 = 6,59 \pm 0,14$, $n = 11$) que sur les rats CTRL ($pD_2 = 7,32 \pm 0,13$, $n = 11$, $p < 0,001$).

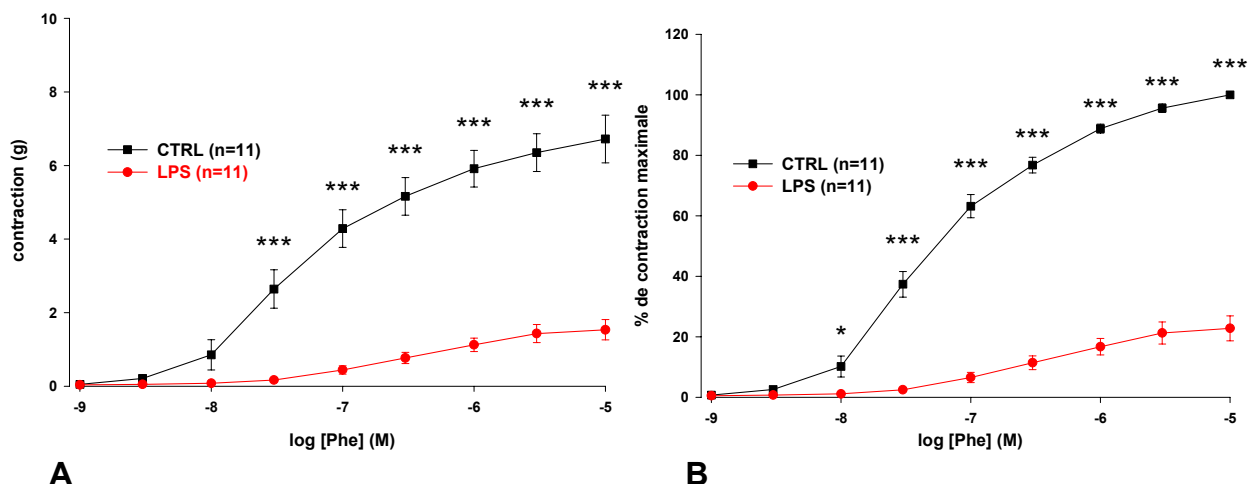


Figure 67 : Courbes concentration-réponse à la phényléphrine (Phe) sur des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS. A : contraction exprimée en g ; B : contraction exprimée en pourcentage de la contraction maximale obtenue chez les rats CTRL. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$ versus CTRL.

(b) Réponses aux agents relaxants

Pour la réalisation des courbes concentration-relaxation, la concentration de phényléphrine utilisée pour la précontraction des anneaux d'aorte de rat est adaptée de façon à obtenir une contraction correspondant à 80 % de la contraction maximale. Les anneaux d'aorte thoracique des rats endotoxémiques présentent une relaxation spontanée au cours du temps. Nous avons soustrait à l'occasion de chaque mesure la relaxation spontanée d'anneaux montés en parallèle dans les cuves à organe isolé.

Effets temps	Protocoles courts	Protocoles longs
LPS	28,67 ± 2,34 % (n = 24)	37,38 ± 3, % (n = 16)
CTRL	-2,54 ± 1,21 % (n = 19)	0,48 ± 1,72 % (n = 19)

Tableau 23 : Relaxation spontanée au cours du temps (effets temps) exprimée en pourcentage de la contraction maximale sous phényléphrine, selon qu'il s'agisse respectivement d'un protocole avec un agent relaxant à action rapide (protocoles courts) (acétylcholine, isoprénaline, nitroprussiate de sodium, salbutamol, dobutamine) ou d'un protocole avec un agent relaxant à action lente (protocoles longs) (SR 58611A, isoprénaline après prétraitement par le nadolol).

▪ Réponse à l'acétylcholine

Afin d'évaluer la fonction endothéliale des aortes utilisées dans cette étude, des courbes concentration-réponse à l'acétylcholine ont été réalisées (Figure 68). Il existe une diminution de l'efficacité de l'acétylcholine sur les anneaux d'aorte thoracique de rat LPS ($E_{\max} = 69,32 \pm 5,76 \%$, $n = 6$, en présence de $30 \mu\text{M}$ d'acétylcholine) par rapport aux anneaux aortiques de rat CTRL ($E_{\max} = 91,37 \pm 2,28 \%$, $n = 8$, en présence de $30 \mu\text{M}$ d'acétylcholine). La puissance de l'acétylcholine n'est pas significativement modifiée ($pD_2 = 6,97 \pm 0,14$ pour les rats CTRL vs $7,12 \pm 0,06$ pour les rats endotoxémiques).

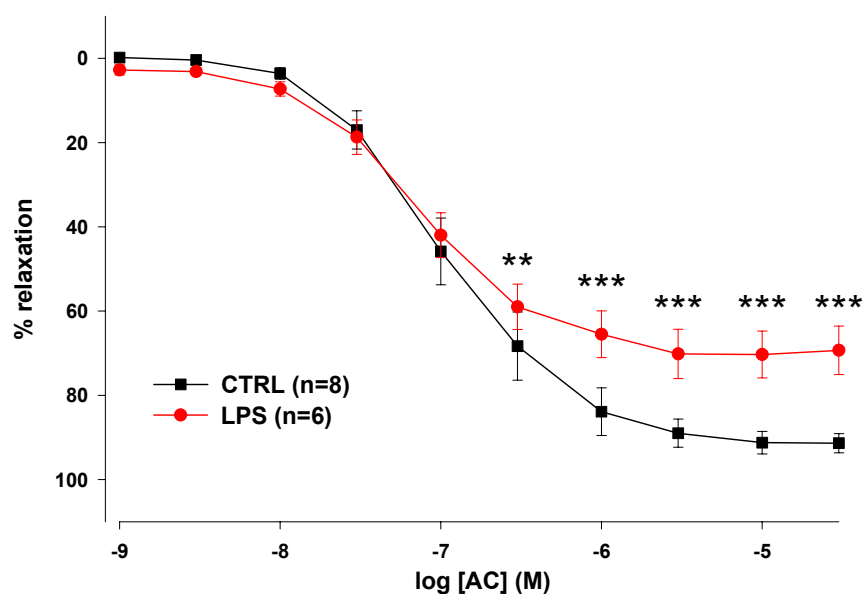


Figure 68 : Courbes concentration-réponse à l'acétylcholine (AC) des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe. **: $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ versus CTRL.

▪ Réponse au nitroprussiate de sodium (SNP)

Le SNP induit une relaxation endothélium-indépendante dans l'aorte thoracique de rat (Adeagbo et Triggle, 1991). Il permet d'estimer l'intégrité fonctionnelle des effecteurs de la voie du NO. La vasodilatation maximale obtenue en présence de 30 μM de SNP chez les rats endotoxémiques est réduite de plus de 30% ($E_{\text{max}} = 62,48 \pm 8,55 \%$, $n = 6$) comparée aux rats CTRL ($E_{\text{max}} = 92,88 \pm 5,93 \%$, $n = 9$). En revanche, il n'y a pas de modification significative de la puissance du SNP entre les 2 groupes ($7,77 \pm 0,11$ et $7,63 \pm 0,03$ respectivement pour les groupes LPS et CTRL) (Figure 69).

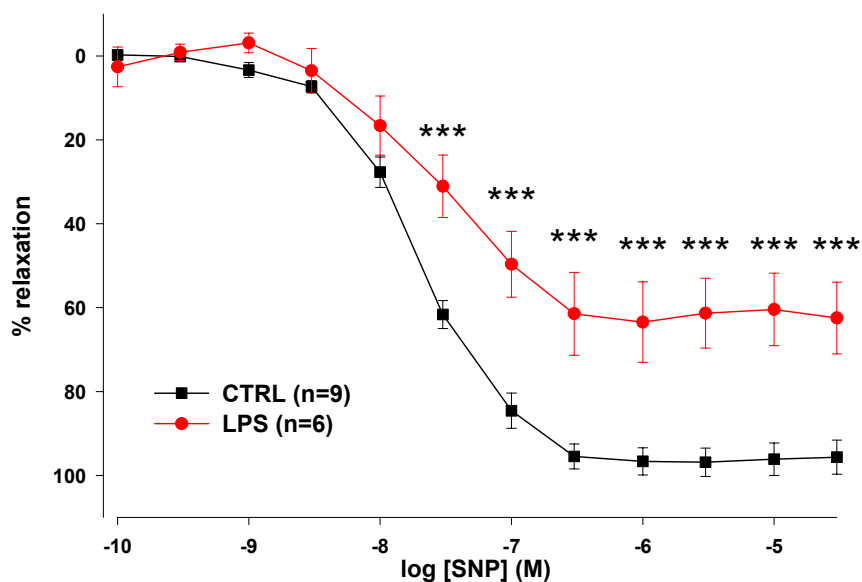


Figure 69: Courbes concentration-réponse au nitroprussiate de sodium (SNP) des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe. *** : $p < 0,001$ versus CTRL.

(c) Réponse aux agonistes β -ARs

▪ Réponse à l'isoprénaline

Des courbes concentration-relaxation à l'isoprénaline (agoniste β -AR non sélectif) ont été construites sur des anneaux d'aorte de rats LPS et CTRL précontractés à la phényléphrine en l'absence ou en présence d'un antagoniste des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs, le nadolol. Ces protocoles nous permettent d'évaluer respectivement la réponse β -AR globale et la réponse persistante après blocage des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs.

Une diminution de l'efficacité de la vasodilatation induite par 30 μ M d'isoprénaline sur les anneaux aortiques des rats LPS ($E_{\max} = 61,28 \pm 2,55$ %, $n = 6$) par rapport aux rats CTRL ($E_{\max} = 86,75 \pm 2,38$ %, $n = 6$) est observée (Figure 70). Il n'y a cependant pas de différence significative de puissance de l'isoprénaline entre les 2 groupes ($6,68 \pm 0,11$ pour les rats CTRL et $7,03 \pm 0,33$ pour les rats LPS).

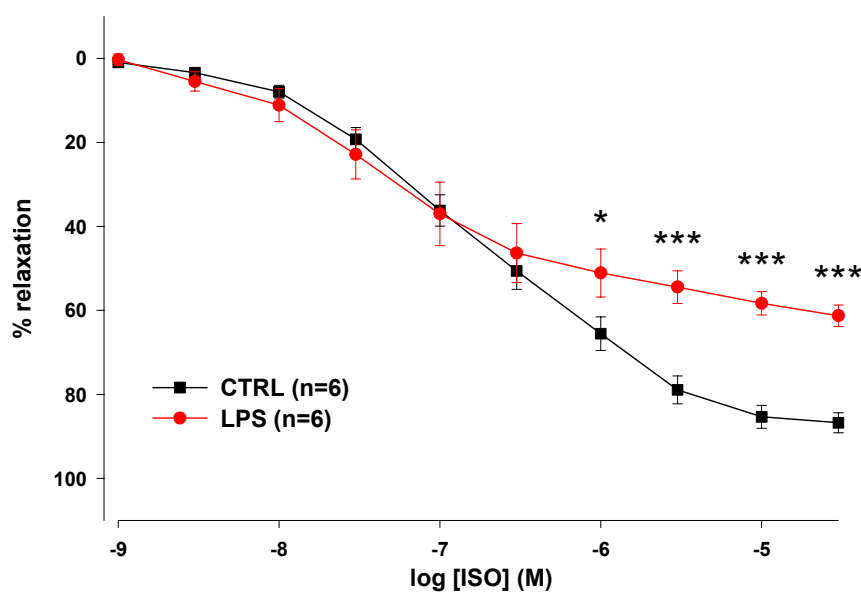


Figure 70 : Courbes concentration-réponse à l'isoprénaline (ISO) des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$ versus CTRL.

Chez les rats CTRL, en présence de 10 μM de nadolol (antagoniste β_1 - et β_2 -AR), l'application de concentrations croissantes d'isoprénaline produit toujours une vasodilatation des anneaux d'aorte thoracique de rat, mais avec une efficacité moindre et une puissance diminuée (Figure 71). De plus, la vasodilatation induite est de cinétique lente. Cette vasodilatation est altérée chez les rats endotoxémiques ($E_{\text{max}} = 51,82 \pm 4,4 \%$, $n = 9$, avec 30 μM d'isoprénaline) par rapport aux rats CTRL ($E_{\text{max}} = 77,39 \pm 6,7 \%$, $n = 11$, avec 30 μM d'isoprénaline). La puissance de l'agoniste β -AR dans ces conditions n'est pas modifiée dans les 2 groupes ($pD_2 = 5,26 \pm 0,30$ dans le groupe CTRL et $5,12 \pm 0,21$ dans le groupe LPS).

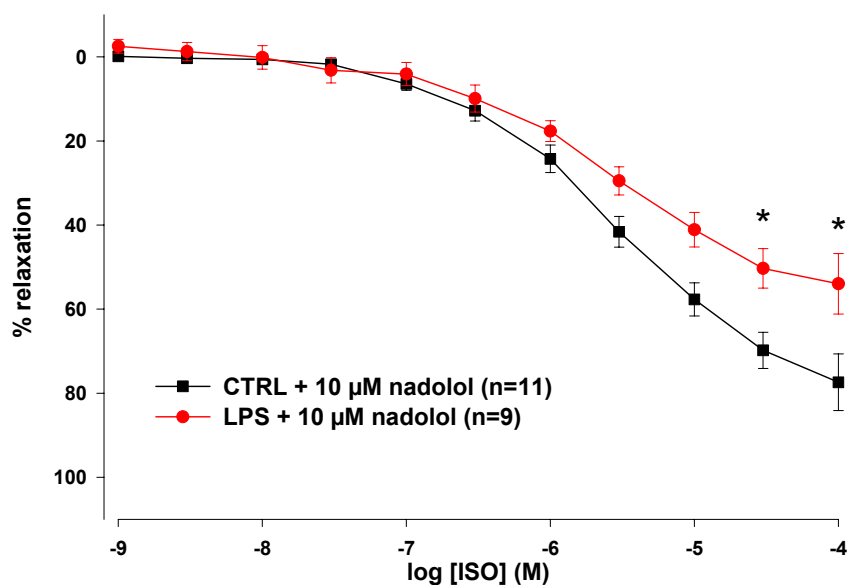


Figure 71 : Courbes concentration-réponse à l'isoprénaline (ISO) des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe et prétraités avec 10 μM de nadolol versus CTRL.

* : $p < 0,05$.

▪ Réponse à la dobutamine

La dobutamine est un agoniste β_1 -AR préférentiel, qui est classiquement utilisé au cours du choc septique pour ses effets inotropes positifs.

La dobutamine est responsable d'une vasodilatation dans les 2 groupes de rats. Cette vasodilatation est différente selon qu'ils s'agissent d'animaux ayant reçu ou non une injection intraveineuse d'endotoxine (Figure 72). Chez les animaux LPS, la puissance de la dobutamine ($pD_2 = 6,15 \pm 0,09, n=6$) tend à être supérieure par rapport au groupe CTRL ($pD_2 = 5,43 \pm 0,12, n=8$). En revanche, son efficacité est significativement diminuée à la dernière concentration (30 μ M) chez les rats LPS ($E_{max} = 63,39 \pm 4,2\%$) par rapport aux animaux CTRL ($77,83 \pm 2,73 \%$)

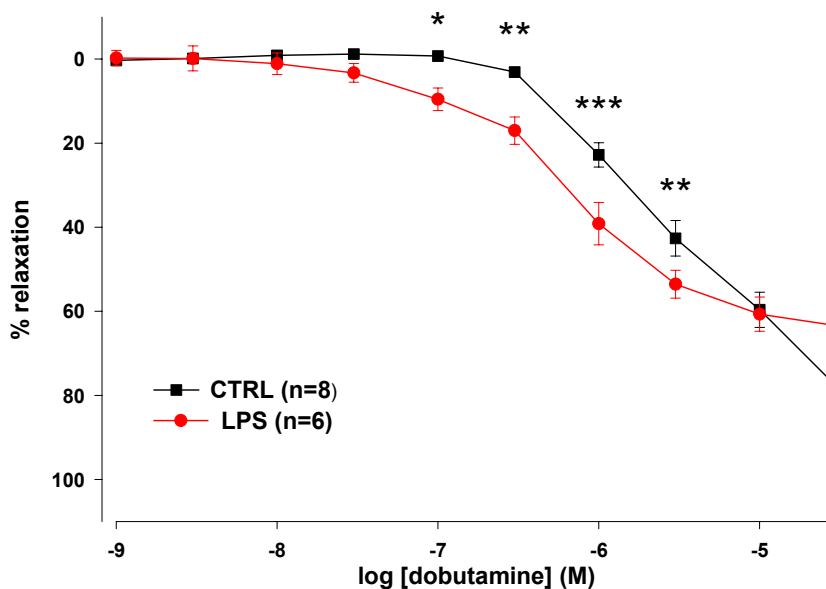


Figure 72 : Courbes concentration-réponse à la dobutamine des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ versus CTRL.

▪ Réponse au salbutamol

Pour évaluer la réponse β_2 -AR, nous avons utilisé comme agoniste préférentiel, le salbutamol.

Le salbutamol est responsable d'une vasorelaxation sur les anneaux d'aorte thoracique précontractés à la phényléphrine, d'efficacité comparable dans les 2 groupes ($E_{max} = 57,51 \pm 5,35 \%$, $n = 7$ pour les rats CTRL et $E_{max} = 54,92 \pm 5,17 \%$, $n = 6$ pour les rats LPS, à $30 \mu\text{M}$ de salbutamol). Cependant, à l'instar de ce qui est observé avec la dobutamine, l'injection de LPS potentialise la vasodilatation induite par le salbutamol de rat. En effet, la valeur de pD_2 est significativement plus élevée ($p < 0,05$) chez les rats endotoxémiques ($pD_2 = 5,84 \pm 0,21$) par rapport aux animaux non traités CTRL ($pD_2 = 5,01 \pm 0,25$).

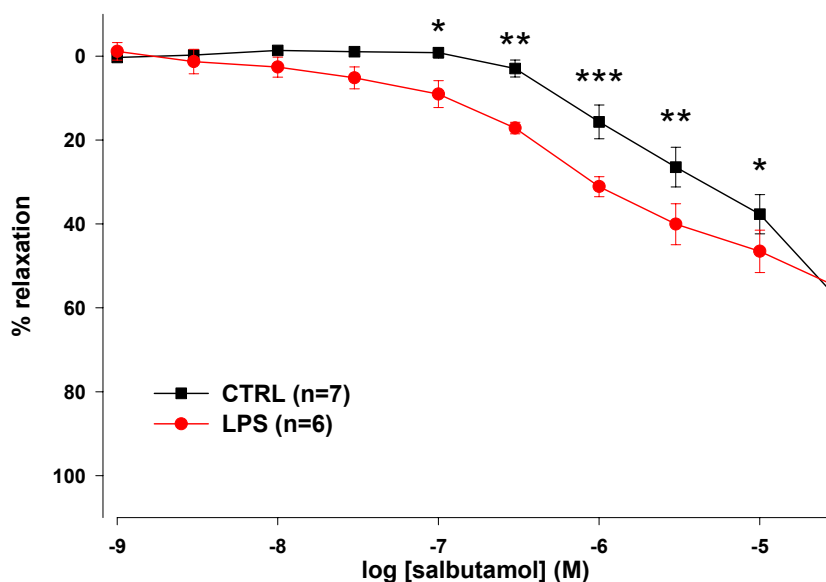


Figure 73 : Courbes concentration-réponse au salbutamol des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ versus CTRL.

▪ Réponse au SR 58611A

Le SR 58611A est un agoniste β_3 -AR préférentiel. Il est responsable d'une vasodilatation endothélium-dépendante impliquant la voie du NO dans l'aorte thoracique de rat (Trochu et coll., 1999; Rozec et coll., 2006). Nous avons évalué les modifications de cette réponse au cours du choc endotoxémique chez le rat (Figure 74).

Le SR 58611A entraîne une vasodilatation concentration dépendante des anneaux aortiques chez les rats. L'efficacité du SR 58611A est réduite de moitié chez les rats LPS ($E_{max} = 44,9 \pm 5,7 \%$, $n = 12$, avec $100 \mu\text{M}$ de SR 58611A) par rapport aux rats CTRL ($E_{max} = 87,53 \pm 3,8 \%$, $n = 12$, avec $100 \mu\text{M}$ de SR 58611A), mais sa puissance n'est pas modifiée ($pD_2 = 4,66 \pm 0,06$ chez les rats CTRL et $pD_2 = 4,69 \pm 0,09$).

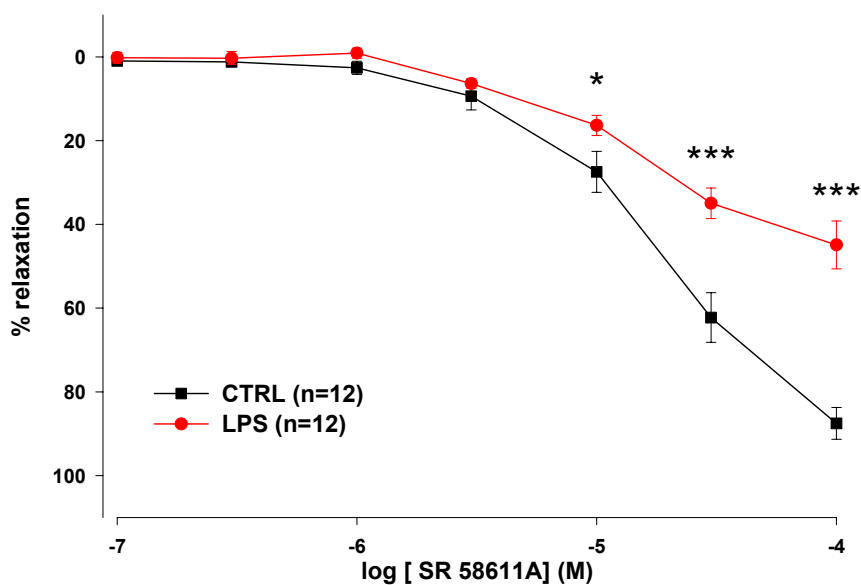


Figure 74 : Courbes concentration-réponse au SR 58611A des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$ versus CTRL.

Pour confirmer que la vasodilatation observée en présence de concentrations croissantes de SR 58611A est bien dépendante de la stimulation des récepteurs β_3 -ARs, nous avons testé sur des rats traités ou non avec du LPS, les effets d'un inhibiteur spécifique du récepteur β_3 -AR, le L-748,337 à raison de 7 μ M (Candelore et coll., 1999). Dans le groupe CTRL, la courbe du SR 58611A est déplacée vers la droite, avec une diminution d'efficacité (E_{\max} en présence de 100 μ M de SR 58611A, $64,31 \pm 6,31$ %, $n = 8$) (Figure 75). La valeur de pD_2 est diminuée en présence de 7 μ M de L-748,337 ($4,57 \pm 0,11$) mais de manière non significative. Au contraire, chez les rats traités par le LPS, la relaxation résiduelle observée en l'absence de l'antagoniste β_3 -AR, n'est pas modifiée significativement (E_{\max} en présence de 100 μ M de SR 58611A, $37,68 \pm 5,77$ %, $n = 6$) (Figure).

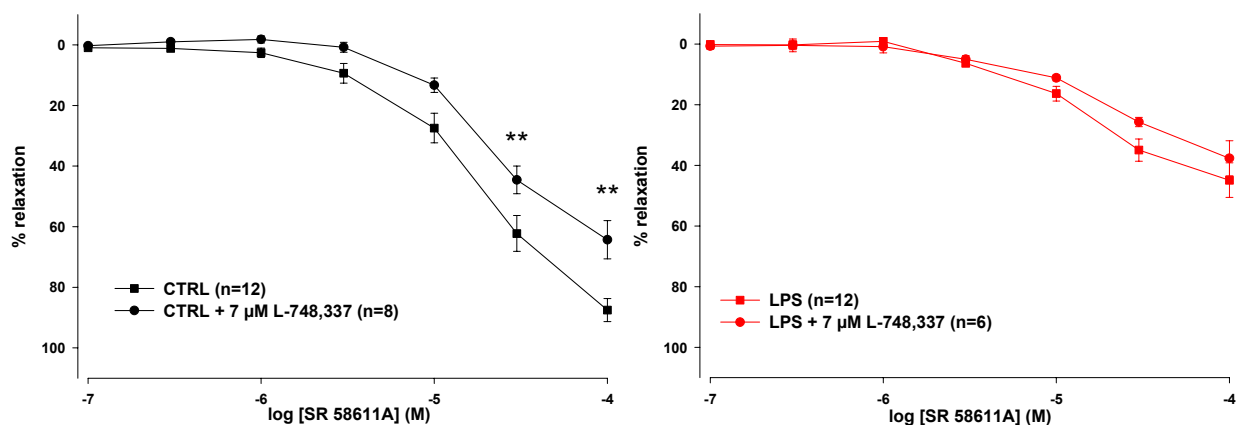


Figure 75 : Courbes concentration-réponse au SR 58611A des anneaux d'aorte thoracique de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe en présence ou non de 7 μ M de L-748,337. * : $p < 0,05$ versus préparation en l'absence d'antagoniste.

Nous avons également évalué l'effet de la désendothélialisation associée ou non à un prétraitement des anneaux par 10 μ M de nadolol (antagoniste β_1 - et β_2 -AR), sur la relaxation induite par le SR 58611A chez les rats LPS et les rats CTRL.

Chez les rats CTRL, la désendothélialisation diminue fortement la relaxation induite par le SR 58611A (E_{max} en présence de 100 μ M de SR 58611A : $50,77 \pm 5,15$ %, $n = 10$ sur les anneaux désendothélialisés *versus* $87,53 \pm 3,8$ %, $n = 12$) (Figure 76). La relaxation persistante après désendothélialisation n'est pas modifiée par le prétraitement en présence de nadolol (E_{max} en présence de 100 μ M de SR 58611A = $44,21 \pm 9,82$, $n=6$). Au contraire chez les rats LPS, la désendothélialisation ne modifie significativement pas la relaxation résiduelle après le traitement par endotoxine (E_{max} en présence de 100 μ M de SR 58611A : $30,11 \pm 5,24$ %, $n = 7$ sur les anneaux désendothélialisés *versus* $44,9 \pm 5,7$ %, $n = 12$). De plus, le prétraitement par 10 μ M de nadolol, diminue la relaxation endothélium-indépendante induite par le SR 58611A (E_{max} en présence de 100 μ M de SR 58611A : $22,45 \pm 4,66$ %, $n = 7$)

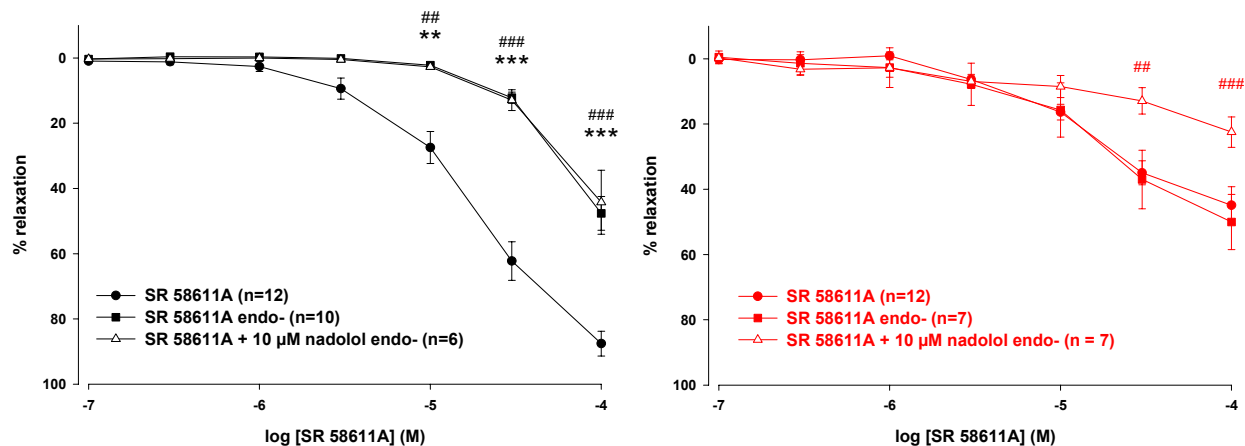


Figure 76 : Courbes concentration-réponse au SR 58611A des anneaux d'aorte thoracique désendothélialisés ou non de rats CTRL et LPS, précontractés à la Phe en présence ou non de 10 μ M de nadolol. **: $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ versus les préparations sans endothélium (endo-). ## : $p < 0,01$; ### : $p < 0,001$ versus les préparations sans endothélium en présence de nadolol.

C. Conclusions et perspectives

Nous avons validé notre modèle d'état de choc (défini par des valeurs hémodynamiques) endotoxémique chez le rat, par la mesure de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle moyenne *in vivo*. Par ailleurs, nous avons confirmé l'altération majeure de la réponse vasoconstrictrice à un agoniste α_1 -AR, la phényléphrine au cours du choc endotoxémique de même que l'existence d'une dysfonction endothéliale comme l'atteste la diminution de la vasodilatation induite par l'acétylcholine. Nous avons également mis en évidence une diminution de la relaxation musculaire lisse en présence d'un donneur de NO (le nitroprussiate de sodium), ce qui indique une altération des effecteurs de la vasodilatation induite par le NO. Notre étude suggère également qu'il existe chez le rat au cours de la phase précoce du choc endotoxémique, des modifications profondes de la réponse vasculaire aux agonistes β -ARs. En effet, globalement, la réponse β -AR est diminuée de façon significative chez les animaux ayant reçu une injection IV de LPS. De plus, nous avons observé chez les animaux endotoxémiques, une réaction compensatrice de cette altération de réponse β -AR, par une potentialisation de la vasorelaxation induite par le salbutamol (un agoniste β_2 -AR préférentiel) et la dobutamine (agoniste β_1 -AR préférentiel) alors que l'effet vasodilatateur du SR 58611A, un agoniste β_3 -AR, est diminuée. D'un point de vue pharmacologique, ce résultat est confirmé par les expériences évaluant les effets de la désendothélialisation avec ou sans prétraitement au nadolol sur la relaxation induite par le SR 58611A. En effet, le SR 58611A persiste à induire une relaxation identique sur les anneaux d'aorte des rats LPS après l'abrasion de l'endothélium, et cette relaxation est pratiquement abolie par le nadolol, alors que chez les rats CTRL, la désendothélialisation altère fortement les effets vasodilatateurs du SR 58611A sans que le nadolol n'ait d'effet supplémentaire.

Il est difficile de comparer les études menées sur les effets vasculaires du choc endotoxémique dans une espèce et un lit vasculaire donnés. En effet, outre le fait que certains travaux évaluent les paramètres vasculaires *in vitro* ou *in vivo*, le mode d'administration (intraveineuse ou intrapéritonéale), la quantité, la nature du LPS utilisé diffèrent d'une étude à l'autre. De plus, pour établir les courbes concentration-relaxation des différents agents vasorelaxants, le niveau de précontraction varie d'une étude à l'autre. Il convient d'atteindre une contraction développée comparable entre les vaisseaux des animaux endotoxémiques et contrôle. C'est pourquoi nous avons choisi un niveau de contraction correspondant à l' EC_{80} de la phényléphrine dans nos deux groupes. Par ailleurs, la cinétique lente de la vasodilatation

induite par les agonistes β_3 -ARs (Trochu et coll, 1999 ; Rozec et coll., 2005), nous a imposé de tenir compte de la relaxation spontanée des anneaux aortiques précontractés à la phényléphrine. Or, cette relaxation est significativement plus marquée sur les anneaux aortiques de rats endotoxémiques. Il nous a donc paru nécessaire de prendre en considération ce paramètre même dans les cas où l'agent vasorelaxant a une cinétique plus rapide. Cette précaution n'est jamais prise dans les autres études.

Il est bien établi qu'au cours du choc endotoxémique, il existe une hyporéactivité vasculaire aux agents vasoconstricteurs et en particulier aux agonistes α_1 -ARs. La production excessive de NO est considérée comme une des causes majeures de cette hyporéactivité vasculaire (Titheradge et coll., 1999; Julou-Schaeffer et coll., 1990). Dans nos conditions expérimentales, l'injection de LPS provoque une hypotension associée à une tachycardie correspondant à la constitution d'un état de choc, ainsi qu'une diminution de la vasoconstriction à la phényléphrine *ex vivo*. Dans la littérature, une étude utilisant le même LPS à une dose légèrement inférieure (4 mg/kg iv) et la même souche de rat, a montré qu'à la 3^{ème} heure, il y avait une augmentation significative des taux de nitrates/nitrites, reflet de la production de NO (Cuzzocrea et coll., 2006). L'origine du NO responsable de la vasoplégie est sujette à controverse. En effet, selon certains auteurs la formation de peroxy-nitrite à partir du NO produit par la NO synthase endothéliale à la phase précoce du choc endotoxémique pourrait être responsable de la réponse réfractaire aux vasoconstricteurs (Szabo et coll., 1995). Il a été suggéré également que la NO synthase endothéliale serait nécessaire à l'expression et à la fonction de la NO synthase inductible (Vo et coll., 2005 ; Connelly et coll., 2005). Mais l'utilisation d'animaux transgéniques déficients en NO synthase inductible, semble indiquer qu'au cours du choc septique, la NO synthase endothéliale ne joue pas un rôle majeur dans les effets du LPS sur la contractilité des cellules musculaires lisses vasculaires (Boyle et coll., 2000). Paradoxalement, alors que de multiples travaux rapportent l'absence d'altération de la vasodilatation endothélium-indépendante (explorée dans notre cas par l'effet du nitroprussiate de sodium), nous avons mis en évidence une diminution très significative de la relaxation induite par ce donneur de NO. Le NO active la guanylate cyclase soluble, qui produit un second messager le GMPc. Ce nucléotide cyclique est responsable de la régulation de nombreuses fonctions cellulaires par le biais d'interaction avec des kinases spécifiques, des canaux ioniques et des phosphodiesterases (Hobbs et Ignarro, 1996). Le rôle du GMPc au cours de la vasoplégie du choc septique semble bien établi (Silva-Santos et coll., 2002). Néanmoins, une étude a révélé que dans un modèle de choc endotoxémique chez le rat, pendant une fenêtre de 8 H suivant l'injection du LPS, la guanylate cyclase soluble n'est pas

fonctionnelle. Il semblerait de plus que ce phénomène soit NO-dépendant (Fernandes et coll., 2006).

La dysfonction endothéliale est classiquement décrite au cours du choc endotoxémique chez le rat (McIntyre et coll., 1997). L'altération de la vasodilatation induite par l'acétylcholine signe dans notre étude, cette dysfonction endothéliale. Les mécanismes responsables de l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante dans ce contexte sont multiples. Le LPS est responsable d'une diminution de l'expression de la NO synthase-endothéliale (Lu et coll., 1996) mais également d'une baisse de son activité (Graier et coll., 1994). La diminution d'activité de la NO synthase endothéliale pourrait être en rapport avec l'augmentation du NO produit par la NO synthase inductible (Schwartz et coll., 1997). Le délai de survenue de ces deux mécanismes est compatible avec notre protocole, puisque il y a expression de la NO synthase inductible et que des auteurs ont démontré une diminution de l'expression de la NO synthase endothéliale dans les 3 H suivant l'exposition au LPS ou à des cytokines (en particulier le TNF- α) (Yoshizumi et coll., 1993). De même, les autres voies de signalisations impliquées dans la vasodilatation endothélium-dépendante sont perturbées. Ainsi, il y a une atténuation de la vasodilatation induite par l'EDHF (endothelial derived hyperpolarizing factor) (Kristof et coll., 1997; Oyekan, 2002) et une altération de la voie de la cyclo-oxygénase (Soler et coll., 2001). Il faut remarquer que très peu de travaux tiennent compte du type de protocole anesthésique utilisé et de la réanimation de l'animal. Néanmoins, ces deux éléments peuvent largement influencer la réponse systémique au LPS et les altérations de la vasomotricité. Le remplissage de l'animal endotoxémique, même avec des volumes limités afin de maintenir des niveaux de pression artérielle moyenne (60 mmHg), module la réponse inflammatoire. De même, les anesthésiques peuvent avoir un effet sur la dysfonction endothéliale induite par le LPS. Il semble que l'exposition même brève (puisque 50 secondes suffisent) à l'isoflurane, que nous utilisons dans notre étude, réduit la réponse inflammatoire (Hofstetter et coll., 2005) et prévient l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante (Plachinta et coll., 2003).

Dans notre étude, la vasodilatation induite par un agoniste β -AR non sélectif est diminuée de manière significative. D'autres auteurs observent au contraire une absence d'altération de la réponse à l'isoprénaline au niveau de l'aorte thoracique de rats endotoxémiques (Mcintyre et coll., 1998). En revanche, sur des anneaux d'artère pulmonaire chez les mêmes animaux, ils constatent une diminution significative de la relaxation induite par l'isoprénaline. Enfin, dans ce même travail, la vasodilatation induite par la forskoline, un activateur de l'adénylate-cyclase, n'est pas modifiée dans les 2 lits vasculaires. Il faut

souligner que dans cette étude, le choc endotoxémique est induit par 20 mg/kg de LPS en injection intrapéritonéale et les animaux sacrifiés après 6 H d'incubation.

Sur le plan vasculaire, des études *in vivo* ont évalué les effets de la stimulation des différents récepteurs β -ARs sur la circulation au cours du choc septique ou endotoxémique. La dobutamine est généralement considérée chez l'homme comme un agoniste β_1 -AR sélectif (Schiffelers et coll., 1999). Des travaux rapportent que cet agoniste β -AR, le plus utilisé dans le choc septique, est capable d'augmenter la perfusion capillaire sans que cette augmentation soit en relation avec un effet systémique (en particulier un effet inotrope positif) (De Backer et coll., 2006). Cette même équipe avait d'ailleurs mis en évidence chez l'homme la persistance d'une vasodilatation endothélium-dépendante dans la microcirculation au cours du choc septique chez l'homme (De Backer et coll., 2002). Chez le rat, des mesures des effets de la dobutamine sur la perfusion hépatosplanchnique montrent également une augmentation du flux sanguin indépendante d'effets sur le débit cardiaque (Secchi et coll., 2001).

Concernant les récepteurs β_2 -ARs au cours du choc septique, la littérature fait surtout état des effets « anti-inflammatoires » de ces agonistes, notamment par leurs actions sur les monocytes (Kuroki et coll., 2004). Certains travaux expérimentaux relatent l'intérêt des agonistes β_2 -AR dans la prévention de la défaillance multiviscérale par leur action sur la sécrétion de cytokines comme le TNF- α , mais également sur le stress oxydatif et la production excessive de NO (Liaw et coll., 2003). Des études récentes ont révélé l'effet bénéfique de la sur-expression des récepteurs β_2 -ARs dans le parenchyme rénal chez le rat au cours d'un choc endotoxémique en terme de filtration glomérulaire (Nakamura et coll., 2003; Nakamura et coll., 2005). Les auteurs suggèrent là aussi les effets des récepteurs β_2 -ARs dans des phénomènes inflammatoires, mais n'évoquent pas d'effet sur la microcirculation rénale par exemple. La stimulation des récepteurs β_2 -ARs endothéliaux est responsable au cours du choc endotoxémique d'une augmentation de la sécrétion d'IL-6 (Gornikiewicz et coll., 2000). Quelques travaux suggèrent également un effet de la stimulation β_2 -AR sur la perméabilité vasculaire. En effet, *in vivo*, il a été montré chez le rat endotoxémique une réduction de la perméabilité microvasculaire (Schmidt et coll., 1998). Ces données sont confirmées *in vitro* par les résultats d'une étude menée chez des souris endotoxémiques (Irie et coll., 2001). Dans ce travail, les auteurs suggèrent que non seulement les agonistes β_2 -ARs mais également les agents pharmacologiques responsables d'une augmentation de l'AMPc, entraînent une diminution de la perméabilité microvasculaire cutanée. Cette diminution de la perméabilité vasculaire serait secondaire à une diminution de la synthèse de TNF- α induite par le LPS. Concernant les modifications des effets vasomoteurs des agonistes β_2 -ARs au cours du choc

septique, peu de données sont disponibles. La stimulation β_2 -AR est responsable classiquement d'une vasodilatation de l'aorte thoracique de rat (Ferro et coll., 2004). Cette vasodilatation est partiellement NO-dépendante (environ 30% de la réponse) (Ferro et coll., 2004). Donaldson et Myers rapportent une diminution significative de la vasorelaxation induite par le salbutamol (agoniste β_2 -AR) sur des anneaux d'aorte thoracique de rat désendothélialisés, 6 H après l'injection de 5 mg/kg IV d'endotoxine chez des rats Wistar (Donaldson et Myers, 1996). Dans notre étude, il existe une potentialisation significative de la réponse β_2 -AR chez les rats endotoxémiques. Chez l'homme, très peu d'agonistes β_2 -ARs sélectifs ont été évalués dans le cadre du choc septique. La dopexamine, un agoniste dopaminergique améliorerait le flux sanguin notamment splanchnique au cours du choc septique par le biais de propriétés β_2 -ARs (Schmidt et coll., 1998).

La mise en évidence d'un 3^{ème} sous-type de récepteurs β -ARs fonctionnel au niveau vasculaire chez l'homme est récent (Dessy et coll., 2004; Rozec et coll., 2005). Le récepteur β_3 -AR semble localisé au niveau endothélial et est responsable d'une vasodilatation impliquant en particulier la voie du NO. Ces propriétés pharmacologiques (faible affinité pour les agonistes conventionnels et résistance au phénomène de désensibilisation), laissent supposer que les effets engendrés par son activation sont essentiellement observés dans des circonstances physiopathologiques associées à un tonus sympathique élevé (pour revue, voir Rozec et Gauthier, 2006). Très peu d'études évaluent les modifications de la réponse β_3 -AR au cours du choc septique ou endotoxémique. Dans une étude portant sur le tissu adipeux de rats endotoxémiques, Berkowitz et coll., ont suggéré que le LPS par le biais de la synthèse de TNF- α , pourrait induire une diminution de l'expression de l'ARNm du récepteur β_3 -AR dans ce tissu (Berkowitz et coll., 1998). Plus récemment, dans un modèle vasculaire particulier (les veines digités de cheval), Mallem et coll. ont évoqué une altération de la vasodilatation induite par les agonistes β_3 -ARs dans ce lit vasculaire lors d'une exposition à de l'endotoxine (Mallem et coll., 2003). Selon ces auteurs, dans ce type de vaisseau, l'altération de la réponse aux agonistes β_3 -ARs serait secondaire à l'activation de la voie des prostaglandines. Dans le cadre de notre étude, nous observons également une altération de la réponse β_3 -AR.

De nombreuses études se sont penchées sur le rôle des récepteurs β -ARs au cours du choc endotoxémique ou septique. De multiples agents vasopresseurs et/ou inotropes utilisés dans le traitement de ce syndrome (adrénaline, noradrénaline, dobutamine, dopamine, dopexamine) présentent des propriétés agonistes β -ARs. Inversement, de plus en plus de patients pris en charge dans ce contexte particulier, sont traités au long cours par des β -bloquants, dont la sélectivité pour les sous-types de récepteurs β -ARs est extrêmement

variable. Par ailleurs, quelques études ont montré l'intérêt potentiel de l'utilisation de β -bloquants dans la prise en charge de choc septique ou d'un syndrome proche, le SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome). Des travaux cliniques ont montré chez le grand brûlé (la brûlure étant une cause de SIRS) l'effet bénéfique de l'utilisation des β -bloquants sur le métabolisme, et l'absence d'effet délétère sur le plan cardiovasculaire (Herndon et coll., 2001). Chez le rat en état de choc septique après ligature-ponction cœcale, Suzuki et coll. ont montré que le traitement par β -bloquant (esmolol) est responsable d'une amélioration significative de la performance myocardique de ces animaux (Suzuki et coll., 2005). Ils montrent également que le traitement par esmolol permet une restauration de la densité des récepteurs β_1 -ARs myocardiques. Ils concluent que les β -bloquants pourraient permettre une protection myocardique au cours du choc septique en limitant la dépense myocardique en oxygène. L'esmolol, est classiquement considéré comme un β -bloquant cardiosélectif de demi-vie courte, ce qui offre une relative sécurité dans son utilisation dans de telle indication. Dans un travail portant sur la thermogénèse induite par le BRL 37344, un agoniste β_3 -AR, une équipe suggère que l'esmolol pourrait avoir des effets antagonistes β_3 -ARs (Murao et coll., 2002). L'ensemble de ces éléments souligne bien l'intérêt de caractériser le rôle et/ou les dysfonctions des différentes voies β -ARs au niveau cardiovasculaire au cours du choc septique.

Au niveau cardiaque, il est établi qu'il existe des perturbations importantes des récepteurs β -ARs. Certaines études semblent démontrer que le nombre de récepteur β -ARs est diminué de plus de 40 % chez les patients ayant un sepsis (Bernardin et coll., 1998). Cependant, certaines études soulignent le caractère biphasique des modifications de la sensibilité des récepteurs β -ARs myocardiques, avec une augmentation du courant calcique après stimulation β -AR à 12 H puis une diminution à 36 H (Abi-Gerges et coll., 199). Dans une autre étude, les récepteurs β -ARs semblent précocement externalisés expliquant l'efficacité de la dobutamine, puis internalisés confirmant l'absence d'effet sur le débit cardiaque de cette substance au cours de l'état de choc septique installé (Tang et coll., 1998). L'absence d'efficacité des agonistes β -ARs au cours de la phase tardive du sepsis a également été décrite chez l'homme (Silverman et coll., 1993).

Il est surprenant de constater l'absence d'étude établissant de manière précise chez l'homme ou dans un modèle animal, les altérations respectives des différents récepteurs β -ARs vasculaires au cours du choc septique, d'autant plus que le traitement de la défaillance cardiocirculatoire fait largement appel, comme nous l'avons vu, à des catécholamines ainsi qu'à des agonistes β -ARs. Certains auteurs semblent même insister sur l'intérêt des agonistes

β -ARs sur la perfusion de certains lits vasculaires (comme la circulation splanchnique), indépendamment d'effet sur le débit cardiaque. Pour compléter notre étude sur la modulation des effets des agonistes β -ARs vasculaire au cours de l'endotoxémie, nous devons évaluer par des techniques de biologie moléculaire mais également d'immunohistochimie, les niveaux d'expression des transcrits et les modifications de localisation cellulaire des différents sous-types de récepteurs β -ARs. Ultérieurement, sur le myocarde, nous devons déterminer par des approches similaires (pharmacologiques, de biologie moléculaire et immunohistologique) les altérations respectives des différents sous-types de récepteurs β -ARs. Ces résultats nous permettront d'établir le meilleur profil d'association d'agonistes et/ou d'antagonistes β -ARs pour optimiser l'hémodynamique de ces rats endotoxémiques. Nous pourrions confirmer ensuite *in vivo* l'efficacité de ces associations par la mesure de paramètres hémodynamiques (pression artérielle, fréquence cardiaque, courbes pression-volume cardiaques) et de la mortalité des animaux endotoxémiques.

CONCLUSION GENERALE

Mon travail de thèse, qui s'articule autour de projets complémentaires, nous a permis non seulement de compléter la caractérisation des rôles physiologiques du récepteur β_3 -AR dans le système cardiovasculaire, mais également de considérer ce récepteur comme un élément essentiel dans l'histoire naturelle d'un certain nombre de pathologies cardiovasculaires. De plus, ce récepteur apparaît comme une cible thérapeutique potentielle, d'ores et déjà accessible par des traitements agissant sur le système nerveux autonome commercialisés comme le β -bloquant de 3^{ème} génération, le nébivolol.

Chez l'homme, avant notre travail mettant en évidence un récepteur β_3 -AR fonctionnel au niveau de l'endothélium de l'artère mammaire interne, Dessy et coll. étaient parvenus à caractériser ce récepteur au sein de la microcirculation coronaire (Dessy et coll., 2004). L'activation du récepteur β_3 -AR induit dans les deux lits vasculaires une vasodilatation, dépendante de la voie du NO. Pour notre étude pharmacologique, nous avons utilisé un des antagonistes du récepteur β_3 -AR humain le plus spécifique disponible, le L-748,337. Nous avons complété l'approche pharmacologique par des techniques moléculaires et biochimiques, qui nous ont permis de localiser le récepteur au niveau endothélial, confirmant ainsi nos résultats fonctionnels. Concernant les microcoronaires humaines, Dessy et coll. suggèrent une implication possible de l'EDHF comme une voie de signalisation dans les artères humaines. Plus encore, ils évoquent un rôle possible de suppléance de cette voie de signalisation dans le cas de dysfonction endothéliale avec altération de la voie du NO survenant au cours de pathologies cardiovasculaires (diabète, athérosclérose). En effet, tout comme eux, certaines équipes ont montré que la vasodilatation dépendante de l'EDHF persistait même en présence de facteurs de risque d'athérosclérose (Miura et coll., 1999). Ce type de phénomènes adaptatifs, pourrait également être observé dans certains lits vasculaires humains en dehors de circonstances pathologiques, comme lors de la grossesse par exemple, où la vasodilatation des microartères endométriales est plus EDHF-dépendante chez les femmes enceintes que chez les femmes non-enceintes (Kenny et coll., 2002). Dans le cas des artères mammaires internes, quelques études suggèrent l'existence dans ce type de vaisseau d'une vasodilatation EDHF-dépendante (Archer et coll., 2003). La nature de l'EDHF est toujours sujette à controverse (Féléto et Vanhoutte, 2006). Néanmoins, un certain nombre de critères a été défini pour caractériser l'EDHF, en particulier l'activation de canaux potassiques le plus souvent calcium-dépendants (Bryan et coll., 2005). Or, il se trouve que la vasodilatation induite par la stimulation des récepteurs β_3 -ARs implique l'activation de ces

mêmes canaux potassiques (Rautureau et coll., 2002). Ces résultats soulignent la difficulté de reconnaître la part du NO et de l'EDHF dans l'effet du récepteur β_3 -AR.

En dehors des effets sur la vasomotricité, nos travaux indiquent que le récepteur β_3 -AR est responsable de la régulation d'une autre fonction importante de l'endothélium : l'angiogénèse. Le récepteur β_3 -AR est responsable d'un effet pro-angiogénique dépendant de la voie du NO et impliquant la voie PI3K/Akt. Comme pour les effets vasomoteurs, il reste à établir si l'EDHF ne peut pas être impliqué dans une partie de la réponse pro-angiogénique observée. De manière surprenante, il existe peu de travaux dans la littérature faisant état des effets des catécholamines sur l'angiogénèse. Néanmoins, nos résultats sont à mettre en parallèle avec ceux obtenus par Iaccarino et coll. concernant les récepteurs β_2 -ARs. En effet, ils décrivent un rôle pro-angiogénique de ce récepteur dans un modèle d'ischémie chez le rat (Iaccarino et coll., 2005). De plus, il a été démontré chez la souris un effet pro-angiogénique du nébivolol, dépendant de ses propriétés β_3 -ARs (Dessy et coll., 2005) et également du BRL 37344 sur les cellules endothéliales choroïdiennes humaines (Steinle et coll., 2005). L'effet pro-angiogénique de la stimulation β_3 -AR ouvre ainsi de nouvelles perspectives sur le rôle physiopathologique de ce récepteur dans la néoangiogénèse ischémique.

Les effets vasculaires de la stimulation β_3 -AR sont capables de diminuer les contraintes du ventricule gauche en réduisant la postcharge. En effet, la vasodilatation périphérique induite par les agonistes β_3 -ARs, diminue les résistances périphériques. Par ailleurs, l'augmentation du débit sanguin coronaire (et éventuellement du greffon vasculaire mammaire interne utilisé dans les pontages aortocoronariens) secondaire à la vasorelaxation, augmente l'apport d'oxygène au niveau myocardique. Enfin, par son action pro-angiogénique, le récepteur β_3 -AR pourrait favoriser la néoangiogénèse dans les zones ischémiques myocardiques. De nombreuses inconnues persistent quant aux voies de signalisation impliquées dans les effets vasculaires du récepteur β_3 -AR. En effet, s'il est établi que sa stimulation active la voie du NO, des éléments clés sont à déterminer, comme l'existence et la nature de la protéine G dans la transduction du signal. De même, s'il est établi que l'EDHF régule la vasomotricité et possède une action pro-angiogénique (Michaelis et Fleming, 2006), son importance dans les effets de la stimulation β_3 -AR reste à préciser.

Sur le plan myocardique, le récepteur β_3 -AR est un élément de la modulation de la réponse aux catécholamines, dont l'importance et les mécanismes ne sont que partiellement connus. Les propriétés pharmacologiques de ce récepteur (faible sensibilité aux agonistes et aux antagonistes conventionnels) ainsi que des particularités dans sa structure protéique (absence de site de phosphorylation impliqué dans les phénomènes de désensibilisation)

indiquent qu'il est activé en cas de tonus sympathique élevé. De plus, il est couplé à la voie du NO dans les cardiomyocytes, et de ce fait il est susceptible de réguler les effets du NO sur la fonction cardiaque, en particulier en cas de stimulation β -AR (Massion et coll., 2003). Le NO a des actions multiples, qui parfois, peuvent paraître contradictoires sur le myocarde. Le NO diminue notamment les réponses inotropes et chronotropes à la stimulation β -AR comme cela a été démontré dans un modèle de souris transgéniques surexprimant la NO synthase endothéliale de façon modérée au niveau cardiomyocytaire (Janssens et coll., 2004). Le NO a des actions majeures sur le métabolisme cardiaque, et il régule largement la consommation en oxygène cardiaque (MVO_2) et la respiration mitochondriale (Trochu et coll., 2000). Dans les phénomènes d'ischémie reperfusion, le NO aurait un effet protecteur. Enfin, il pourrait limiter les phénomènes apoptotiques et le remodelage hypertrophique (pour revue, Massion et coll., 2001). De plus, il est admis que la stimulation β -AR augmente la fréquence cardiaque. Cependant, les sous-types de récepteurs β -ARs impliqués dans ces effets ne sont pas clairement identifiés. En clinique, l'administration de dobutamine, un agoniste β_1 -AR, est arythmogène. Le salbutamol, un agoniste β_2 -AR, augmente la fréquence cardiaque mais prolonge l'intervalle QT. Une étude rapporte que la stimulation β_3 -AR produit des effets opposés sur la fréquence cardiaque, ces effets dépendent de la voie de signalisation recrutée (Sterin-Borda et coll., 2006). En effet, les auteurs décrivent un couplage du récepteur β_3 -AR à la fois à la voie de l'AMPc et à la voie NO-GMPc, cette dernière voie limite de façon significative l'effet chronotrope positif induit par la voie de l'AMPc. Il semble donc exister une interaction négative entre les nucléotides cycliques. Nos résultats préliminaires dans les cardiomyocytes de lapin montrent que la stimulation β_3 -AR induit des effets inotrope négatif et lusitrope positif associés à l'inhibition des courants calciques de type L et l'activation des canaux potassiques retardés rectifiants, I_{Ks} , *via* la voie $G_i/0$ -NO. Ces résultats suggèrent que les récepteurs β_3 -ARs sont une cible relevante pour le traitement des arythmies en diminuant la surcharge calcique et en prévenant l'allongement de la repolarisation. Pour étayer cette hypothèse, nous comparerons les effets des stimulations β_1 , β_2 et β_3 -ARs sur l'activité électrique cardiaque de lapin (courants potassiques, potentiel d'action) et les voies de signalisation mises en jeu dans ces effets seront recherchées. L'ensemble de ces considérations rend donc bien compte de l'importance que peut avoir le récepteur β_3 -AR au cours des pathologies cardiovasculaires. Dans ce contexte, la mise en évidence des propriétés β_3 -ARs d'un β -bloquant, le nébivolol, a une signification toute particulière. En effet, ce β -bloquant de 3^{ème} génération est déjà indiqué dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque (Flather et coll., 2005) et se caractérise par une excellente tolérance chez le sujet

âgé. Il reste à déterminer si ces propriétés sont à mettre sur le compte des effets β_3 -ARs et si ceux-ci varient selon le type de patient. En effet, aucune étude n'a déterminé les modifications potentielles d'expression, de couplage et *in fine* fonctionnelles des récepteurs β_3 -ARs, par exemple au cours du vieillissement. La caractérisation précise du rôle de ce récepteur et les interactions avec les 2 autres sous-type de récepteurs β -ARs, permettra d'envisager le profil pharmacologique des traitements β -bloquants à proposer dans les différentes pathologies cardiovasculaires en tenant compte du terrain, et pourquoi pas de caractéristiques génétiques (polymorphisme des récepteurs β -ARs).

Les résultats de l'ensemble de ce travail semblent donc indiquer que la stimulation β_3 -AR pourrait constituer un objectif particulièrement pertinent dans le traitement de pathologies cardiovasculaires, et en particulier l'insuffisance cardiaque ischémique. Néanmoins, l'étude de cet aspect capital, se heurte au problème du modèle à utiliser. En effet, le profil d'expression et le rôle fonctionnel du récepteur β_3 -AR varie énormément d'une espèce à l'autre (Gauthier et coll., 1999). L'espèce canine se rapproche le plus de ce « profil humain » mais pour des raisons logistiques et éthiques évidentes, elle est peu utilisée. En tenant compte de nos différentes études, le rat semble être une espèce intéressante pour l'évaluation du rôle du récepteur β_3 -AR vasculaire, en raison d'homologies de localisation, de voie de signalisation et de fonction. Cependant, le myocarde de rat (tout comme celui de souris) est quasiment dépourvu de récepteurs β_3 -ARs. Néanmoins, au cours de l'insuffisance cardiaque (Zhang et coll., 2005a) et dans le diabète (Dincer et coll., 2001) il a été constaté une augmentation de l'expression du récepteur β_3 -AR. Comme la densité des récepteurs β_3 -ARs est augmentée dans les cardiomyocytes mais aussi dans les cellules endothéliales au stade terminal de l'insuffisance cardiaque, nous avons développé un modèle de rat transgénique surexprimant le récepteur β_3 -AR humain sélectivement dans les cellules endothéliales. Des résultats préliminaires montrent que cette surexpression est associée à une diminution des récepteurs β_1 -ARs sans modification de la densité des récepteurs β_2 -ARs. De plus, la réponse inotrope positive induite par l'isoprénaline est altérée chez les rats transgéniques. Ces résultats démontrent pour la première fois que les récepteurs β_3 -ARs endothéliaux régulent la contraction cardiaque et l'expression des autres récepteurs β -ARs dans les cardiomyocytes. Il reste à déterminer les mécanismes cellulaires impliqués dans ces effets. En parallèle, et en collaboration avec JL Balligand (Bruxelles, Belgique), nous utiliserons des adénovirus recombinants codant le récepteur β_3 -AR humain pour évaluer les conséquences de la surexpression des récepteurs β_3 -ARs sur l'expression des différents sous-types de récepteurs β -ARs cardiaques et sur les activités électriques et contractiles. Pour cela, l'adénovirus sera

délivré soit dans le myocarde bordant la zone ischémique, soit dans le cœur entier, soit dans la circulation coronaire. Les effets pro-angiogéniques de la surexpression des récepteurs β_3 -ARs seront également déterminés. Enfin, comme nous l'avons vu, nos approches *in vitro* chez le lapin, indique que le récepteur β_3 -AR est présent au niveau myocardique dans cette espèce et se comporte de façon comparable à l'homme. De manière surprenante, ces effets ne sont pas retrouvés sur cœur entier. Il est donc nécessaire de compléter ces expériences afin d'expliquer une telle différence. Une fois le choix de l'espèce fait, celui du modèle pathologique reste à déterminer. Dans le cas de l'insuffisance cardiaque expérimentale, la ligature coronaire est largement utilisée. Selon la taille de l'infarctus, l'animal va évoluer vers l'insuffisance cardiaque : soit rapidement (au maximum dès la ligature si le territoire infarcté est important), soit de manière plus lente après une phase de compensation par remodelage myocardique. Peu de travaux ont cherché à évaluer les variations d'expression et de fonction des différents sous-types de récepteur β -ARs. L'existence du récepteur β_3 -AR impose, qui plus est, une actualisation de ces caractérisations. Il reste également à déterminer si ces changements sont dus à la réexpression d'un programme génétique fœtal que l'on observe au cours du processus de remodelage lors de l'insuffisance cardiaque. Il serait également pertinent d'évaluer l'importance de ce récepteur au cours de l'embryogenèse.

Dans le tableau complexe que constitue le choc septique, la dysfonction cardiocirculatoire est bien connue. Il existe en particulier des anomalies importantes des récepteurs adrénergiques. Chez le rat, au niveau myocardique, il y a une altération bien connue au cours du choc septique de la réponse β -AR en raison d'une diminution de la densité et/ou une altération de la fonction des récepteurs (Boillot et coll., 1996). Néanmoins, aucune étude n'a précisé les perturbations respectives de chaque sous-type de récepteurs β -ARs, en sachant notamment que, chez le rat, le récepteur β_3 -AR est peu ou pas exprimé dans les conditions physiologiques (Gauthier et coll., 1999). De même, les modifications de la réponse β -AR connues et détaillées dans de nombreuses circonstances pathologiques (insuffisance cardiaque, hypertension artérielle) (Queen et Ferro, 2006) sont très peu étudiées dans le choc septique, alors même que des agonistes β -ARs font partie des traitements indiqués dans ce tableau, et que leurs actions directes sur le flux sanguin dans certains territoires (augmentation de la perfusion splanchnique en particulier) sont recherchées (Holmes, 2005). Dans ce contexte, nous sommes parvenus à détailler, à l'aide d'une approche pharmacologique, les anomalies des récepteurs β -ARs vasculaires dans un modèle de choc endotoxémique chez le rat. Cette étude sera à compléter par des techniques de biochimie et de biologie moléculaire, afin de mettre en évidence des modifications du niveau d'expression des ARN messagers et

des protéines des trois sous-types de récepteurs β -ARs. Dans la mesure où il semble bien que les effets du récepteur β_3 -AR sont d'autant plus patents qu'il existe une concentration élevée de catécholamines et/ou une diminution de la densité des autres récepteurs β -AR, il est donc logique de l'étudier dans ces circonstances. En la matière, le choc septique est un exemple caricatural, véritable drame clinique, associé à une mortalité et une morbidité importantes. Malgré des essais thérapeutiques nombreux, le traitement symptomatique garde à l'heure actuelle une place prépondérante. Le volet cardiovasculaire de cette prise en charge est très important, néanmoins l'éventail des médicaments à notre disposition est limité. Les catécholamines ou les agonistes adrénergiques de synthèse dont nous disposons actuellement, sont peu nombreux et insuffisamment spécifiques pour avoir une action précise sur tel ou tel type de récepteur. En confrontant les résultats obtenus au niveau vasculaire, avec de futures évaluations des modifications de l'expression et de la fonction des sous-types de récepteurs β -ARs cardiaques, nous espérons à l'instar de l'insuffisance cardiaque ischémique, pouvoir cibler de nouvelles approches thérapeutiques. Par exemple, il pourrait être pertinent d'associer un antagoniste β_3 -AR, pour son effet myocardique à un agoniste β_2 -AR, pour son action vasculaire. De plus, si de telles associations sont efficaces dans un modèle animal, quel est le meilleur délai d'administration et l'effet d'autres thérapeutiques (remplissage vasculaire, immunothérapie...) et surtout quand est-il chez l'homme ?

Ainsi, comme nous l'avons vu, le récepteur β_3 -AR découvert il y a près de 20 ans a considérablement complexifié l'organisation du système nerveux sympathique. Il demeure un vaste sujet d'investigation en physiopathologie cardiovasculaire et constitue une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

RÉFÉRENCES

- Abi-Gerges, N., Tavernier, B., Mebazaa, A., Faivre, V., Paqueron, X., Payen, D., Fischmeister, R. & Mery, P. F. (1999) Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **160**, 1196-1204.
- Abu-Amero, K. K., Al Boudari, O. M., Mohamed, G. H. & Dzimir, N. (2005) Beta 3 adrenergic receptor Trp64Arg polymorphism and manifestation of coronary artery disease in Arabs. *Hum.Biol.*, **77**, 795-802.
- Adeagbo, A.S. & Triggle, C.R. (1991) Effects of some inorganic divalent cations and protein kinase C inhibitors on endothelium-dependent relaxation in rat isolated aorta and mesenteric arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol*, **18**, 511-521.
- Agarwal, A., Williams, G. H. & Fisher, N. D. (2005) Genetics of human hypertension. *Trends Endocrinol.Metab*, **16**, 127-133.
- Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.*, **2**, 675-680.
- Akira, S. (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.*, **15**, 5-11.
- Alberti, C., Brun-Buisson, C., Burchardi, H., Martin, C., Goodman, S., Artigas, A., Sicignano, A., Palazzo, M., Moreno, R., Boulme, R., Lepage, E. & Le Gall, R. (2002) Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.*, **28**, 108-121.
- Ahlquist, RF. (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, **153**, 586-600.
- Altwegg, L. A., d'Uscio, L. V., Barandier, C., Cosentino, F., Yang, Z. & Luscher, T. F. (2000) Nebivolol induces NO-mediated relaxations of rat small mesenteric but not of large elastic arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **36**, 316-320.
- Anderson, K. V. (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr.Opin.Immunol.*, **12**, 13-19.
- Andre, D. E., Arnet, U., Yang, Z. & Luscher, T. F. (2000) Nebivolol inhibits human aortic smooth muscle cell growth: effects on cell cycle regulatory proteins. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **35**, 845-848.
- Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J. & Pinsky, M. R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.*, **29**, 1303-1310.
- Annane, D., Bellissant, E., Sebille, V., Lesieur, O., Mathieu, B., Raphael, J. C. & Gajdos, P. (1998) Impaired pressor sensitivity to noradrenaline in septic shock patients with and without impaired adrenal function reserve. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, **46**, 589-597.
- Annane, D., Trabold, F., Sharshar, T., Jarrin, I., Blanc, A. S., Raphael, J. C. & Gajdos, P. (1999) Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **160**, 458-465.
- Annane, D., Sebille, V., Troche, G., Raphael, J. C., Gajdos, P. & Bellissant, E. (2000a) A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *JAMA*, **283**, 1038-1045.
- Annane, D., Sanquer, S., Sebille, V., Faye, A., Djuranovic, D., Raphael, J. C., Gajdos, P. & Bellissant, E. (2000b) Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet*, **355**, 1143-1148.
- Annane, D., Bellissant, E. & Cavaillon, J. M. (2005) Septic shock. *Lancet*, **365**, 63-78.
- Anthony, A., Schepelmann, S., Guillaume, J. L., Strosberg, A. D., Dhillon, A. P., Pounder, R. E. & Wakefield, A. J. (1998) Localization of the beta(beta)3-adrenoceptor in the human gastrointestinal tract: an immunohistochemical study. *Aliment.Pharmacol.Ther.*, **12**, 519-525.

- Arch, J. R., Ainsworth, A. T., Cawthorne, M. A., Piercy, V., Sennitt, M. V., Thody, V. E., Wilson, C. & Wilson, S. (1984) Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, **309**, 163-165.
- Arch, J. R. & Kaumann, A. J. (1993) Beta 3 and atypical beta-adrenoceptors. *Med.Res.Rev.*, **13**, 663-729.
- Arch, J. R. & Wilson, S. (1996) Beta 3-adrenoceptors and the regulation of metabolism in adipose tissues. *Biochem.Soc.Trans.*, **24**, 412-418.
- Arch, J. R. (2002) beta(3)-Adrenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress. *Eur J Pharmacol.*, **440**, 99-107.
- Archer, S. L., Huang, J. M., Hampl, V., Nelson, D. P., Shultz, P. J. & Weir, E. K. (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 7583-7587.
- Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M. & Isner, J. M. (1999) VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.*, **18**, 3964-3972.
- Atef, N., Lafontan, M., Double, A., Helary, C., Ktorza, A. & Penicaud, L. (1996) A specific beta 3-adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. *Eur J Pharmacol.*, **298**, 287-292.
- Avontuur, J. A., Bruining, H. A. & Ince, C. (1995) Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ.Res.*, **76**, 418-425.
- Baba, T., Nakajima, S. & Yajima, Y. (1998) Beta3-adrenergic receptor gene polymorphism is not associated with hypertension in NIDDM patients without nephropathy. *Horm.Metab Res.*, **30**, 629-632.
- Bachetti, T., Comini, L., Curello, S., Bastianon, D., Palmieri, M., Bresciani, G., Callea, F. & Ferrari, R. (2004) Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **37**, 939-945.
- Baker, C. C., Chaudry, I. H., Gaines, H. O. & Baue, A. E. (1983) Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery*, **94**, 331-335.
- Baker, J. G. (2005) Evidence for a secondary state of the human beta3-adrenoceptor. *Mol.Pharmacol.*, **68**, 1645-1655.
- Baldwin, A. S., Jr. (2001) Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J.Clin.Invest*, **107**, 3-6.
- Bannerman, D. D., Fitzpatrick, M. J., Anderson, D. Y., Bhattacharjee, A. K., Novitsky, T. J., Hasday, J. D., Cross, A. S. & Goldblum, S. E. (1998a) Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction. *Infect.Immun.*, **66**, 1400-1407.
- Bannerman, D. D., Sathyamoorthy, M. & Goldblum, S. E. (1998b) Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J.Biol.Chem.*, **273**, 35371-35380.
- Barbe, P., Millet, L., Galitzky, J., Lafontan, M. & Berlan, M. (1996) In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br.J Pharmacol.*, **117**, 907-913.
- Barthomeuf, C., Boivin, D. & Beliveau, R. (2004) Inhibition of HUVEC tubulogenesis by hederacolchiside-A1 is associated with plasma membrane cholesterol sequestration and activation of the Ha-Ras/MEK/ERK cascade. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, **54**, 432-440.

- Bateman, R. M., Sharpe, M. D. & Ellis, C. G. (2003) Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care*, **7**, 359-373.
- Beavo, J. A. (1995) cGMP inhibition of heart phosphodiesterase: is it clinically relevant? *J Clin. Invest*, **95**, 445.
- Begin-Heick, N. (1995) Beta 3-adrenergic activation of adenylyl cyclase in mouse white adipocytes: modulation by GTP and effect of obesity. *J Cell Biochem.*, **58**, 464-473.
- Behrends, M. & Peters, J. (2003) The calcium sensitizer levosimendan attenuates endotoxin-evoked myocardial dysfunction in isolated guinea pig hearts. *Intensive Care Med.*, **29**, 1802-1807.
- Bellon, G., Martiny, L. & Robinet, A. (2004) Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, **49**, 203-220.
- Benndorf, R., Boger, R. H., Ergun, S., Steenpass, A. & Wieland, T. (2003) Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circ.Res.*, **93**, 438-447.
- Bergers, G. & Benjamin, L. E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat.Rev.Cancer*, **3**, 401-410.
- Berkowitz, D. E., Brown, D., Lee, K. M., Emala, C., Palmer, D., An, Y. & Breslow, M. (1998) Endotoxin-induced alteration in the expression of leptin and beta3-adrenergic receptor in adipose tissue. *Am.J.Physiol*, **274**, E992-E997.
- Berlan, M., Galitzky, J., Bousquet-Melou, A., Lafontan, M. & Montastruc, J. L. (1994) Beta-3 adrenoceptor-mediated increase in cutaneous blood flow in the dog. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **268**, 1444-1451.
- Bernard, G. R., Wheeler, A. P., Russell, J. A., Schein, R., Summer, W. R., Steinberg, K. P., Fulkerson, W. J., Wright, P. E., Christman, B. W., Dupont, W. D., Higgins, S. B. & Swindell, B. B. (1997) The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N.Engl.J.Med.*, **336**, 912-918.
- Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J. S., Garber, G. E., Helterbrand, J. D., Ely, E. W. & Fisher, C. J., Jr. (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N.Engl.J.Med.*, **344**, 699-709.
- Bernardin, G., Kisoka, R. L., Delporte, C., Robberecht, P. & Vincent, J. L. (2003) Impairment of beta-adrenergic signaling in healthy peripheral blood mononuclear cells exposed to serum from patients with septic shock: involvement of the inhibitory pathway of adenylyl cyclase stimulation. *Shock*, **19**, 108-112.
- Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial Investigators. (2001) A trial of the beta-blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *N.Engl.J Med.*, **344**, 1659-1667.
- Bianchetti, A. & Manara, L. (1990) In vitro inhibition of intestinal motility by phenylethanolaminotetralines: evidence of atypical beta-adrenoceptors in rat colon. *Br.J Pharmacol.*, **100**, 831-839.
- Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. L., Vale, W. & Sawchenko, P. E. (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J.Comp Neurol.*, **319**, 218-245.
- Blaes, N. & Boissel, J. P. (1983) Growth-stimulating effect of catecholamines on rat aortic smooth muscle cells in culture. *J.Cell Physiol*, **116**, 167-172.
- Bleeke, T., Zhang, H., Madamanchi, N., Patterson, C. & Faber, J. E. (2004) Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. *Circ.Res.*, **94**, 37-45.
- Blin, N., Camoin, L., Maigret, B. & Strosberg, A. D. (1993) Structural and conformational features determining selective signal transduction in the beta 3-adrenergic receptor. *Mol.Pharmacol.*, **44**, 1094-1104.

- Bloch, W., Fleischmann, B. K., Lorke, D. E., Andressen, C., Hops, B., Hescheler, J. & Addicks, K. (1999) Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc.Res.*, **43**, 675-684.
- Bochkov, V. N., Kadl, A., Huber, J., Gruber, F., Binder, B. R. & Leitinger, N. (2002) Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature*, **419**, 77-81.
- Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. & O'Reilly, M. S. (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, **390**, 404-407.
- Bohuslav, J., Kravchenko, V. V., Parry, G. C., Erlich, J. H., Gerondakis, S., Mackman, N. & Ulevitch, R. J. (1998) Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J.Clin.Invest*, **102**, 1645-1652.
- Boillot, A., Massol, J., Maupoil, V., Grelier, R., Capellier, G., Berthelot, A. & Barale, F. (1996) Alterations of myocardial and vascular adrenergic receptor-mediated responses in Escherichia coli-induced septic shock in the rat. *Crit Care Med.*, **24**, 1373-1380.
- Boivin, B., Lavoie, C., Vaniotis, G., Baragli, A., Villeneuve, L. R., Ethier, N., Trieu, P., Allen, B. G. & Hebert, T. E. (2006) Functional beta-adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc.Res.*, **71**, 69-78.
- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. & Cohen, R. A. (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**, 850-853.
- Bond, M., Fabunmi, R. P., Baker, A. H. & Newby, A. C. (1998) Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.*, **435**, 29-34.
- Bone, R. C., Fisher, C. J., Jr., Clemmer, T. P., Slotman, G. J., Metz, C. A. & Balk, R. A. (1989) Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.*, **17**, 389-393.
- Bone, R. C., Sibbald, W. J. & Sprung, C. L. (1992) The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*, **101**, 1481-1483.
- Boonen, H. C., Daemen, M. J., Eerdmans, P. H., Fazzi, G. E., van Kleef, E. M., Schiffers, P. M. & De Mey, J. G. (1993) Mesenteric small artery changes after vasoconstrictor infusion in young rats. *J Cardiovasc.Pharmacol.*, **22**, 388-395.
- Booth, J. V., Landolfo, K. P., Chesnut, L. C., Bennett-Guerrero, E., Gerhardt, M. A., Atwell, D. M., el Moalem, H. E., Smith, M. S., Funk, B. L., Kuhn, C. M., Kwatra, M. M. & Schwinn, D. A. (1998) Acute depression of myocardial beta-adrenergic receptor signaling during cardiopulmonary bypass: impairment of the adenylyl cyclase moiety. Duke Heart Center Perioperative Desensitization Group. *Anesthesiology*, **89**, 602-611.
- Borkowski, K. R., Gros, R. & Schneider, H. (1992) Vascular beta-adrenoceptor-mediated responses in hypertension and ageing in rats. *J Auton.Pharmacol.*, **12**, 389-401.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W. & Tracey, K. J. (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, **405**, 458-462.
- Bosch, R. F., Schneck, A. C., Kiehn, J., Zhang, W., Hambrook, A., Eigenberger, B. W., Rub, N., Gogel, J., Mewis, C., Seipel, L. & Kuhlkamp, V. (2002) beta3-Adrenergic regulation of an ion channel in the heart-inhibition of the slow delayed rectifier potassium current I(Ks) in guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res.*, **56**, 393-403.
- Boulos, M., Astiz, M. E., Barua, R. S. & Osman, M. (2003) Impaired mitochondrial function induced by serum from septic shock patients is attenuated by inhibition of nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) synthase. *Crit Care Med.*, **31**, 353-358.

- Bowles, N. E., Wang, Q. & Towbin, J. A. (1997) Prospects for adenovirus-mediated gene therapy of inherited diseases of the myocardium. *Cardiovasc.Res.*, **35**, 422-430.
- Boyle, E. M., Jr., Kovacich, J. C., Cauty, T. G., Jr., Morgan, E. N., Chi, E., Verrier, E. D. & Pohlman, T. H. (1998) Inhibition of nuclear factor-kappa B nuclear localization reduces human E-selectin expression and the systemic inflammatory response. *Circulation*, **98**, II282-II288.
- Boyle, W. A., III, Parvathaneni, L. S., Bourlier, V., Sauter, C., Laubach, V. E. & Cobb, J. P. (2000) iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice. *Circ.Res.*, **87**, E18-E24.
- Brackett, D. J., Hamburger, S. A., Lerner, M. R., Jones, S. B., Schaefer, C. F., Henry, D. P. & Wilson, M. F. (1990) An assessment of plasma histamine concentrations during documented endotoxic shock. *Agents Actions*, **31**, 263-274.
- Brahmadevara, N., Shaw, A. M. & MacDonald, A. (2003) Evidence against beta 3-adrenoceptors or low affinity state of beta 1-adrenoceptors mediating relaxation in rat isolated aorta. *Br.J Pharmacol.*, **138**, 99-106.
- Brahmadevara, N., Shaw, A. M. & MacDonald, A. (2004) ALpha1-adrenoceptor antagonist properties of CGP 12177A and other beta-adrenoceptor ligands: evidence against beta(3)- or atypical beta-adrenoceptors in rat aorta. *Br.J.Pharmacol.*, **142**, 781-787.
- Brawley, L., Shaw, A. M. & MacDonald, A. (2000) Role of endothelium/nitric oxide in atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Eur J Pharmacol.*, **398**, 285-296.
- Brayden, J. E. (2002) Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, **29**, 312-316.
- Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N. A., Cooper, C. E. & Singer, M. (2002) Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*, **360**, 219-223.
- Brehm, B. R., Wolf, S. C., Bertsch, D., Klaussner, M., Wesselborg, S., Schuler, S. & Schulze-Osthoff, K. (2001) Effects of nebivolol on proliferation and apoptosis of human coronary artery smooth muscle and endothelial cells. *Cardiovasc.Res.*, **49**, 430-439.
- Breitwieser, G. E. (2004) G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ.Res.*, **94**, 17-27.
- Brew, K., Dinakarpanian, D. & Nagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim.Biophys.Acta*, **1477**, 267-283.
- Briones, A. M., Daly, C. J., Jimenez-Altayo, F., Martinez-Revelles, S., Gonzalez, J. M., McGrath, J. C. & Vila, E. (2005) Direct demonstration of beta(1)- and evidence against beta(2)- and beta(3)-adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *Br.J Pharmacol.*
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., Jamieson, S. & . (1986) Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ.Res.*, **59**, 297-309.
- Brixius, K., Bundkirchen, A., Bolck, B., Mehlhorn, U. & Schwinger, R. H. (2001) Nebivolol, bucindolol, metoprolol and carvedilol are devoid of intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium. *Br.J.Pharmacol.*, **133**, 1330-1338.
- Brixius, K., Bloch, W., Pott, C., Napp, A., Krahwinkel, A., Ziskoven, C., Koriller, M., Mehlhorn, U., Hescheler, J., Fleischmann, B. & Schwinger, R. H. (2004) Mechanisms of beta 3-adrenoceptor-induced eNOS activation in right atrial and left ventricular human myocardium. *Br.J.Pharmacol.*, **143**, 1014-1022.

- Brixius, K., Song, Q., Malick, A., Boelck, B., Addicks, K., Bloch, W., Mehlhorn, U. & Schwinger, R. H. (2006) ENOS is not activated by nebivolol in human failing myocardium. *Life Sci.*
- Broeders, M. A., Doevendans, P. A., Bekkers, B. C., Bronsauer, R., van Gorsel, E., Heemskerk, J. W., Egbrink, M. G., van Breda, E., Reneman, R. S. & van Der, Z. R. (2000) Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation*, **102**, 677-684.
- Brouet, A., Sonveaux, P., Dessy, C., Moniotte, S., Balligand, J. L. & Feron, O. (2001) Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ.Res.*, **89**, 866-873.
- Brouty-Boye, D. & Zetter, B. R. (1980) Inhibition of cell motility by interferon. *Science*, **208**, 516-518.
- Brun-Buisson, C., Doyon, F., Carlet, J., Dellamonica, P., Gouin, F., Lepoutre, A., Mercier, J. C., Offenstadt, G. & Regnier, B. (1995) Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA*, **274**, 968-974.
- Brun-Buisson, C., Roudot-Thoraval, F., Girou, E., Grenier-Sennelier, C. & Durand-Zaleski, I. (2003) The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Med.*, **29**, 1464-1471.
- Brun-Buisson, C., Meshaka, P., Pinton, P. & Vallet, B. (2004) EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.*, **30**, 580-588.
- Bryan, R. M., Jr., You, J., Golding, E. M. & Marrelli, S. P. (2005) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology*, **102**, 1261-1277.
- Buettner, R., Schaffler, A., Arndt, H., Rogler, G., Nusser, J., Zietz, B., Enger, I., Hugl, S., Cuk, A., Scholmerich, J. & Palitzsch, K. D. (1998) The Trp64Arg polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene is not associated with obesity or type 2 diabetes mellitus in a large population-based Caucasian cohort. *J Clin.Endocrinol.Metab*, **83**, 2892-2897.
- Bundkirchen, A., Brixius, K., Bolck, B., Mehlhorn, U., Bloch, W. & Schwinger, R. H. (2001) Nebivolol, carvedilol and metoprolol do not influence cardiac Ca(2+) sensitivity. *Eur.J.Pharmacol.*, **422**, 175-180.
- Bundkirchen, A., Nguyen, Q., Brixius, K., Bolck, B., Mehlhorn, U. & Schwinger, R. H. (2003) Lack of inverse agonistic activity of nebivolol, its D- and L-enantiomers and of in vivo metabolized nebivolol in human myocardium. *Eur.J.Pharmacol.*, **476**, 97-105.
- Byrne, J. J. (1966) Shock. *N.Engl.J.Med.*, **275**, 543-546.
- Caamano, J. & Hunter, C. A. (2002) NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin.Microbiol.Rev.*, **15**, 414-429.
- Campbell, D. L., Stamler, J. S. & Strauss, H. C. (1996) Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen.Physiol*, **108**, 277-293.
- Candelore, M. R., Deng, L., Tota, L., Guan, X. M., Amend, A., Liu, Y., Newbold, R., Cascieri, M. A. & Weber, A. E. (1999) Potent and selective human beta(3)-adrenergic receptor antagonists. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **290**, 649-655.
- Caramelo, C., Okada, K., Tsai, P., Linas, S. L. & Schrier, R. W. (1990) Interaction of arginine vasopressin and angiotensin II on Ca2+ in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.*, **38**, 47-54.
- Carmeliet, P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat.Med.*, **6**, 389-395.
- Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat.Med.*, **9**, 653-660.

- Carmeliet, P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, **438**, 932-936.
- Caroff, M. & Karibian, D. (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr.Res.*, **338**, 2431-2447.
- Carpene, C., Castan, I., Collon, P., Galitzky, J., Moratinos, J. & Lafontan, M. (1994) Adrenergic lipolysis in guinea pig is not a beta 3-adrenergic response: comparison with human adipocytes. *Am.J.Physiol*, **266**, R905-R913.
- Carrel, T., Kujawski, T., Zund, G., Schwitter, J., Amann, F. W., Gallino, A., Bertel, O., Jenni, R. & Turina, M. (1995) The internal mammary artery malperfusion syndrome: incidence, treatment and angiographic verification. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.*, **9**, 190-195.
- Carvalho, M. H., Scivoletto, R., Fortes, Z. B., Nigro, D. & Cordellini, S. (1987) Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. *J Hypertens.*, **5**, 377-382.
- Catania, A., Delgado, R., Airaghi, L., Cutuli, M., Garofalo, L., Carlin, A., Demitri, M. T. & Lipton, J. M. (1999) alpha-MSH in systemic inflammation. Central and peripheral actions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **885**, 183-187.
- Cavaillon, J. M., Munoz, C., Fitting, C., Misset, B. & Carlet, J. (1992) Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ.Shock*, **38**, 145-152.
- Cavaillon, J. M., Adib-Conquy, M., Fitting, C., Adrie, C. & Payen, D. (2003) Cytokine cascade in sepsis. *Scand.J.Infect.Dis.*, **35**, 535-544.
- Cebe-Suarez, S., Zehnder-Fjallman, A. & Ballmer-Hofer, K. (2006) The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol.Life Sci.*, **63**, 601-615.
- Cerwinka, W. H., Cooper, D., Kriegstein, C. F., Ross, C. R., McCord, J. M. & Granger, D. N. (2003) Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, **284**, H535-H541.
- Chakir, K., Xiang, Y., Yang, D., Zhang, S. J., Cheng, H., Kobilka, B. K. & Xiao, R. P. (2003) The third intracellular loop and the carboxyl terminus of beta2-adrenergic receptor confer spontaneous activity of the receptor. *Mol.Pharmacol.*, **64**, 1048-1058.
- Chakroborty, D., Sarkar, C., Mitra, R. B., Banerjee, S., Dasgupta, P. S. & Basu, S. (2004) Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clin.Cancer Res.*, **10**, 4349-4356.
- Chalothorn, D., Zhang, H., Clayton, J. A., Thomas, S. A. & Faber, J. E. (2005) Catecholamines augment collateral vessel growth and angiogenesis in hindlimb ischemia. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, **289**, H947-H959.
- Chamberlain, P. D., Jennings, K. H., Paul, F., Cordell, J., Berry, A., Holmes, S. D., Park, J., Chambers, J., Sennitt, M. V., Stock, M. J., Cawthorne, M. A., Young, P. W. & Murphy, G. J. (1999) The tissue distribution of the human beta3-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the beta3-adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, **23**, 1057-1065.
- Chandrasekar, B., Marelli-Berg, F. M., Tone, M., Bysani, S., Prabhu, S. D. & Murray, D. R. (2004) Beta-adrenergic stimulation induces interleukin-18 expression via beta2-AR, PI3K, Akt, IKK, and NF-kappaB. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **319**, 304-311.
- Chantrain, C. & DeClerk, Y.A. (2002) Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Med. Sci. (Paris)*, **18**, 565-575.
- Chaudhry, A., MacKenzie, R. G., Georgic, L. M. & Granneman, J. G. (1994) Differential interaction of beta 1- and beta 3-adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes. *Cell Signal.*, **6**, 457-465.

- Chen, F. E. & Ghosh, G. (1999) Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene*, **18**, 6845-6852.
- Chen, J., Radford, M. J., Wang, Y., Marciniak, T. A. & Krumholz, H. M. (2000) Are beta-blockers effective in elderly patients who undergo coronary revascularization after acute myocardial infarction? *Arch.Intern.Med.*, **160**, 947-952.
- Chen, L., Xin, X., Eckhart, A. D., Yang, N. & Faber, J. E. (1995) Regulation of vascular smooth muscle growth by alpha 1-adrenoreceptor subtypes in vitro and in situ. *J.Biol.Chem.*, **270**, 30980-30988.
- Cheng, H. J., Zhang, Z. S., Onishi, K., Ukai, T., Sane, D. C. & Cheng, C. P. (2001) Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ.Res.*, **89**, 599-606.
- Chlopicki, S., Kozlovski, V. I. & Gryglewski, R. J. (2002) No-dependent vasodilation induced by nebivolol in coronary circulation is not mediated by beta-adrenoceptors or by 5 HT1A-receptors. *J.Physiol Pharmacol.*, **53**, 615-624.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, **162**, 156-159.
- Chrousos, G. P. (2000) The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector Lecture. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **917**, 38-67.
- Chruscinski, A., Brede, M. E., Meinel, L., Lohse, M. J., Kobilka, B. K. & Hein, L. (2001) Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Mol.Pharmacol.*, **60**, 955-962.
- Chu, W. M., Ostertag, D., Li, Z. W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault, J. & Karin, M. (1999) JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*, **11**, 721-731.
- Cirino, G., Sorrentino, R., di Villa, B. R., Popolo, A., Palmieri, A., Imbimbo, C., Fusco, F., Longo, N., Tajana, G., Ignarro, L. J. & Mirone, V. (2003) Involvement of beta 3-adrenergic receptor activation via cyclic GMP- but not NO-dependent mechanisms in human corpus cavernosum function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **100**, 5531-5536.
- Claesson-Welsh, L., Welsh, M., Ito, N., Anand-Apte, B., Soker, S., Zetter, B., O'Reilly, M. & Folkman, J. (1998) Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95**, 5579-5583.
- Clark, B. J. & Bertholet, A. (1983) Effects of pindolol on vascular smooth muscle. *Gen.Pharmacol.*, **14**, 117-119.
- Clement, K., Vaisse, C., Manning, B. S., Basdevant, A., Guy-Grand, B., Ruiz, J., Silver, K. D., Shuldiner, A. R., Froguel, P. & Strosberg, A. D. (1995) Genetic variation in the beta 3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N.Engl.J Med.*, **333**, 352-354.
- Cobb, J. P. (2001) Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: a decade of promise. *Surg.Infect.(Larchmt.)*, **2**, 93-100.
- Cockcroft, J. R., Chowienczyk, P. J., Brett, S. E., Chen, C. P., Dupont, A. G., Van Nueten, L., Wooding, S. J. & Ritter, J. M. (1995) Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **274**, 1067-1071.
- Cohen, M. L., Bloomquist, W., Kriauciunas, A., Shuker, A. & Calligaro, D. (1999) Aryl propanolamines: comparison of activity at human beta3 receptors, rat beta3 receptors and rat atrial receptors mediating tachycardia. *Br.J Pharmacol.*, **126**, 1018-1024.

- Cohen, R. I., Wilson, D. & Liu, S. F. (2006) Nitric oxide modifies the sarcoplasmic reticular calcium release channel in endotoxemia by both guanosine-3',5' (cyclic) phosphate-dependent and independent pathways. *Crit Care Med.*, **34**, 173-181.
- Cohn, J. N., Archibald, D. G., Ziesche, S., Franciosa, J. A., Harston, W. E., Tristani, F. E., Dunkman, W. B., Jacobs, W., Francis, G. S., Flohr, K. H. & . (1986) Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N.Engl.J.Med.*, **314**, 1547-1552.
- Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D. & Maniatis, T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.*, **9**, 899-909.
- Connelly, L., Madhani, M. & Hobbs, A. J. (2005) Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo. *J.Biol.Chem.*, **280**, 10040-10046.
- Cooke, J. P. (2003) NO and angiogenesis. *Atheroscler.Suppl*, **4**, 53-60.
- Corella, D., Guillen, M., Portoles, O., Sorli, J. V., Alonso, V., Folch, J. & Saiz, C. (2001) Gender specific associations of the Trp64Arg mutation in the beta3-adrenergic receptor gene with obesity-related phenotypes in a Mediterranean population: interaction with a common lipoprotein lipase gene variation. *J Intern.Med.*, **250**, 348-360.
- Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Roby, J. D., Parks, W. C. & Welgus, H. G. (1995) Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. *J.Invest Dermatol.*, **105**, 170-176.
- Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Harding, E., Bolanowski, M., Welgus, H. G., Kobayashi, D. K., Pierce, R. A. & Shapiro, S. D. (1998) Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J.Immunol.*, **161**, 6845-6852.
- Cosby, K., Partovi, K. S., Crawford, J. H., Patel, R. P., Reiter, C. D., Martyr, S., Yang, B. K., Waclawiw, M. A., Zalos, G., Xu, X., Huang, K. T., Shields, H., Kim-Shapiro, D. B., Schechter, A. N., Cannon, R. O., III & Gladwin, M. T. (2003) Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat.Med.*, **9**, 1498-1505.
- Cosentino, F., Bonetti, S., Rehorik, R., Eto, M., Werner-Felmayer, G., Volpe, M. & Luscher, T. F. (2002) Nitric-oxide-mediated relaxations in salt-induced hypertension: effect of chronic beta1 -selective receptor blockade. *J.Hypertens.*, **20**, 421-428.
- Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T. & Claesson-Welsh, L. (2003) VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem.Sci.*, **28**, 488-494.
- Cuda, G., Paterno, R., Ceravolo, R., Candigliota, M., Perrotti, N., Perticone, F., Faniello, M. C., Schepis, F., Ruocco, A., Mele, E., Cassano, S., Bifulco, M., Santillo, M. & Avvedimento, E. V. (2002) Protection of human endothelial cells from oxidative stress: role of Ras-ERK1/2 signaling. *Circulation*, **105**, 968-974.
- Cummings, C. J., Sessler, C. N., Beall, L. D., Fisher, B. J., Best, A. M. & Fowler, A. A., III (1997) Soluble E-selectin levels in sepsis and critical illness. Correlation with infection and hemodynamic dysfunction. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **156**, 431-437.
- Cunnon, R. E., Schaer, G. L., Parker, M. M., Natanson, C. & Parrillo, J. E. (1986) The coronary circulation in human septic shock. *Circulation*, **73**, 637-644.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Di Paola, R., Esposito, E., Macarthur, H., Matuschak, G. M. & Salvemini, D. (2006) A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin induced shock. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*.

- Czuriga, I., Riecanaky, I., Bodnar, J., Fulop, T., Kruzsicz, V., Kristof, E., Edes, I. & For The NEBIS Investigators (2003) Comparison of the new cardioselective beta-blocker nebivolol with bisoprolol in hypertension: the Nebivolol, Bisoprolol Multicenter Study (NEBIS). *Cardiovasc.Drugs Ther.*, **17**, 257-263.
- d'Emmanuele di Villa Bianca,R., Lippolis, L., Autore, G., Popolo, A., Marzocco, S., Sorrentino, L., Pinto, A. & Sorrentino, R. (2003) Dexamethasone improves vascular hyporeactivity induced by LPS in vivo by modulating ATP-sensitive potassium channels activity. *Br.J.Pharmacol.*, **140**, 91-96.
- Dahlback, B. & Villoutreix, B. O. (2005) The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.*, **579**, 3310-3316.
- Damon, D. H. (2000) Adrenoceptor-mediated modulation of endothelial-dependent vascular smooth muscle growth. *J.Auton.Pharmacol.*, **20**, 47-54.
- Danos, O. (1999) Vectorologie : orientations et progrès récents. *Med. Sci. (Paris)*, **15**, 663-667.
- Dauphinee, S. M. & Karsan, A. (2006) Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*, **86**, 9-22.
- Davies, N. W. (1990) Modulation of ATP-sensitive K⁺ channels in skeletal muscle by intracellular protons. *Nature*, **343**, 375-377.
- Dayanir, V., Meyer, R. D., Lashkari, K. & Rahimi, N. (2001) Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. *J.Biol.Chem.*, **276**, 17686-17692.
- De Backer, D., Creteur, J., Preiser, J. C., Dubois, M. J. & Vincent, J. L. (2002) Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **166**, 98-104.
- De Backer, D., Creteur, J., Dubois, M. J., Sakr, Y., Koch, M., Verdant, C. & Vincent, J. L. (2006) The effects of dobutamine on microcirculatory alterations in patients with septic shock are independent of its systemic effects. *Crit Care Med.*, **34**, 403-408.
- de Champlain, J. (2001) Do most antihypertensive agents have a sympatholytic action? *Curr.Hypertens.Rep.*, **3**, 305-313.
- de Groot, A. A., Mathy, M. J., van Zwieten, P. A. & Peters, S. L. (2003) Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. *J Cardiovasc.Pharmacol.*, **42**, 232-236.
- De Mey, J. G. & Vanhoutte, P. M. (1982) Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ.Res.*, **51**, 439-447.
- De Ponti, F., Gibelli, G., Croci, T., Arcidiaco, M., Crema, F. & Manara, L. (1996) Functional evidence of atypical beta 3-adrenoceptors in the human colon using the beta 3-selective adrenoceptor antagonist, SR 59230A. *Br.J Pharmacol.*, **117**, 1374-1376.
- Deans, K. J., Haley, M., Natanson, C., Eichacker, P. Q. & Minneci, P. C. (2005) Novel therapies for sepsis: a review. *J.Trauma*, **58**, 867-874.
- Delgado, M., Sun, W., Leceta, J. & Ganea, D. (1999) VIP and PACAP differentially regulate the costimulatory activity of resting and activated macrophages through the modulation of B7.1 and B7.2 expression. *J.Immunol.*, **163**, 4213-4223.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y. & Karin, M. (1999) Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science*, **284**, 309-313.
- Dennedy, M. C., Houlihan, D. D., McMillan, H. & Morrison, J. J. (2002) Beta2- and beta3-adrenoreceptor agonists: human myometrial selectivity and effects on umbilical artery tone. *Am.J Obstet.Gynecol.*, **187**, 641-647.

- Derfalvi, B., Igaz, P., Fulop, K. A., Szalai, C. & Falus, A. (2000) Interleukin-6-induced production of type II acute phase proteins and expression of junB gene are downregulated by human recombinant growth hormone in vitro. *Cell Biol.Int.*, **24**, 109-114.
- Dessy, C., Moniotte, S., Ghisdal, P., Havaux, X., Noirhomme, P. & Balligand, J. L. (2004) Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation*, **110**, 948-954.
- Dessy, C., Saliez, J., Ghisdal, P., Daneau, G., Lobysheva, I. I., Frerart, F., Belge, C., Jnaoui, K., Noirhomme, P., Feron, O. & Balligand, J. L. (2005) Endothelial beta3-adrenoceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation beta-blocker nebivolol. *Circulation*, **112**, 1198-1205.
- Dhainaut, J. F., Huyghebaert, M. F., Monsallier, J. F., Lefevre, G., Dall'Ava-Santucci, J., Brunet, F., Villemant, D., Carli, A. & Raichvarg, D. (1987) Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation*, **75**, 533-541.
- Dhainaut, J. F., Pinsky, M. R., Nouria, S., Slomka, F. & Brunet, F. (1997) Right ventricular function in human sepsis: a thermodilution study. *Chest*, **112**, 1043-1049.
- Dimmeler, S., Hermann, C., Galle, J. & Zeiher, A. M. (1999a) Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **19**, 656-664.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. & Zeiher, A. M. (1999b) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**, 601-605.
- Dincer, U. D., Bidasee, K. R., Guner, S., Tay, A., Ozcelikay, A. T. & Altan, V. M. (2001) The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoceptors in rat hearts. *Diabetes*, **50**, 455-461.
- Distler, J. H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R. E., Gay, S. & Distler, O. (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q.J.Nucl.Med.*, **47**, 149-161.
- Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E. & . (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, **321**, 75-79.
- Doggrell, S. A. & Surman, A. J. (1995) Loss of maximum attenuation and receptor reserve for isoprenaline at the beta 2-adrenoceptors of the portal veins of hypertensive rats. *J Hypertens.*, **13**, 1023-1029.
- Doherty, M. J. & Canfield, A. E. (1999) Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.*, **9**, 1-17.
- Dolan, J. A., Muenkel, H. A., Burns, M. G., Pellegrino, S. M., Fraser, C. M., Pietri, F., Strosberg, A. D., Largis, E. E., Dutia, M. D., Bloom, J. D. & . (1994) Beta-3 adrenoceptor selectivity of the dioxolane dicarboxylate phenethanolamines. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **269**, 1000-1006.
- Domanski, M. J., Krause-Steinrauf, H., Massie, B. M., Deedwania, P., Follmann, D., Kovar, D., Murray, D., Oren, R., Rosenberg, Y., Young, J., Zile, M. & Eichhorn, E. (2003) A comparative analysis of the results from 4 trials of beta-blocker therapy for heart failure: BEST, CIBIS-II, MERIT-HF, and COPERNICUS. *J.Card Fail.*, **9**, 354-363.
- Donaldson, L. L. & Myers, A. K. (1996) Effect of pharmacological agonists on contractile responses in aortic rings derived from endotoxaemic rats. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, **19**, 389-396.
- Donckier, J. E., Massart, P. E., Van Mechelen, H., Heyndrickx, G. R., Gauthier, C. & Balligand, J. L. (2001) Cardiovascular effects of beta 3-adrenoceptor stimulation in perinephritic hypertension. *Eur J Clin.Invest*, **31**, 681-689.

- Dong, Z., Greene, G., Pettaway, C., Dinney, C. P., Eue, I., Lu, W., Bucana, C. D., Balbay, M. D., Bielenberg, D. & Fidler, I. J. (1999) Suppression of angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis by human prostate cancer cells engineered to produce interferon-beta. *Cancer Res.*, **59**, 872-879.
- Dubois, M. J., De Backer, D., Creteur, J., Anane, S. & Vincent, J. L. (2003) Effect of vasopressin on sublingual microcirculation in a patient with distributive shock. *Intensive Care Med.*, **29**, 1020-1023.
- Duda, D. G., Sunamura, M., Lozonschi, L., Kodama, T., Egawa, S., Matsumoto, G., Shimamura, H., Shibuya, K., Takeda, K. & Matsuno, S. (2000) Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res.*, **60**, 1111-1116.
- Dulak, J., Jozkowicz, A., Dembinska-Kiec, A., Guevara, I., Zdzienicka, A., Zmudzinska-Grochot, D., Florek, I., Wojtowicz, A., Szuba, A. & Cooke, J. P. (2000) Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **20**, 659-666.
- Dumas, J. P., Goirand, F., Bardou, M., Dumas, M., Rochette, L., Advenier, C. & Giudicelli, J. F. (1999) Role of potassium channels and nitric oxide in the relaxant effects elicited by beta-adrenoceptor agonists on hypoxic vasoconstriction in the isolated perfused lung of the rat. *Br.J Pharmacol.*, **127**, 421-428.
- Dumas, M., Dumas, J. P., Bardou, M., Rochette, L., Advenier, C. & Giudicelli, J. F. (1998) Influence of beta-adrenoceptor agonists on the pulmonary circulation. Effects of a beta3-adrenoceptor antagonist, SR 59230A. *Eur J Pharmacol.*, **348**, 223-228.
- Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M. & Dvorak, A. M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am.J.Pathol.*, **146**, 1029-1039.
- Edvinsson, L. & Owman, C. (1974) Pharmacological characterization of adrenergic alpha and beta receptors mediating the vasomotor responses of cerebral arteries in vitro. *Circ.Res.*, **35**, 835-849.
- El Armouche, A., Zolk, O., Rau, T. & Eschenhagen, T. (2003) Inhibitory G-proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure. *Cardiovasc.Res.*, **60**, 478-487.
- Ellrodt, A. G., Riedinger, M. S., Kimchi, A., Berman, D. S., Maddahi, J., Swan, H. J. & Murata, G. H. (1985) Left ventricular performance in septic shock: reversible segmental and global abnormalities. *Am.Heart J.*, **110**, 402-409.
- Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M. & Marumo, F. (1991) Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension*, **18**, 165-170.
- Emorine, L., Blin, N. & Strosberg, A. D. (1994) The human beta 3-adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol.Sci.*, **15**, 3-7.
- Emorine, L. J., Marullo, S., Briend-Sutren, M. M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C. & Strosberg, A. D. (1989) Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*, **245**, 1118-1121.
- Endo, K., Yanagi, H., Hirano, C., Hamaguchi, H., Tsuchiya, S. & Tomura, S. (2000) Association of Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene and no association of Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor gene in Japanese schoolchildren with obesity. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, **24**, 443-449.
- Engelhardt, S., Grimmer, Y., Fan, G. H. & Lohse, M. J. (2001) Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol.Pharmacol.*, **60**, 712-717.
- Engelhardt, S., Hein, L., Keller, U., Klambt, K. & Lohse, M. J. (2002) Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ.Res.*, **90**, 814-819.

- Enkhbaatar, P., Murakami, K., Traber, L. D., Cox, R., Parkinson, J. F., Westphal, M., Esechie, A., Morita, N., Maybauer, M. O., Maybauer, D. M., Burke, A. S., Schmalstieg, F. C., Hawkins, H. K., Herndon, D. N. & Traber, D. L. (2006) The inhibition of inducible nitric oxide synthase in ovine sepsis model. *Shock*, **25**, 522-527.
- Erami, C., Zhang, H., Ho, J. G., French, D. M. & Faber, J. E. (2002) Alpha(1)-adrenoceptor stimulation directly induces growth of vascular wall in vivo. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, **283**, H1577-H1587.
- Erhardt, E., Czako, M., Csernus, K., Molnar, D. & Kosztolanyi, G. (2005) The frequency of Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene in healthy and obese Hungarian children and its association with cardiovascular risk factors. *Eur J Clin.Nutr.*, **59**, 955-959.
- Errington, M. L. & Rocha e Silva (1972) Vasopressin clearance and secretion during haemorrhage in normal dogs and in dogs with experimental diabetes insipidus. *J.Physiol*, **227**, 395-418.
- Evans, B. A., Papaioannou, M., Hamilton, S. & Summers, R. J. (1999) Alternative splicing generates two isoforms of the beta3-adrenoceptor which are differentially expressed in mouse tissues. *Br.J Pharmacol.*, **127**, 1525-1531.
- Faber, J. E., Yang, N. & Xin, X. (2001) Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **298**, 441-452.
- Faivre, V., Kaskos, H., Callebort, J., Losser, M. R., Milliez, P., Bonnin, P., Payen, D. & Mebazaa, A. (2005) Cardiac and renal effects of levosimendan, arginine vasopressin, and norepinephrine in lipopolysaccharide-treated rabbits. *Anesthesiology*, **103**, 514-521.
- Fantuzzi, L., Puddu, P., Varano, B., Del Corno, M., Belardelli, F. & Gessani, S. (2000) IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages. *J.Leukoc.Biol.*, **68**, 707-714.
- Farmer, P. & Pugin, J. (2000) beta-adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, **279**, L675-L682.
- Fauvel, H., Marchetti, P., Chopin, C., Formstecher, P. & Neviere, R. (2001) Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, **280**, H1608-H1614.
- Fauvel, H., Marchetti, P., Obert, G., Joulain, O., Chopin, C., Formstecher, P. & Neviere, R. (2002) Protective effects of cyclosporin A from endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis in rats. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **165**, 449-455.
- Felbor, U., Dreier, L., Bryant, R. A., Ploegh, H. L., Olsen, B. R. & Mothes, W. (2000) Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J.*, **19**, 1187-1194.
- Feldman, R. D. (1987) Beta-adrenergic receptor alterations in hypertension--physiological and molecular correlates. *Can.J Physiol Pharmacol.*, **65**, 1666-1672.
- Feletou, M. & Vanhoutte, P. M. (2006) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **26**, 1215-1225.
- Fernandes, C. J., Jr., Akamine, N. & Knobel, E. (1999) Cardiac troponin: a new serum marker of myocardial injury in sepsis. *Intensive Care Med.*, **25**, 1165-1168.
- Fernandes, D., Silva-Santos, J. E., Duma, D., Villela, C. G., Barja-Fidalgo, C. & Assreuy, J. (2006) Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. *Mol.Pharmacol.*, **69**, 983-990.

- Feron, O., Dessy, C., Opel, D. J., Arstall, M. A., Kelly, R. A. & Michel, T. (1998) Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J.Biol.Chem.*, **273**, 30249-30254.
- Ferrara, N. & Alitalo, K. (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat.Med.*, **5**, 1359-1364.
- Ferrara, N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr.Rev.*, **25**, 581-611.
- Ferrara, N. & Kerbel, R. S. (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, **438**, 967-974.
- Ferro, A., Queen, L. R., Priest, R. M., Xu, B., Ritter, J. M., Poston, L. & Ward, J. P. (1999) Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br.J.Pharmacol.*, **126**, 1872-1880.
- Ferro, A., Coash, M., Yamamoto, T., Rob, J., Ji, Y. & Queen, L. (2004) Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br.J.Pharmacol.*, **143**, 397-403.
- Fink, M. (1997) Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol.Scand.Suppl*, **110**, 87-95.
- Fink, M. P. (1999) Modulating the L-arginine-nitric oxide pathway in septic shock: choosing the proper point of attack. *Crit Care Med.*, **27**, 2019-2022.
- Fink, M. P. (2003) Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr.Opin.Crit Care*, **9**, 143-151.
- Finkel, M. S., Oddis, C. V., Jacob, T. D., Watkins, S. C., Hattler, B. G. & Simmons, R. L. (1992) Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*, **257**, 387-389.
- Fischer, M. B., Prodeus, A. P., Nicholson-Weller, A., Ma, M., Murrow, J., Reid, R. R., Warren, H. B., Lage, A. L., Moore, F. D., Jr., Rosen, F. S. & Carroll, M. C. (1997) Increased susceptibility to endotoxin shock in complement C3- and C4-deficient mice is corrected by C1 inhibitor replacement. *J.Immunol.*, **159**, 976-982.
- Flamme, I., Frolich, T. & Risau, W. (1997) Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J.Cell Physiol*, **173**, 206-210.
- Flather, M. D., Shibata, M. C., Coats, A. J., Van Veldhuisen, D. J., Parkhomenko, A., Borbola, J., Cohen-Solal, A., Dumitrascu, D., Ferrari, R., Lechat, P., Soler-Soler, J., Tavazzi, L., Spinarova, L., Toman, J., Bohm, M., Anker, S. D., Thompson, S. G. & Poole-Wilson, P. A. (2005) Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J*, **26**, 215-225.
- Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E. & Busse, R. (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ.Res.*, **88**, E68-E75.
- Forrest, R. H. & Hickford, J. G. (2000) Rapid communication: nucleotide sequences of the bovine, caprine, and ovine beta3-adrenergic receptor genes. *J Anim Sci.*, **78**, 1397-1398.
- Fratta, P. A., Garbin, U., Nava, M. C., Stranieri, C., Davoli, A., Sawamura, T., Lo, C., V & Cominacini, L. (2005) Nebivolol decreases oxidative stress in essential hypertensive patients and increases nitric oxide by reducing its oxidative inactivation. *J.Hypertens.*, **23**, 589-596.
- Fredriksson, J. M., Lindquist, J. M., Bronnikov, G. E. & Nedergaard, J. (2000) Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta - adrenoceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. *J.Biol.Chem.*, **275**, 13802-13811.

- Friedman, M., Wang, S. Y., Stahl, G. L., Johnson, R. G. & Sellke, F. W. (1995) Altered beta-adrenergic and cholinergic pulmonary vascular responses after total cardiopulmonary bypass. *J.Appl.Physiol*, **79**, 1998-2006.
- Frielle, T., Collins, S., Daniel, K. W., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Kobilka, B. K. (1987) Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **84**, 7920-7924.
- Fujio, Y. & Walsh, K. (1999) Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J.Biol.Chem.*, **274**, 16349-16354.
- Fujisawa, T., Ikegami, H., Yamato, E., Hamada, Y., Kamide, K., Rakugi, H., Higaki, J., Murakami, H., Shimamoto, K. & Ogihara, T. (1997) Trp64Arg mutation of beta3-adrenergic receptor in essential hypertension: insulin resistance and the adrenergic system. *Am.J Hypertens.*, **10**, 101-105.
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L. & Jain, R. K. (2001) Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 2604-2609.
- Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-376.
- Galitzky, J., Reverte, M., Portillo, M., Carpeno, C., Lafontan, M. & Berlan, M. (1993) Coexistence of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenoceptors in dog fat cells and their differential activation by catecholamines. *Am.J Physiol*, **264**, E403-E412.
- Gallego, M., Espina, L. & Casis, O. (2002) Blood pressure responsiveness to sympathetic agonists in anaesthetised diabetic rats. *J Physiol Biochem.*, **58**, 87-93.
- Gao, Y. S., Nagao, T., Bond, R. A., Janssens, W. J. & Vanhoutte, P. M. (1991) Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **17**, 964-969.
- Gardiner, S. M., Kemp, P. A., March, J. E. & Bennett, T. (1995) Cardiac and regional haemodynamics, inducible nitric oxide synthase (NOS) activity, and the effects of NOS inhibitors in conscious, endotoxaemic rats. *Br.J.Pharmacol.*, **116**, 2005-2016.
- Gardiner, S. M., Kemp, P. A., March, J. E. & Bennett, T. (1999a) Regional haemodynamic responses to infusion of lipopolysaccharide in conscious rats: effects of pre- or post-treatment with glibenclamide. *Br.J.Pharmacol.*, **128**, 1772-1778.
- Gardiner, S. M., Kemp, P. A., March, J. E. & Bennett, T. (1999b) Influence of FR 167653, an inhibitor of TNF-alpha and IL-1, on the cardiovascular responses to chronic infusion of lipopolysaccharide in conscious rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **34**, 64-69.
- Gasparini, G., Longo, R., Toi, M. & Ferrara, N. (2005) Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat.Clin.Pract.Oncol.*, **2**, 562-577.
- Gaudino, M., Trani, C., Luciani, N., Alessandrini, F. & Possati, G. (1997) The internal mammary artery malperfusion syndrome: late angiographic verification. *Ann.Thorac.Surg.*, **63**, 1257-1261.
- Gauthier, C., Laurent, K., Charpentier, F., Drouin, E., Chevallier, J. C. & Le Marec, H. (1994) Endomyocardial biopsies: a new approach for studying the electrical and mechanical properties of human ventricular myocardium. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **26**, 1267-1271.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D. & Le Marec, H. (1996) Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin.Invest*, **98**, 556-562.
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J. N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J. L. & Le Marec, H. (1998) The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin.Invest*, **102**, 1377-1384.

- Gauthier, C., Tavernier, G., Trochu, J. N., Leblais, V., Laurent, K., Langin, D., Escande, D. & Le Marec, H. (1999) Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of beta(3)-adrenoceptor agonists. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **290**, 687-693.
- Gauthier, C., Langin, D. & Balligand, J. L. (2000) Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol.Sci.*, **21**, 426-431.
- Geisen, K., Vegh, A., Krause, E. & Papp, J. G. (1996) Cardiovascular effects of conventional sulfonylureas and glimepiride. *Horm.Metab Res.*, **28**, 496-507.
- Georgescu, A., Pluteanu, F., Flonta, M. L., Badila, E., Dorobantu, M. & Popov, D. (2005) The cellular mechanisms involved in the vasodilator effect of nebivolol on the renal artery. *Eur.J.Pharmacol.*, **508**, 159-166.
- Gerber, H. P., Dixit, V. & Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, **273**, 13313-13316.
- Gerhardt, C. C., Gros, J., Strosberg, A. D. & Issad, T. (1999) Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by human beta-3 adrenergic receptor: new pharmacological profile and mechanism of activation. *Mol.Pharmacol.*, **55**, 255-262.
- Germack, R. & Dickenson, J. M. (2005) Induction of {beta}3-adrenergic receptor functional expression following chronic stimulation with noradrenaline in neonatal rat cardiomyocytes. *J Pharmacol.Exp.Ther.* .
- Gibot, S., Levy, B., Neviere, R., Cariou, A. & Lesur, O. (2004) [Myocardial dysfunction and septic shock]. *Med.Sci.(Paris)*, **20**, 1115-1118.
- Gilmore, T. D. (1999) The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*, **18**, 6842-6844.
- Giordano, F. J., Gerber, H. P., Williams, S. P., VanBruggen, N., Bunting, S., Ruiz-Lozano, P., Gu, Y., Nath, A. K., Huang, Y., Hickey, R., Dalton, N., Peterson, K. L., Ross, J., Jr., Chien, K. R. & Ferrara, N. (2001) A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 5780-5785.
- Godin, P. J. & Buchman, T. G. (1996) Uncoupling of biological oscillators: a complementary hypothesis concerning the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.*, **24**, 1107-1116.
- Goldhaber, J. I., Kim, K. H., Natterson, P. D., Lawrence, T., Yang, P. & Weiss, J. N. (1996) Effects of TNF-alpha on [Ca2+]i and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am.J Physiol*, **271**, H1449-H1455.
- Goldman, D., Bateman, R. M. & Ellis, C. G. (2004) Effect of sepsis on skeletal muscle oxygen consumption and tissue oxygenation: interpreting capillary oxygen transport data using a mathematical model. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, **287**, H2535-H2544.
- Goldstein, M., Vincent, J. L., De Smet, J. M., Barvais, L., Van Nueten, L., Scheijgrond, H., d'Hollander, A., Leclerc, J. L. & Kahn, R. J. (1993) Administration of nebivolol after coronary artery bypass in patients with altered left ventricular function. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **22**, 253-258.
- Goligorsky, M. S., Li, H., Brodsky, S. & Chen, J. (2002) Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, **283**, F1-10.
- Goris, R. J., te Boekhorst, T. P., Nuytinck, J. K. & Gimbrere, J. S. (1985) Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch.Surg.*, **120**, 1109-1115.
- Gornikiewicz, A., Sautner, T., Brostjan, C., Schmierer, B., Fugger, R., Roth, E., Muhlbacher, F. & Bergmann, M. (2000) Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *FASEB J.*, **14**, 1093-1100.

- Gosgnach, W., Boixel, C., Nevo, N., Poiraud, T. & Michel, J. B. (2001) Nebivolol induces calcium-independent signaling in endothelial cells by a possible beta-adrenergic pathway. *J Cardiovasc.Pharmacol.*, **38**, 191-199.
- Graeve, L., Baumann, M. & Heinrich, P. C. (1993) Interleukin-6 in autoimmune disease. Role of IL-6 in physiology and pathology of the immune defense. *Clin.Investig.*, **71**, 664-671.
- Graier, W. F., Myers, P. R., Rubin, L. J., Adams, H. R. & Parker, J. L. (1994) Escherichia coli endotoxin inhibits agonist-mediated cytosolic Ca²⁺ mobilization and nitric oxide biosynthesis in cultured endothelial cells. *Circ.Res.*, **75**, 659-668.
- Grandel, U. & Grimminger, F. (2003) Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. *Crit Rev.Immunol.*, **23**, 267-299.
- Granneman, J. G., Lahners, K. N. & Rao, D. D. (1992) Rodent and human beta 3-adrenergic receptor genes contain an intron within the protein-coding block. *Mol.Pharmacol.*, **42**, 964-970.
- Granneman, J. G., Lahners, K. N. & Chaudhry, A. (1993) Characterization of the human beta 3-adrenergic receptor gene. *Mol.Pharmacol.*, **44**, 264-270.
- Granneman, J. G. & Lahners, K. N. (1994) Analysis of human and rodent beta 3-adrenergic receptor messenger ribonucleic acids. *Endocrinology*, **135**, 1025-1031.
- Granneman, J. G. (2001) The putative beta4-adrenergic receptor is a novel state of the beta1-adrenergic receptor. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, **280**, E199-E202.
- Grassme, H., Kirschnek, S., Riethmueller, J., Riehle, A., von Kurthy, G., Lang, F., Weller, M. & Gulbins, E. (2000) CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to Pseudomonas aeruginosa. *Science*, **290**, 527-530.
- Green, D. R. (1998) Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, **94**, 695-698.
- Grocott-Mason, R. M. & Shah, A. M. (1998) Cardiac dysfunction in sepsis: new theories and clinical implications. *Intensive Care Med.*, **24**, 286-295.
- Gross, W. L., Bak, M. I., Ingwall, J. S., Arstall, M. A., Smith, T. W., Balligand, J. L. & Kelly, R. A. (1996) Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 5604-5609.
- Grover, R., Zaccardelli, D., Colice, G., Guntupalli, K., Watson, D. & Vincent, J. L. (1999) An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. *Crit Care Med.*, **27**, 913-922.
- Grunstein, J., Masbad, J. J., Hickey, R., Giordano, F. & Johnson, R. S. (2000) Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 7282-7291.
- Guimaraes, S. & Moura, D. (1999) Advances in vascular neuroeffector mechanisms. *Trends Pharmacol.Sci.*, **20**, 90-93.
- Guimaraes, S. & Moura, D. (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol.Rev.*, **53**, 319-356.
- Gunnett, C. A., Chu, Y., Heistad, D. D., Loihl, A. & Faraci, F. M. (1998) Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. *Am.J.Physiol*, **275**, H416-H421.
- Hack, C. E. & Zeerleder, S. (2001) The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med.*, **29**, S21-S27.

- Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J. & Lefkowitz, R. J. (1998) A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95**, 8496-8501.
- Han, X., Fink, M. P., Yang, R. & Delude, R. L. (2004) Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock*, **21**, 261-270.
- Hanasaki, K., Yokota, Y., Ishizaki, J., Itoh, T. & Arita, H. (1997) Resistance to endotoxic shock in phospholipase A2 receptor-deficient mice. *J.Biol.Chem.*, **272**, 32792-32797.
- Hao, K., Peng, S., Xing, H., Yu, Y., Huang, A., Hong, X., Wang, Y., Chen, C., Wang, B., Zhang, X., Liu, J., Zhu, G., Huo, Y., Chen, D., Zhao, X., Ronnenberg, A., Wu, D., Niu, T. & Xu, X. (2004) beta(3) Adrenergic receptor polymorphism and obesity-related phenotypes in hypertensive patients. *Obes.Res.*, **12**, 125-130.
- Harris, A., Chung, H. S., Ciulla, T. A. & Kagemann, L. (1999) Progress in measurement of ocular blood flow and relevance to our understanding of glaucoma and age-related macular degeneration. *Prog.Retin.Eye Res.*, **18**, 669-687.
- Hauser, I. A., Johnson, D. R. & Madri, J. A. (1993) Differential induction of VCAM-1 on human iliac venous and arterial endothelial cells and its role in adhesion. *J.Immunol.*, **151**, 5172-5185.
- He, G. W., Buxton, B., Rosenfeldt, F. L., Wilson, A. C. & Angus, J. A. (1989) Weak beta-adrenoceptor-mediated relaxation in the human internal mammary artery. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, **97**, 259-266.
- He, G. W., Shaw, J., Hughes, C. F., Yang, C. Q., Thomson, D. S., McCaughan, B., Hendle, P. N. & Baird, D. K. (1993) Predominant alpha 1-adrenoceptor-mediated contraction in the human internal mammary artery. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **21**, 256-263.
- He, G. W., Acuff, T. E., Yang, C. Q., Ryan, W. H. & Mack, M. J. (1994) Middle and proximal sections of the human internal mammary artery are not "passive conduits". *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, **108**, 741-746.
- Heesen, B. J., Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. (1994) Sepsis decreases phenylephrine- and KCl-induced aortic ring contraction and decreases the frequency of oscillations in active wall tension. *Shock*, **2**, 106-112.
- Heinl-Green, A., Radke, P. W., Munkonge, F. M., Frass, O., Zhu, J., Vincent, K., Geddes, D. M. & Alton, E. W. (2005) The efficacy of a 'master switch gene' HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *Eur.Heart J.*, **26**, 1327-1332.
- Henry, T. D., Annex, B. H., McKendall, G. R., Azrin, M. A., Lopez, J. J., Giordano, F. J., Shah, P. K., Willerson, J. T., Benza, R. L., Berman, D. S., Gibson, C. M., Bajamonde, A., Rundle, A. C., Fine, J. & McCluskey, E. R. (2003) The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, **107**, 1359-1365.
- Herndon, D. N., Hart, D. W., Wolf, S. E., Chinkes, D. L. & Wolfe, R. R. (2001) Reversal of catabolism by beta-blockade after severe burns. *N.Engl.J.Med.*, **345**, 1223-1229.
- Hjorth, S. A., Orskov, C. & Schwartz, T. W. (1998) Constitutive activity of glucagon receptor mutants. *Mol.Endocrinol.*, **12**, 78-86.
- Hobbs, A. J. & Ignarro, L. J. (1996) Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol.*, **269**, 134-148.
- Hofstetter, C., Flondor, M., Boost, K. A., Koehler, P., Bosmann, M., Pfeilschifter, J., Zwissler, B. & Muhl, H. (2005) A brief exposure to isoflurane (50 s) significantly impacts on plasma cytokine levels in endotoxemic rats. *Int.Immunopharmacol.*, **5**, 1519-1522.
- Hollenberg, S. M., Cunnion, R. E. & Zimmerberg, J. (1993) Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats. *Am.J.Physiol*, **264**, H660-H663.

- Hollenberg, S. M., Piotrowski, M. J. & Parrillo, J. E. (1997) Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to endothelin-1 in septic rats. *Am.J.Physiol*, **272**, R969-R974.
- Hollenberg, S. M., Broussard, M., Osman, J. & Parrillo, J. E. (2000) Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circ.Res.*, **86**, 774-778.
- Holmes, C. L., Landry, D. W. & Granton, J. T. (2004) Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. *Crit Care*, **8**, 15-23.
- Holmes, C. L. (2005) Vasoactive drugs in the intensive care unit. *Curr.Opin.Crit Care*, **11**, 413-417.
- Hood, J. D., Meininger, C. J., Ziche, M. & Granger, H. J. (1998) VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am.J.Physiol*, **274**, H1054-H1058.
- Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N.Engl.J.Med.*, **348**, 138-150.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. & Karin, M. (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science*, **284**, 316-320.
- Huang, K., Fishwild, D. M., Wu, H. M. & Dedrick, R. L. (1995) Lipopolysaccharide-induced E-selectin expression requires continuous presence of LPS and is inhibited by bactericidal/permeability-increasing protein. *Inflammation*, **19**, 389-404.
- Huang, L. E., Willmore, W. G., Gu, J., Goldberg, M. A. & Bunn, H. F. (1999) Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J.Biol.Chem.*, **274**, 9038-9044.
- Hudlicka, O. (1998) Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation.*, **5**, 5-23.
- Hussain, M. B. & Marshall, I. (1997) Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br.J.Pharmacol.*, **122**, 849-858.
- Hutchinson, D. S., Bengtsson, T., Evans, B. A. & Summers, R. J. (2002) Mouse beta 3a- and beta 3b-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells display identical pharmacology but utilize distinct signalling pathways. *Br.J Pharmacol.*, **135**, 1903-1914.
- Hutchinson, D. S., Sato, M., Evans, B. A., Christopoulos, A. & Summers, R. J. (2005) Evidence for pleiotropic signaling at the mouse beta3-adrenoceptor revealed by SR59230A [3-(2-Ethylphenoxy)-1-[(1,S)-1,2,3,4-tetrahydronaph-1-ylamino]-2S-2-propa nol oxalate]. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **312**, 1064-1074.
- Iaccarino, G., Cipolletta, E., Fiorillo, A., Anneschiarico, M., Ciccarelli, M., Cimini, V., Koch, W. J. & Trimarco, B. (2002) Beta(2)-adrenergic receptor gene delivery to the endothelium corrects impaired adrenergic vasorelaxation in hypertension. *Circulation*, **106**, 349-355.
- Iaccarino, G., Ciccarelli, M., Sorriento, D., Galasso, G., Campanile, A., Santulli, G., Cipolletta, E., Cerullo, V., Cimini, V., Altobelli, G. G., Piscione, F., Priante, O., Pastore, L., Chiariello, M., Salvatore, F., Koch, W. J. & Trimarco, B. (2005) Ischemic neoangiogenesis enhanced by beta2-adrenergic receptor overexpression: a novel role for the endothelial adrenergic system. *Circ.Res.*, **97**, 1182-1189.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Trinh, K., Sisodia, M. & Buga, G. M. (2002) Nebivolol: a selective beta(1)-adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide- and cyclic GMP-dependent mechanisms. *Nitric.Oxide.*, **7**, 75-82.
- Ignarro, L. J. (2004) Experimental evidences of nitric oxide-dependent vasodilatory activity of nebivolol, a third-generation beta-blocker. *Blood Press Suppl*, **1**, 2-16.

- Ince, C. & Sinaasappel, M. (1999) Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med.*, **27**, 1369-1377.
- Ince, C. (2005) The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*, **9 Suppl 4**, S13-S19.
- Irie, K., Fujii, E., Ishida, H., Wada, K., Suganuma, T., Nishikori, T., Yoshioka, T. & Muraki, T. (2001) Inhibitory effects of cyclic AMP elevating agents on lipopolysaccharide (LPS)-induced microvascular permeability change in mouse skin. *Br.J.Pharmacol.*, **133**, 237-242.
- Iruela-Arispe, M. L., Luque, A. & Lee, N. (2004) Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **36**, 1070-1078.
- Ishida, H., Ichimori, K., Hirota, Y., Fukahori, M. & Nakazawa, H. (1996) Peroxynitrite-induced cardiac myocyte injury. *Free Radic.Biol.Med.*, **20**, 343-350.
- Iversen, B. M. & Arendshorst, W. J. (1998) ANG II and vasopressin stimulate calcium entry in dispersed smooth muscle cells of preglomerular arterioles. *Am.J.Physiol*, **274**, F498-F508.
- Iwase, M., Ichikawa, K., Tashiro, K., Iino, K., Shinohara, N., Ibayashi, S., Yoshinari, M. & Fujishima, M. (2000) Effects of monosodium glutamate-induced obesity in spontaneously hypertensive rats vs. Wistar Kyoto rats: serum leptin and blood flow to brown adipose tissue. *Hypertens.Res.*, **23**, 503-510.
- Jackson, W. F. (2000) Ion channels and vascular tone. *Hypertension*, **35**, 173-178.
- Jackson, W. F. (2005) Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation.*, **12**, 113-127.
- Jafri, S. M., Lavine, S., Field, B. E., Bahoroziyan, M. T. & Carlson, R. W. (1990) Left ventricular diastolic function in sepsis. *Crit Care Med.*, **18**, 709-714.
- Jaggar, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J. & Nelson, M. T. (2000) Calcium sparks in smooth muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **278**, C235-C256.
- Jain, R. K. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat.Med.*, **9**, 685-693.
- Janssens, S., Pokreisz, P., Schoonjans, L., Pellens, M., Vermeersch, P., Tjwa, M., Jans, P., Scherrer-Crosbie, M., Picard, M. H., Szelid, Z., Gillijns, H., Van de, W. F., Collen, D. & Bloch, K. D. (2004) Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circ.Res.*, **94**, 1256-1262.
- Janssens, W. J., Van de, W. A., Xhonneux, R., Reneman, R. S., Van Nueten, J. M. & Janssen, P. A. (1989) Nebivolol is devoid of intrinsic sympathomimetic activity. *Eur.J.Pharmacol.*, **159**, 89-95.
- Jesch, N. K., Dorger, M., Enders, G., Rieder, G., Vogelmeier, C., Messmer, K. & Krombach, F. (1997) Expression of inducible nitric oxide synthase and formation of nitric oxide by alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environ.Health Perspect.*, **105 Suppl 5**, 1297-1300.
- Jockers, R., Da Silva, A., Strosberg, A. D., Bouvier, M. & Marullo, S. (1996) New molecular and structural determinants involved in beta 2-adrenergic receptor desensitization and sequestration. Delineation using chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptors. *J Biol.Chem.*, **271**, 9355-9362.
- Joe, E. K., Schussheim, A. E., Longrois, D., Maki, T., Kelly, R. A., Smith, T. W. & Balligand, J. L. (1998) Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **30**, 303-315.
- Johnstone, M. T., Creager, S. J., Scales, K. M., Cusco, J. A., Lee, B. K. & Creager, M. A. (1993) Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*, **88**, 2510-2516.
- Jones, M. K., Tsugawa, K., Tarnawski, A. S. & Baatar, D. (2004) Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **318**, 520-528.

- Jones, S. B. & Romano, F. D. (1984) Plasma catecholamines in the conscious rat during endotoxemia. *Circ.Shock*, **14**, 189-201.
- Jonker, J. W. & Schinkel, A. H. (2004) Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **308**, 2-9.
- Joseph, S. S., Lynham, J. A., Molenaar, P., Grace, A. A., Colledge, W. H. & Kaumann, A. J. (2003) Intrinsic sympathomimetic activity of (-)-pindolol mediated through a (-)-propranolol-resistant site of the beta1-adrenoceptor in human atrium and recombinant receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, **368**, 496-503.
- Julou-Schaeffer, G., Gray, G. A., Fleming, I., Schott, C., Parratt, J. R. & Stoclet, J. C. (1990) Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am.J.Physiol.*, **259**, H1038-H1043.
- Kadoi, Y., Saito, S., Kawahara, F., Nishihara, F. & Goto, F. (2002) G-protein coupled receptor kinase 2 is altered during septic shock in rats. *J.Surg.Res.*, **108**, 69-76.
- Kadoi, Y. & Goto, F. (2004) Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats. *Anesth.Analg.*, **99**, 212-220.
- Kakoki, M., Hirata, Y., Hayakawa, H., Nishimatsu, H., Suzuki, Y., Nagata, D., Suzuki, E., Kikuchi, K., Nagano, T. & Omata, M. (1999) Effects of vasodilatory beta-adrenoceptor antagonists on endothelium-derived nitric oxide release in rat kidney. *Hypertension*, **33**, 467-471.
- Kalebic, T., Garbisa, S., Glaser, B. & Liotta, L. A. (1983) Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science*, **221**, 281-283.
- Kalinowski, L., Dobrucki, L. W., Szczepanska-Konkel, M., Jankowski, M., Martyniec, L., Angielski, S. & Malinski, T. (2003) Third-generation beta-blockers stimulate nitric oxide release from endothelial cells through ATP efflux: a novel mechanism for antihypertensive action. *Circulation*, **107**, 2747-2752.
- Kamm, K. E. & Stull, J. T. (1985) The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, **25**, 593-620.
- Karin, M. & Ben Neria, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu.Rev.Immunol.*, **18**, 621-663.
- Karin, M. & Lin, A. (2002) NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat.Immunol.*, **3**, 221-227.
- Kathofer, S., Zhang, W., Karle, C., Thomas, D., Schoels, W. & Kiehn, J. (2000) Functional coupling of human beta 3-adrenoreceptors to the KvLQT1/MinK potassium channel. *J Biol.Chem.*, **275**, 26743-26747.
- Kaumann, A., Bartel, S., Molenaar, P., Sanders, L., Burrell, K., Vetter, D., Hempel, P., Karczewski, P. & Krause, E. G. (1999) Activation of beta2-adrenergic receptors hastens relaxation and mediates phosphorylation of phospholamban, troponin I, and C-protein in ventricular myocardium from patients with terminal heart failure. *Circulation*, **99**, 65-72.
- Kaumann, A. J. & Molenaar, P. (1996) Differences between the third cardiac beta-adrenoceptor and the colonic beta 3-adrenoceptor in the rat. *Br.J Pharmacol.*, **118**, 2085-2098.
- Kaumann, A. J. & Molenaar, P. (1997) Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, **355**, 667-681.
- Kawasuji, M., Tedoriya, T., Takemura, H., Sakakibara, N., Taki, J. & Watanabe, Y. (1993) Flow capacities of arterial grafts for coronary artery bypass grafting. *Ann.Thorac.Surg.*, **56**, 957-962.
- Keledjian, K., Borkowski, A., Kim, G., Isaacs, J. T., Jacobs, S. C. & Kyprianou, N. (2001) Reduction of human prostate tumor vascularity by the alpha1-adrenoceptor antagonist terazosin. *Prostate*, **48**, 71-78.

- Keledjian, K., Garrison, J. B. & Kyprianou, N. (2005) Doxazosin inhibits human vascular endothelial cell adhesion, migration, and invasion. *J.Cell Biochem.*, **94**, 374-388.
- Khac, L. D., Arnaudeau, S., Lepretre, N., Mironneau, J. & Harbon, S. (1996) Beta adrenergic receptor activation attenuates the generation of inositol phosphates in the pregnant rat myometrium. Correlation with inhibition of Ca⁺⁺ influx, a cAMP-independent mechanism. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **276**, 130-136.
- Kitamura, T., Onishi, K., Dohi, K., Okinaka, T., Isaka, N. & Nakano, T. (2000) The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation in the beating guinea pig heart. *J Cardiovasc.Pharmacol.*, **35**, 786-790.
- Klaus, S., Muzzin, P., Revelli, J. P., Cawthorne, M. A., Giacobino, J. P. & Ricquier, D. (1995) Control of beta 3-adrenergic receptor gene expression in brown adipocytes in culture. *Mol.Cell Endocrinol.*, **109**, 189-195.
- Klein, R. (1996) Diabetic retinopathy. *Annu.Rev.Public Health*, **17**, 137-158.
- Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K. & Schwarz, P. M. (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur.J.Pharmacol.*, **500**, 255-266.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W. & Martin, G. R. (1986) Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*, **25**, 312-318.
- Kohout, T. A., Takaoka, H., McDonald, P. H., Perry, S. J., Mao, L., Lefkowitz, R. J. & Rockman, H. A. (2001) Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation*, **104**, 2485-2491.
- Kong, Y. H., Li, W. M. & Tian, Y. (2004) [Effect of beta3-adrenoreceptors agonist on beta3-adrenoreceptors expression and myocyte apoptosis in a rat model of heart failure]. *Zhongguo Wei Zhong.Bing.Ji.Jiu.Yi.Xue.*, **16**, 142-147.
- Konishi, M. & Su, C. (1983) Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension*, **5**, 881-886.
- Kozłowska, H., Szymaska, U., Schlicker, E. & Malinowska, B. (2003) Atypical beta-adrenoceptors, different from beta 3-adrenoceptors and probably from the low-affinity state of beta 1-adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. *Br.J Pharmacol.*, **140**, 3-12.
- Kozłowska, H., Schlicker, E., Kozłowski, M., Siedlecka, U., Laudanski, J. & Malinowska, B. (2005) Ligands at beta2-, beta3-, and the low-affinity state of beta1-adrenoceptors block the alpha1-adrenoceptor-mediated constriction in human pulmonary and rat mesenteric arteries. *J Cardiovasc.Pharmacol.*, **46**, 76-82.
- Kraemer, F. B. & Shen, W. J. (2002) Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di)-acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J.Lipid Res.*, **43**, 1585-1594.
- Krauss, S. L., Dodge, J. T. & Bevan, J. A. (1992) Magnitude of beta-adrenoceptor-mediated responses of dog epicardial coronary arteries: inverse relation to diameter. *Am.J Physiol*, **263**, H1422-H1429.
- Krief, S., Feve, B., Baude, B., Zilberfarb, V., Strosberg, A. D., Pairault, J. & Emorine, L. J. (1994) Transcriptional modulation by n-butyric acid of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic receptor balance in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol.Chem.*, **269**, 6664-6670.
- Kristof, A. S., Noorhosseini, H. & Hussain, S. N. (1997) Attenuation of endothelium-dependent hyperpolarizing factor by bacterial lipopolysaccharides. *Eur.J.Pharmacol.*, **328**, 69-73.
- Kubes, P. (2002) The complexities of leukocyte recruitment. *Semin.Immunol.*, **14**, 65-72.
- Kubo, S., Matsuda, A., Ohnuki, T., Hattori, K., Suzuki, J. & Nagatomo, T. (1997) Assessment of beta 2- and beta 3-adrenoceptors in rat white adipose tissues by radioligand binding assay. *Biol.Pharm.Bull.*, **20**, 142-148.

- Kumar, A., Thota, V., Dee, L., Olson, J., Uretz, E. & Parrillo, J. E. (1996) Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J.Exp.Med.*, **183**, 949-958.
- Kupersmidt, S., Yang, T., Anderson, M. E., Wessels, A., Niswender, K. D., Magnuson, M. A. & Roden, D. M. (1999) Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ.Res.*, **84**, 146-152.
- Kurabayashi, T., Carey, D. G. & Morrison, N. A. (1996) The beta 3-adrenergic receptor gene Trp64Arg mutation is overrepresented in obese women. Effects on weight, BMI, abdominal fat, blood pressure, and reproductive history in an elderly Australian population. *Diabetes*, **45**, 1358-1363.
- Kuratani, K., Kodama, H. & Yamaguchi, I. (1994) Enhancement of gastric mucosal blood flow by beta-3 adrenergic agonists prevents indomethacin-induced antral ulcer in the rat. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **270**, 559-565.
- Kuroki, K., Takahashi, H. K., Iwagaki, H., Murakami, T., Kuinose, M., Hamanaka, S., Minami, K., Nishibori, M., Tanaka, N. & Tanemoto, K. (2004) beta2-adrenergic receptor stimulation-induced immunosuppressive effects possibly through down-regulation of co-stimulatory molecules, ICAM-1, CD40 and CD14 on monocytes. *J.Int.Med.Res.*, **32**, 465-483.
- Kusano, E., Tian, S., Umino, T., Tetsuka, T., Ando, Y. & Asano, Y. (1997) Arginine vasopressin inhibits interleukin-1 beta-stimulated nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production via the V1 receptor in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J.Hypertens.*, **15**, 627-632.
- Lacroix, J. S., Kurt, A. M., Auberson, S. & Bretton, C. (1995) Beta-adrenergic mechanisms in the nasal mucosa vascular bed. *Eur Arch.Otorhinolaryngol.*, **252**, 298-303.
- Lam, C., Tyml, K., Martin, C. & Sibbald, W. (1994) Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J.Clin.Invest*, **94**, 2077-2083.
- Lamallice, L., Houle, F., Jourdan, G. & Huot, J. (2004) Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*, **23**, 434-445.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. & Petitfrere, E. (2004) TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, **49**, 187-198.
- Lancel, S., Tissier, S., Mordon, S., Marechal, X., Depontieu, F., Scherpereel, A., Chopin, C. & Neviere, R. (2004) Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J.Am.Coll.Cardiol.*, **43**, 2348-2358.
- Lancel, S., Joulin, O., Favory, R., Goossens, J. F., Kluza, J., Chopin, C., Formstecher, P., Marchetti, P. & Neviere, R. (2005a) Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Circulation*, **111**, 2596-2604.
- Lancel, S., Petillot, P., Favory, R., Stebach, N., Lahorte, C., Danze, P. M., Vallet, B., Marchetti, P. & Neviere, R. (2005b) Expression of apoptosis regulatory factors during myocardial dysfunction in endotoxemic rats. *Crit Care Med.*, **33**, 492-496.
- Landry, D. W. & Oliver, J. A. (1992) The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. *J.Clin.Invest*, **89**, 2071-2074.
- Landry, D. W., Levin, H. R., Gallant, E. M., Ashton, R. C., Jr., Seo, S., D'Alessandro, D., Oz, M. C. & Oliver, J. A. (1997) Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation*, **95**, 1122-1125.
- Landry, D. W. & Oliver, J. A. (2001) The pathogenesis of vasodilatory shock. *N.Engl.J.Med.*, **345**, 588-595.
- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P. & Brown, T. G., Jr. (1967a) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, **214**, 597-598.

- Lands, A. M., Luduena, F. P. & Buzzo, H. J. (1967b) Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci.*, **6**, 2241-2249.
- Langin, D., Portillo, M. P., Saulnier-Blache, J. S. & Lafontan, M. (1991) Coexistence of three beta-adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur J Pharmacol.*, **199**, 291-301.
- Lanone, S., Mebazaa, A., Heymes, C., Henin, D., Poderoso, J. J., Panis, Y., Zedda, C., Billiar, T., Payen, D., Aubier, M. & Boczkowski, J. (2000) Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **162**, 2308-2315.
- Larsen, T. M., Toubro, S., van Baak, M. A., Gottesdiener, K. M., Larson, P., Saris, W. H. & Astrup, A. (2002) Effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel beta(3)-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure and body composition in obese men. *Am.J Clin.Nutr.*, **76**, 780-788.
- Lassiter, H. A., Walz, B. M., Wilson, J. L., Jung, E., Calisi, C. R., Goldsmith, L. J., Wilson, R. A., Morgan, B. P. & Feldhoff, R. C. (1997) The administration of complement component C9 enhances the survival of neonatal rats with *Escherichia coli* sepsis. *Pediatr.Res.*, **42**, 128-136.
- Lau, Y. T. & Ma, W. C. (1996) Nitric oxide inhibits migration of cultured endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **221**, 670-674.
- Laubach, V. E., Shesely, E. G., Smithies, O. & Sherman, P. A. (1995) Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92**, 10688-10692.
- Lauzurica, P., Martinez-Martinez, S., Marazuela, M., Gomez, d. A., Martinez, C., Sanchez-Madrid, F. & Redondo, J. M. (1999) Pyrrolidine dithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNF-alpha. *Eur.J.Immunol.*, **29**, 1890-1900.
- Lavon, I., Goldberg, I., Amit, S., Landsman, L., Jung, S., Tsuberi, B. Z., Barshack, I., Kopolovic, J., Galun, E., Bujard, H. & Ben Neriah, Y. (2000) High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. *Nat.Med.*, **6**, 573-577.
- Layland, J., Cave, A. C., Warren, C., Grieve, D. J., Sparks, E., Kentish, J. C., Solaro, R. J. & Shah, A. M. (2005) Protection against endotoxemia-induced contractile dysfunction in mice with cardiac-specific expression of slow skeletal troponin I. *FASEB J.*, **19**, 1137-1139.
- Le Boeuf, F., Houle, F. & Huot, J. (2004) Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J.Biol.Chem.*, **279**, 39175-39185.
- Leblais, V., Demolombe, S., Vallette, G., Langin, D., Baro, I., Escande, D. & Gauthier, C. (1999) beta3-adrenoceptor control the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Biol. Chem.*, **274**, 6107-6113.
- Leblais, V., Pourageaud, F., Ivorra, M. D., Guibert, C., Marthan, R. & Muller, B. (2004) Role of alpha-adrenergic receptors in the effect of the beta-adrenergic receptor ligands, CGP 12177, bupranolol, and SR 59230A, on the contraction of rat intrapulmonary artery. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **309**, 137-145.
- Leclerc, J., Pu, Q., Corseaux, D., Haddad, E., Decoene, C., Bordet, R., Six, I., Jude, B. & Vallet, B. (2000) A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med.*, **28**, 3672-3678.
- Lederman, R. J., Mendelsohn, F. O., Anderson, R. D., Saucedo, J. F., Tenaglia, A. N., Hermiller, J. B., Hillegass, W. B., Rocha-Singh, K., Moon, T. E., Whitehouse, M. J. & Annex, B. H. (2002) Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*, **359**, 2053-2058.

- Lenzen, G., Pietri-Rouxel, F., Drumare, M. F., Amiard, A., Guillot, S., Archimbault, P. & Strosberg, A. D. (1998) Genomic cloning and species-specific properties of the recombinant canine beta3-adrenoceptor. *Eur J Pharmacol.*, **363**, 217-227.
- Levasseur, S., Pigeon, C., Reyl-Desmars, F., Caput, D. & Lewin, M. J. (1995) [Stimulation of adenylate cyclase by the isoforms of human and rat beta-3 adrenergic receptor expressed in the CHO cells]. *Gastroenterol.Clin.Biol.*, **19**, 668-672.
- Levesque, P. C., Hart, P. J., Hume, J. R., Kenyon, J. L. & Horowitz, B. (1992) Expression of cystic fibrosis transmembrane regulator Cl⁻ channels in heart. *Circ.Res.*, **71**, 1002-1007.
- Levi, M. & ten Cate, H. (1999) Disseminated intravascular coagulation. *N.Engl.J.Med.*, **341**, 586-592.
- Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. & Goldberg, M. A. (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J.Biol.Chem.*, **270**, 13333-13340.
- Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S. M., Vincent, J. L. & Ramsay, G. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.*, **31**, 1250-1256.
- Levy, R. J., Vijayasathy, C., Raj, N. R., Avadhani, N. G. & Deutschman, C. S. (2004) Competitive and noncompetitive inhibition of myocardial cytochrome C oxidase in sepsis. *Shock*, **21**, 110-114.
- Lew, W. Y., Yasuda, S., Yuan, T. & Hammond, H. K. (1996) Endotoxin-induced cardiac depression is associated with decreased cardiac dihydropyridine receptors in rabbits. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **28**, 1367-1371.
- Liaw, W. J., Tzao, C., Wu, J. Y., Chen, S. J., Wang, J. H. & Wu, C. C. (2003) Inhibition by terbutaline of nitric oxide and superoxide anion levels of endotoxin-induced organs injury in the anesthetized rat. *Shock*, **19**, 281-288.
- Lidington, D., Ouellette, Y. & Tyml, K. (2002) Communication of agonist-induced electrical responses along 'capillaries' in vitro can be modulated by lipopolysaccharide, but not nitric oxide. *J.Vasc.Res.*, **39**, 405-413.
- Liggett, S. B. (1992) Functional properties of the rat and human beta 3-adrenergic receptors: differential agonist activation of recombinant receptors in Chinese hamster ovary cells. *Mol.Pharmacol.*, **42**, 634-637.
- Liggett, S. B., Freedman, N. J., Schwinn, D. A. & Lefkowitz, R. J. (1993) Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **90**, 3665-3669.
- Liu, S. F., Ye, X. & Malik, A. B. (1999) Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation*, **100**, 1330-1337.
- Loirand, G. & Douillon, M. (2002) Voies de signalisation contrôlant la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans : Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux, édité par Flammarion., p. 371-378.
- Loop, F. D. (1996) Internal-thoracic-artery grafts. Biologically better coronary arteries. *N.Engl.J.Med.*, **334**, 263-265.
- Loots, W. & De Clerck, F. (1990) Differential effects of nebivolol on adrenoceptors in the heart and in resistance arterioles in the rat. Quantitative intravital microscopic analysis. *Eur.J.Pharmacol.*, **179**, 177-186.
- Lopez-Aguirre, Y. & Paramo, J. A. (1999) Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. *Thromb.Res.*, **94**, 95-101.
- Losonczy, G., Kriston, T., Szabo, A., Muller, V., Harvey, J., Hamar, P., Heemann, U. & Baylis, C. (2000) Male gender predisposes to development of endotoxic shock in the rat. *Cardiovasc.Res.*, **47**, 183-191.

- Louis, A., Cleland, J. G., Crabbe, S., Ford, S., Thackray, S., Houghton, T. & Clark, A. (2001) Clinical Trials Update: CAPRICORN, COPERNICUS, MIRACLE, STAF, RITZ-2, RECOVER and RENAISSANCE and cachexia and cholesterol in heart failure. Highlights of the Scientific Sessions of the American College of Cardiology, 2001. *Eur.J.Heart Fail.*, **3**, 381-387.
- Lu, J. L., Schmiede, L. M., III, Kuo, L. & Liao, J. C. (1996) Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **225**, 1-5.
- Lush, C. W., Cepinskas, G. & Kviety, P. R. (2003) Regulation of intestinal nuclear factor-kappaB activity and E-selectin expression during sepsis: a role for peroxynitrite. *Gastroenterology*, **124**, 118-128.
- Luttun, A., Tjwa, M. & Carmeliet, P. (2002) Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **979**, 80-93.
- Lytle, B. W., McElroy, D., McCarthy, P., Loop, F. D., Taylor, P. C., Goormastic, M., Stewart, R. W. & Cosgrove, D. M. (1994) Influence of arterial coronary bypass grafts on the mortality in coronary reoperations. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, **107**, 675-682.
- Macarthur, H., Westfall, T. C., Riley, D. P., Misko, T. P. & Salvemini, D. (2000) Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **97**, 9753-9758.
- MacDonald, A., McLean, M., MacAulay, L. & Shaw, A. M. (1999) Effects of propranolol and L-NAME on beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat carotid artery. *J Auton.Pharmacol.*, **19**, 145-149.
- MacMicking, J. D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D. S., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q. W., Sokol, K., Hutchinson, N. & . (1995) Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*, **81**, 641-650.
- Makaritsis, K. P., Gavras, H., Du, Y., Chobanian, A. V. & Brecher, P. (1998) Alpha1-adrenergic plus angiotensin receptor blockade reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension*, **32**, 1044-1048.
- Malina, A. N., Laivuori, H. M., Agatista, P. K., Collura, L. A., Crombleholme, W. R., Sims, C. J. & Roberts, J. M. (2004) The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor is not increased in women with preeclampsia. *Am.J Obstet.Gynecol.*, **190**, 779-783.
- Mallem, M. Y., Gogny, M., Gautier, F., Bucas, V. & Desfontis, J. C. (2003) Evaluation of beta3-adrenoceptor-mediated relaxation in intact and endotoxin-treated equine digital veins. *Am.J Vet.Res.*, **64**, 708-714.
- Mallem, M. Y., Toumaniantz, G., Serpillon, S., Gautier, F., Gogny, M., Desfontis, J. C. & Gauthier, C. (2004) Impairment of the low-affinity state beta1-adrenoceptor-induced relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Br.J Pharmacol.*, **143**, 599-605.
- Manara, L., Badone, D., Baroni, M., Boccardi, G., Cecchi, R., Croci, T., Giudice, A., Guzzi, U., Landi, M. & Le Fur, G. (1996) Functional identification of rat atypical beta-adrenoceptors by the first beta 3-selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins. *Br.J Pharmacol.*, **117**, 435-442.
- Mangrella, M., Rossi, F., Fici, F. & Rossi, F. (1998) Pharmacology of nebivolol. *Pharmacol.Res.*, **38**, 419-431.
- Manraj, M., Francke, S., Hebe, A., Ramjuttun, U. S. & Froguel, P. (2001) Genetic and environmental nature of the insulin resistance syndrome in Indo-Mauritian subjects with premature coronary heart disease: contribution of beta3-adrenoreceptor gene polymorphism and beta blockers on triglyceride and HDL concentrations. *Diabetologia*, **44**, 115-122.
- Mansart, A., Bollaert, P. E., Seguin, C., Levy, B., Longrois, D. & Mallie, J. P. (2003) Hemodynamic effects of early versus late glucocorticosteroid administration in experimental septic shock. *Shock*, **19**, 38-44.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N.Engl.J.Med.*, **348**, 1546-1554.

- Martin, S. R., Emanuel, K., Sears, C. E., Zhang, Y. H. & Casadei, B. (2006) Are myocardial eNOS and nNOS involved in the beta-adrenergic and muscarinic regulation of inotropy? A systematic investigation. *Cardiovasc.Res.*, **70**, 97-106.
- Martinez, C., Abad, C., Delgado, M., Arranz, A., Juarranz, M. G., Rodriguez-Henche, N., Brabet, P., Leceta, J. & Gomariz, R. P. (2002) Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99**, 1053-1058.
- Martins, P. S., Kallas, E. G., Neto, M. C., Dalboni, M. A., Blecher, S. & Salomao, R. (2003) Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock*, **20**, 208-212.
- Maruyama, I. (1998) Biology of endothelium. *Lupus*, **7 Suppl 2**, S41-S43.
- Massion, P. B., Moniotte, S. & Balligand, J. L. (2001) Nitric oxide: does it play a role in the heart of the critically ill? *Curr.Opin.Crit Care*, **7**, 323-336.
- Massion, P. B., Feron, O., Dessy, C. & Balligand, J. L. (2003) Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ.Res.*, **93**, 388-398.
- Massion, P. B., Pelat, M., Belge, C. & Balligand, J. L. (2005) Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol*, **142**, 144-150.
- Masuo, K., Katsuya, T., Fu, Y., Rakugi, H., Ogiwara, T. & Tuck, M. L. (2005) Beta2- and beta3-adrenergic receptor polymorphisms are related to the onset of weight gain and blood pressure elevation over 5 years. *Circulation*, **111**, 3429-3434.
- Matsukawa, A., Lukacs, N. W., Hogaboam, C. M., Knibbs, R. N., Bullard, D. C., Kunkel, S. L. & Stoolman, L. M. (2002) Mice genetically lacking endothelial selectins are resistant to the lethality in septic peritonitis. *Exp.Mol.Pathol.*, **72**, 68-76.
- Matsumoto, K., Ohi, H. & Kanmatsuse, K. (1997) Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis. *Nephron*, **77**, 212-218.
- Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., Wang, L., Wikner, C., Qi, J. H., Wernstedt, C., Wu, J., Bruheim, S., Mugishima, H., Mukhopadhyay, D., Spurkland, A. & Claesson-Welsh, L. (2005) VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *EMBO J.*, **24**, 2342-2353.
- Matsushita, M., Horinouchi, T., Tanaka, Y., Tsuru, H. & Koike, K. (2003) Characterization of beta 3-adrenoceptor-mediated relaxation in rat abdominal aorta smooth muscle. *Eur J Pharmacol.*, **482**, 235-244.
- Matter, C. M., Mandinov, L., Kaufmann, P. A., Vassalli, G., Jiang, Z. & Hess, O. M. (1999) Effect of NO donors on LV diastolic function in patients with severe pressure-overload hypertrophy. *Circulation*, **99**, 2396-2401.
- McCuskey, R. S., McCuskey, P. A., Urbaschek, R. & Urbaschek, B. (1984) Species differences in Kupffer cells and endotoxin sensitivity. *Infect.Immun.*, **45**, 278-280.
- McGuire, P. G. & Seeds, N. W. (1989) The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J.Cell Biochem.*, **40**, 215-227.
- McIntyre, R. C., Jr., Sheridan, B., Agrafojo, J. & Fullerton, D. A. (1997) Endotoxin differentially impairs cyclic guanosine monophosphate-mediated relaxation in the pulmonary and systemic circulations. *Crit Care Med.*, **25**, 318-323.

- McLaughlin, D. P. & MacDonald, A. (1990) Evidence for the existence of 'atypical' beta-adrenoceptors (beta 3-adrenoceptors) mediating relaxation in the rat distal colon in vitro. *Br.J.Pharmacol.*, **101**, 569-574.
- McLaughlin, D. P. & MacDonald, A. (1991) Characterization of catecholamine-mediated relaxations in rat isolated gastric fundus: evidence for an atypical beta-adrenoceptor. *Br.J.Pharmacol.*, **103**, 1351-1356.
- Meadows, K. N., Bryant, P. & Pumiglia, K. (2001) Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J.Biol.Chem.*, **276**, 49289-49298.
- Mebazaa, A., De Keulenaer, G. W., Paqueron, X., Andries, L. J., Ratajczak, P., Lanone, S., Frelin, C., Longrois, D., Payen, D., Brutsaert, D. L. & Sys, S. U. (2001) Activation of cardiac endothelium as a compensatory component in endotoxin-induced cardiomyopathy: role of endothelin, prostaglandins, and nitric oxide. *Circulation*, **104**, 3137-3144.
- Mehta, N. J., Khan, I. A., Gupta, V., Jani, K., Gowda, R. M. & Smith, P. R. (2004) Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock. *Int.J.Cardiol.*, **95**, 13-17.
- Melis, M. G., Secchi, G., Brizzi, P., Severino, C., Maioli, M. & Tonolo, G. (2002) The Trp64Arg beta3-adrenergic receptor amino acid variant confers increased sensitivity to the pressor effects of noradrenaline in Sardinian subjects. *Clin.Sci.(Lond)*, **103**, 397-402.
- Mery, P. F., Lohmann, S. M., Walter, U. & Fischmeister, R. (1991) Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **88**, 1197-1201.
- Mery, P. F., Pavoine, C., Belhassen, L., Pecker, F. & Fischmeister, R. (1993) Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol.Chem.*, **268**, 26286-26295.
- Michaelis, U. R. & Fleming, I. (2006) From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling. *Pharmacol.Ther.*, **111**, 584-595.
- Michel, M. C., Brodde, O. E. & Insel, P. A. (1990) Peripheral adrenergic receptors in hypertension. *Hypertension*, **16**, 107-120.
- Mihm, M. J., Coyle, C. M., Schanbacher, B. L., Weinstein, D. M. & Bauer, J. A. (2001) Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc.Res.*, **49**, 798-807.
- Milano, C. A., Allen, L. F., Rockman, H. A., Dolber, P. C., McMinn, T. R., Chien, K. R., Johnson, T. D., Bond, R. A. & Lefkowitz, R. J. (1994) Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science*, **264**, 582-586.
- Milkiewicz, M., Ispanovic, E., Doyle, J. L. & Haas, T. L. (2006) Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **38**, 333-357.
- Mitchell, B. D., Blangero, J., Comuzzie, A. G., Almasy, L. A., Shuldiner, A. R., Silver, K., Stern, M. P., MacCluer, J. W. & Hixson, J. E. (1998) A paired sibling analysis of the beta-3 adrenergic receptor and obesity in Mexican Americans. *J Clin.Invest*, **101**, 584-587.
- Moffett, S., Mouillac, B., Bonin, H. & Bouvier, M. (1993) Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J*, **12**, 349-356.
- Molenaar, P., Malta, E., Jones, C. R., Buxton, B. F. & Summers, R. J. (1988) Autoradiographic localization and function of beta-adrenoceptors on the human internal mammary artery and saphenous vein. *Br.J.Pharmacol.*, **95**, 225-233.
- Molenaar, P., Sarsero, D. & Kaumann, A. J. (1997) Proposal for the interaction of non-conventional partial agonists and catecholamines with the 'putative beta 4-adrenoceptor' in mammalian heart. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, **24**, 647-656.

- Mongillo, M., Tocchetti, C. G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y. F., Dostmann, W. R., Pozzan, T., Kass, D. A., Paolocci, N., Houslay, M. D. & Zaccolo, M. (2006) Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ.Res.*, **98**, 226-234.
- Moniotte, S., Vaerman, J. L., Kockx, M. M., Larrouy, D., Langin, D., Noirhomme, P. & Balligand, J. L. (2001) Real-time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **33**, 2121-2133.
- Moniotte, S. & Balligand, J. L. (2002) Potential use of beta(3)-adrenoceptor antagonists in heart failure therapy. *Cardiovasc.Drug Rev.*, **20**, 19-26.
- Monsalve, F., Rucabado, L., Salvador, A., Bonastre, J., Cunat, J. & Ruano, M. (1984) Myocardial depression in septic shock caused by meningococcal infection. *Crit Care Med.*, **12**, 1021-1023.
- Moore, K. L., Andreoli, S. P., Esmon, N. L., Esmon, C. T. & Bang, N. U. (1987) Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J.Clin.Invest*, **79**, 124-130.
- Morelli, A., De Castro, S., Teboul, J. L., Singer, M., Rocco, M., Conti, G., De Luca, L., Di Angelantonio, E., Orecchioni, A., Pandian, N. G. & Pietropaoli, P. (2005) Effects of levosimendan on systemic and regional hemodynamics in septic myocardial depression. *Intensive Care Med.*, **31**, 638-644.
- Morikawa, A., Koide, N., Kato, Y., Sugiyama, T., Chakravorty, D., Yoshida, T. & Yokochi, T. (2000) Augmentation of nitric oxide production by gamma interferon in a mouse vascular endothelial cell line and its modulation by tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. *Infect.Immun.*, **68**, 6209-6214.
- Morimoto, A., Hasegawa, H., Cheng, H. J., Little, W. C. & Cheng, C. P. (2004) Endogenous beta3-adrenoreceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol*, **286**, H2425-H2433.
- Morin, M. J., Unno, N., Hodin, R. A. & Fink, M. P. (1998) Differential expression of inducible nitric oxide synthase messenger RNA along the longitudinal and crypt-villus axes of the intestine in endotoxemic rats. *Crit Care Med.*, **26**, 1258-1264.
- Morrison, A. C., Brancati, F. L., Folsom, A. R., Smith, L. & Boerwinkle, E. (1999) Beta3-adrenergic receptor Trp64Arg polymorphism does not predict incident CHD or carotid intima-media thickness in a community-based sample of whites: the ARIC study. *Atherosclerosis Risk in Communities. Hum.Genet.*, **105**, 314-319.
- Moser, T. L., Stack, M. S., Asplin, I., Enghild, J. J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H. W. & Pizzo, S. V. (1999) Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 2811-2816.
- Mungrue, I. N., Gros, R., You, X., Pirani, A., Azad, A., Csont, T., Schulz, R., Butany, J., Stewart, D. J. & Husain, M. (2002) Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J.Clin.Invest*, **109**, 735-743.
- Munoz-Chapuli, R., Quesada, A. R. & Angel, M. M. (2004) Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol.Life Sci.*, **61**, 2224-2243.
- Munoz, C., Misset, B., Fitting, C., Bleriot, J. P., Carlet, J. & Cavaillon, J. M. (1991) Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. *Eur.J.Immunol.*, **21**, 2177-2184.
- Murao, K., Yamada, M., Yamada, K., Uda, R., Nakao, S. & Shingu, K. (2002) An antagonistic effect of esmolol on beta-3 adrenoceptor in brown adipose tissue in rats. *J.Anesth.*, **16**, 265-267.

- Murohara, T., Horowitz, J. R., Silver, M., Tsurumi, Y., Chen, D., Sullivan, A. & Isner, J. M. (1998a) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*, **97**, 99-107.
- Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J. F., Fishman, M. C., Huang, P. L. & Isner, J. M. (1998b) Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J.Clin.Invest*, **101**, 2567-2578.
- Murphy, M. E. & Brayden, J. E. (1995) Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J.Physiol*, **486 (Pt 1)**, 47-58.
- Nakajima, Y., Baudry, N., Duranteau, J. & Vicaut, E. (2001) Microcirculation in intestinal villi: a comparison between hemorrhagic and endotoxin shock. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **164**, 1526-1530.
- Nakamura, A., Imaizumi, A., Yanagawa, Y., Kohsaka, T. & Johns, E. J. (2004) beta(2)-Adrenoceptor activation attenuates endotoxin-induced acute renal failure. *J.Am.Soc.Nephrol.*, **15**, 316-325.
- Nakamura, A., Imaizumi, A., Niimi, R., Yanagawa, Y., Kohsaka, T. & Johns, E. J. (2005) Adenoviral delivery of the beta2-adrenoceptor gene in sepsis: a subcutaneous approach in rat for kidney protection. *Clin.Sci.(Lond)*, **109**, 503-511.
- Nakamura, T., Ueno, Y., Goda, Y., Nakamura, A., Shinjo, K. & Nagahisa, A. (1997) Efficacy of a selective histamine H2 receptor agonist, dimaprit, in experimental models of endotoxin shock and hepatitis in mice. *Eur.J.Pharmacol.*, **322**, 83-89.
- Nambi, P., Whitman, M., Gessner, G., Aiyar, N. & Crooke, S. T. (1986) Vasopressin-mediated inhibition of atrial natriuretic factor-stimulated cGMP accumulation in an established smooth muscle cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **83**, 8492-8495.
- Nantel, F., Marullo, S., Krief, S., Strosberg, A. D. & Bouvier, M. (1994) Cell-specific down-regulation of the beta 3-adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.*, **269**, 13148-13155.
- Natanson, C., Danner, R. L., Elin, R. J., Hosseini, J. M., Peart, K. W., Banks, S. M., MacVittie, T. J., Walker, R. I. & Parrillo, J. E. (1989) Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. Escherichia coli and Staphylococcus aureus challenges in a canine model of human septic shock. *J.Clin.Invest*, **83**, 243-251.
- Neilan, C. L., Akil, H., Woods, J. H. & Traynor, J. R. (1999) Constitutive activity of the delta-opioid receptor expressed in C6 glioma cells: identification of non-peptide delta-inverse agonists. *Br.J.Pharmacol.*, **128**, 556-562.
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L. & Matrisian, L. M. (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J.Clin.Oncol.*, **18**, 1135-1149.
- Neviere, R., Fauvel, H., Chopin, C., Formstecher, P. & Marchetti, P. (2001) Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **163**, 218-225.
- Nichols, A. J., Sulpizio, A. C., Ashton, D. J., Hieble, J. P. & Ruffolo, R. R., Jr. (1989) In vitro pharmacologic profile of the novel beta-adrenoceptor antagonist and vasodilator, carvedilol. *Pharmacology*, **39**, 327-336.
- Nodari, S., Metra, M. & Dei, C. L. (2003) Beta-blocker treatment of patients with diastolic heart failure and arterial hypertension. A prospective, randomized, comparison of the long-term effects of atenolol vs. nebivolol. *Eur J Heart Fail.*, **5**, 621-627.
- Noguera, I., Medina, P., Segarra, G., Martinez, M. C., Aldasoro, M., Vila, J. M. & Lluch, S. (1997) Potentiation by vasopressin of adrenergic vasoconstriction in the rat isolated mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.*, **122**, 431-438.

- Noiri, E., Lee, E., Testa, J., Quigley, J., Colflesh, D., Keese, C. R., Giaever, I. & Goligorsky, M. S. (1998) Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am.J.Physiol*, **274**, C236-C244.
- Nuytinck, H. K., Offermans, X. J., Kubat, K. & Goris, J. A. (1988) Whole-body inflammation in trauma patients. An autopsy study. *Arch.Surg.*, **123**, 1519-1524.
- O'Donnell, S. R. & Wanstall, J. C. (1985) Responses to the beta 2-selective agonist procaterol of vascular and atrial preparations with different functional beta-adrenoceptor populations. *Br.J Pharmacol.*, **84**, 227-235.
- O'Reilly, M. S., Wiederschain, D., Stetler-Stevenson, W. G., Folkman, J. & Moses, M. A. (1999) Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J.Biol.Chem.*, **274**, 29568-29571.
- O'Shea, J. G. (1996) Age-related macular degeneration: a leading cause of blindness. *Med.J Aust.*, **165**, 561-564.
- Ognibene, F. P., Parker, M. M., Natanson, C., Shelhamer, J. H. & Parrillo, J. E. (1988) Depressed left ventricular performance. Response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest*, **93**, 903-910.
- Oizumi, T., Daimon, M., Saitoh, T., Kameda, W., Yamaguchi, H., Ohnuma, H., Igarashi, M., Eguchi, H., Manaka, H., Tominaga, M. & Kato, T. (2001) Genotype Arg/Arg, but not Trp/Arg, of the Trp64Arg polymorphism of the beta(3)-adrenergic receptor is associated with type 2 diabetes and obesity in a large Japanese sample. *Diabetes Care*, **24**, 1579-1583.
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **7**, 359-371.
- Opazo Saez, A. M., Mosel, F., Nurnberger, J., Rushentsova, U., Gossel, M., Mitchell, A., Schafers, R. F., Philipp, T. & Wenzel, R. R. (2005) Laser Doppler imager (LDI) scanner and intradermal injection for in vivo pharmacology in human skin microcirculation: responses to acetylcholine, endothelin-1 and their repeatability. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, **59**, 511-519.
- Oriowo, M. A. (1994) Atypical beta-adrenoceptors in the rat isolated common carotid artery. *Br.J Pharmacol.*, **113**, 699-702.
- Oriowo, M. A. (1995) Different atypical beta-adrenoceptors mediate isoprenaline-induced relaxation in vascular and non-vascular smooth muscles. *Life Sci.*, **56**, L269-L275.
- Osswald, W. & Guimaraes, S. (1983) Adrenergic mechanisms in blood vessels: morphological and pharmacological aspects. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.*, **96**, 53-122.
- Oyekan, A. (2002) Nitric oxide inhibits renal cytochrome P450-dependent epoxygenases in the rat. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, **29**, 990-995.
- Pamies-Andreu, E., Garcia-Lozano, R., Palmero-Palmero, C., Garcia-Morillo, S., Alonso-Arcas, A., Stiefel, P., Carneado, d. I. F. & Villar, J. (2000) Genetic variation in the beta-3-adrenergic receptor in essential hypertension. *Life Sci.*, **67**, 391-397.
- Papapetropoulos, A., Desai, K. M., Rudic, R. D., Mayer, B., Zhang, R., Ruiz-Torres, M. P., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A. & Sessa, W. C. (1997) Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. *Am.J.Pathol.*, **150**, 1835-1844.
- Parenti, A., Morbidelli, L., Cui, X. L., Douglas, J. G., Hood, J. D., Granger, H. J., Ledda, F. & Ziche, M. (1998) Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J.Biol.Chem.*, **273**, 4220-4226.
- Parenti, A., Filippi, S., Amerini, S., Granger, H. J., Fazzini, A. & Ledda, F. (2000) Inositol phosphate metabolism and nitric-oxide synthase activity in endothelial cells are involved in the vasorelaxant activity of nebigolol. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **292**, 698-703.

- Parenti, A., Morbidelli, L., Ledda, F., Granger, H. J. & Ziche, M. (2001) The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J.*, **15**, 1487-1489.
- Parker, M. M., Shelhamer, J. H., Bacharach, S. L., Green, M. V., Natanson, C., Frederick, T. M., Damske, B. A. & Parrillo, J. E. (1984) Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann.Intern.Med.*, **100**, 483-490.
- Parker, M. M., Shelhamer, J. H., Natanson, C., Alling, D. W. & Parrillo, J. E. (1987) Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med.*, **15**, 923-929.
- Parker, M. M., McCarthy, K. E., Ognibene, F. P. & Parrillo, J. E. (1990) Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest*, **97**, 126-131.
- Parker, S. J. & Watkins, P. E. (2001) Experimental models of gram-negative sepsis. *Br.J.Surg.*, **88**, 22-30.
- Parrillo, J. E., Burch, C., Shelhamer, J. H., Parker, M. M., Natanson, C. & Schuette, W. (1985) A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J.Clin.Invest*, **76**, 1539-1553.
- Parrillo, J. E. (1993) Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N.Engl.J.Med.*, **328**, 1471-1477.
- Parry, G. C. & Mackman, N. (1995) Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **15**, 612-621.
- Pathan, N., Hemingway, C. A., Alizadeh, A. A., Stephens, A. C., Boldrick, J. C., Oragui, E. E., McCabe, C., Welch, S. B., Whitney, A., O'Gara, P., Nadel, S., Relman, D. A., Harding, S. E. & Levin, M. (2004) Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet*, **363**, 203-209.
- Pauwels, P. J., Gommeren, W., Van Lommen, G., Janssen, P. A. & Leysen, J. E. (1988) The receptor binding profile of the new antihypertensive agent nebivolol and its stereoisomers compared with various beta-adrenergic blockers. *Mol.Pharmacol.*, **34**, 843-851.
- Pavoine, C., Magne, S., Sauvadet, A. & Pecker, F. (1999) Evidence for a beta2-adrenergic/arachidonic acid pathway in ventricular cardiomyocytes. Regulation by the beta1-adrenergic/camp pathway. *J Biol.Chem.*, **274**, 628-637.
- Pavoine, C., Behforouz, N., Gauthier, C., Le Gouvello, S., Roudot-Thoraval, F., Martin, C. R., Pawlak, A., Feral, C., Defer, N., Houel, R., Magne, S., Amadou, A., Loisanche, D., Duvaldestin, P. & Pecker, F. (2003) beta2-Adrenergic signaling in human heart: shift from the cyclic AMP to the arachidonic acid pathway. *Mol.Pharmacol.*, **64**, 1117-1125.
- Pavoine, C. & Defer, N. (2005) The cardiac beta2-adrenergic signalling a new role for the cPLA2. *Cell Signal.*, **17**, 141-152.
- Pawlinski, R. & Mackman, N. (2004) Tissue factor, coagulation proteases, and protease-activated receptors in endotoxemia and sepsis. *Crit Care Med.*, **32**, S293-S297.
- Pearson, P. J., Lin, P. J. & Schaff, H. V. (1991) Production of endothelium-derived contracting factor is enhanced after coronary reperfusion. *Ann.Thorac.Surg.*, **51**, 788-793.
- Perlini, S., Ferrero, I., Palladini, G., Tozzi, R., Gatti, C., Vezzoli, M., Cesana, F., Janetti, M. B., Clari, F., Busca, G., Mancina, G. & Ferrari, A. U. (2006) Survival benefits of different antiadrenergic interventions in pressure overload left ventricular hypertrophy/failure. *Hypertension*, **48**, 93-97.
- Piagnerelli, M., Boudjeltia, K. Z., Vanhaeverbeek, M. & Vincent, J. L. (2003) Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med.*, **29**, 1052-1061.

- Pietri-Rouxel, F. & Strosberg, A. D. (1995) Pharmacological characteristics and species-related variations of beta 3-adrenergic receptors. *Fundam.Clin.Pharmacol.*, **9**, 211-218.
- Plachinta, R. V., Hayes, J. K., Cerilli, L. A. & Rich, G. F. (2003) Isoflurane pretreatment inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Anesthesiology*, **98**, 89-95.
- Pleiner, J., Heere-Ress, E., Langenberger, H., Sieder, A. E., Bayerle-Eder, M., Mittermayer, F., Fuchsjager-Mayrl, G., Bohm, J., Jansen, B. & Wolzt, M. (2002) Adrenoceptor hyporeactivity is responsible for Escherichia coli endotoxin-induced acute vascular dysfunction in humans. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **22**, 95-100.
- Plunkett, J. J., Reeves, J. D., Ngo, L., Bellows, W., Shafer, S. L., Roach, G., Howse, J., Herskowitz, A. & Mangano, D. T. (1997) Urine and plasma catecholamine and cortisol concentrations after myocardial revascularization. Modulation by continuous sedation. Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group, and the Ischemia Research and Education Foundation (IREF). *Anesthesiology*, **86**, 785-796.
- Poelaert, J., Declerck, C., Vogelaers, D., Colardyn, F. & Visser, C. A. (1997) Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. *Intensive Care Med.*, **23**, 553-560.
- Popp, B. D., Hutchinson, D. S., Evans, B. A. & Summers, R. J. (2004) Stereoselectivity for interactions of agonists and antagonists at mouse, rat and human beta3-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.*, **484**, 323-331.
- Porto, P. I., Garcia, S. I., Dieuzeide, G., Gonzalez, C., Landa, M. S. & Pirola, C. J. (2004) Clinical features of the metabolic syndrome in adolescents: minor role of the Trp64Arg beta3-adrenergic receptor gene variant. *Pediatr.Res.*, **55**, 836-841.
- Pott, C., Brixius, K., Bundkirchen, A., Bolck, B., Bloch, W., Steinritz, D., Mehlhorn, U. & Schwinger, R. H. (2003) The preferential beta3-adrenoceptor agonist BRL 37344 increases force via beta1-/beta2-adrenoceptors and induces endothelial nitric oxide synthase via beta3-adrenoceptors in human atrial myocardium. *Br.J Pharmacol.*, **138**, 521-529.
- Pourageaud, F., Leblais, V., Bellance, N., Marthan, R. & Muller, B. (2005) Role of beta(2)-adrenoceptors (ss-AR), but not ss(1)-, beta(3)-AR and endothelial nitric oxide, in beta-AR-mediated relaxation of rat intrapulmonary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, **372**, 14-23.
- Powers, F. M., Farias, S., Minami, H., Martin, A. F., Solaro, R. J. & Law, W. R. (1998) Cardiac myofilament protein function is altered during sepsis. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **30**, 967-978.
- Pozzi, A., Moberg, P. E., Miles, L. A., Wagner, S., Soloway, P. & Gardner, H. A. (2000) Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 2202-2207.
- Prager, G. W., Breuss, J. M., Steurer, S., Mihaly, J. & Binder, B. R. (2004) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid pro-urokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood*, **103**, 955-962.
- Preiser, J. C., Zhang, H., Debelle, F., Fesler, P., Kafi, S. A., Naeije, R. & Vincent, J. L. (2003) Hemodynamic effects of glibenclamide during endotoxemia: contrasting findings in vitro versus in vivo. *Shock*, **19**, 223-228.
- Price, S. A., Spain, D. A., Wilson, M. A., Harris, P. D. & Garrison, R. N. (1999) Subacute sepsis impairs vascular smooth muscle contractile machinery and alters vasoconstrictor and dilator mechanisms. *J.Surg.Res.*, **83**, 75-80.
- Priest, R. M., Hucks, D. & Ward, J. P. (1997) Noradrenaline, beta-adrenoceptor mediated vasorelaxation and nitric oxide in large and small pulmonary arteries of the rat. *Br.J Pharmacol.*, **122**, 1375-1384.

- Prigent, H., Maxime, V. & Annane, D. (2004) Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. *Crit Care*, **8**, 243-252.
- Pulkkinen, A., Kareinen, A., Saarinen, L., Heikkinen, S., Lehto, S. & Laakso, M. (1999) The codon 64 polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene is not associated with coronary heart disease or insulin resistance in nondiabetic subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*, **48**, 853-856.
- Pullamsetti, S. S., Maring, D., Ghofrani, H. A., Mayer, K., Weissmann, N., Rosengarten, B., Lehner, M., Schudt, C., Boer, R., Grimminger, F., Seeger, W. & Schermuly, R. T. (2006) Effect of nitric oxide synthase (NOS) inhibition on macro- and microcirculation in a model of rat endotoxic shock. *Thromb.Haemost.*, **95**, 720-727.
- Quayle, J. M., Nelson, M. T. & Standen, N. B. (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev.*, **77**, 1165-1232.
- Queen, L. R. & Ferro, A. (2006) Beta-adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Cell Mol.Life Sci.*, **63**, 1070-1083.
- Raetz, C. R. & Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu.Rev.Biochem.*, **71**, 635-700.
- Rafii, S. & Lyden, D. (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat.Med.*, **9**, 702-712.
- Rautureau, Y., Toumaniantz, G., Serpillon, S., Jourdon, P., Trochu, J. N. & Gauthier, C. (2002) Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *Br.J Pharmacol.*, **137**, 153-161.
- RayChaudhury, A., Frischer, H. & Malik, A. B. (1996) Inhibition of endothelial cell proliferation and bFGF-induced phenotypic modulation by nitric oxide. *J.Cell Biochem.*, **63**, 125-134.
- Redl, H., Bahrami, S., Schlag, G. & Traber, D. L. (1993) Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia. *Immunobiology*, **187**, 330-345.
- Reidy, M. A. & Bowyer, D. E. (1977) Scanning electron microscopy: morphology of aortic endothelium following injury by endotoxin and during subsequent repair. *Atherosclerosis*, **26**, 319-328.
- Reithmann, C., Hallstrom, S., Pilz, G., Kapsner, T., Schlag, G. & Werdan, K. (1993) Desensitization of rat cardiomyocyte adenylyl cyclase stimulation by plasma of noradrenaline-treated patients with septic shock. *Circ.Shock*, **41**, 48-59.
- Ren, J., Ren, B. H. & Sharma, A. C. (2002) Sepsis-induced depressed contractile function of isolated ventricular myocytes is due to altered calcium transient properties. *Shock*, **18**, 285-288.
- Revelly, J. P., Ayuse, T., Brienza, N., Fessler, H. E. & Robotham, J. L. (1996) Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall. *Crit Care Med.*, **24**, 1345-1351.
- Ringel, J., Kreutz, R., Distler, A. & Sharma, A. M. (2000) The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene is associated with hypertension in men with type 2 diabetes mellitus. *Am.J Hypertens.*, **13**, 1027-1031.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L. & . (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**, 1066-1073.
- Rissanen, J., Kuopusjarvi, J., Pihlajamaki, J., Sipilainen, R., Heikkinen, S., Vanhala, M., Kekalainen, P., Kuusisto, J. & Laakso, M. (1997) The Trp64Arg polymorphism of the beta 3-Adrenergic receptor gene. Lack of association with NIDDM and features of insulin resistance syndrome. *Diabetes Care*, **20**, 1319-1323.

- Ritter, J. M. (2001) Nebivolol: endothelium-mediated vasodilating effect. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **38 Suppl 3**, S13-S16.
- Robay, A., Toumaniantz, G., Leblais, V. & Gauthier, C. (2005) Transfected beta3- but not beta2-adrenergic receptors regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity via a new pathway involving the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases. *Mol.Pharmacol.*, **67**, 648-654.
- Rohrer, D. K., Chruscinski, A., Schauble, E. H., Bernstein, D. & Kobilka, B. K. (1999) Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol.Chem.*, **274**, 16701-16708.
- Rosenfeldt, F. L., He, G. W., Buxton, B. F. & Angus, J. A. (1999) Pharmacology of coronary artery bypass grafts. *Ann.Thorac.Surg.*, **67**, 878-888.
- Rossig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A. M., Mulsch, A. & Dimmeler, S. (1999) Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J.Biol.Chem.*, **274**, 6823-6826.
- Rouget, C., Breuiller-Fouche, M., Mercier, F. J., Leroy, M. J., Loustalot, C., Naline, E., Frydman, R., Croci, T., Morcillo, E. J., Advenier, C. & Bardou, M. (2004) The human near-term myometrial beta 3-adrenoceptor but not the beta 2-adrenoceptor is resistant to desensitisation after sustained agonist stimulation. *Br.J Pharmacol.*, **141**, 831-841.
- Rouget, C., Barthez, O., Goirand, F., Leroy, M. J., Breuiller-Fouche, M., Rakotoniaina, Z., Guerard, P., Morcillo, E. J., Advenier, C., Sagot, P., Cabrol, D., Dumas, M. & Bardou, M. (2005) Stimulation of the ADRB3 Adrenergic Receptor Induces Relaxation of Human Placental Arteries: Influence of Pre-eclampsia. *Biol.Reprod.*
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J. & Huot, J. (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, **15**, 2169-2177.
- Rozec, B., Serpillon, S., Toumaniantz, G., Seze, C., Rautureau, Y., Baron, O., Noireaud, J. & Gauthier, C. (2005) Characterization of beta3-adrenoceptors in human internal mammary artery and putative involvement in coronary artery bypass management. *J Am.Coll.Cardiol.*, **46**, 351-359.
- Rozec, B. & Gauthier, C. (2006) beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol.Ther.*, **111**, 652-673.
- Rozec, B., Quang, T. T., Noireaud, J. & Gauthier, C. (2006) Mixed beta3-adrenoceptor agonist and alpha1-adrenoceptor antagonist properties of nebivolol in rat thoracic aorta. *Br.J.Pharmacol.*, **147**, 699-706.
- Rudner, X. L., Berkowitz, D. E., Booth, J. V., Funk, B. L., Cozart, K. L., D'Amico, E. B., El Moalem, H., Page, S. O., Richardson, C. D., Winters, B., Marucci, L. & Schwinn, D. A. (1999) Subtype specific regulation of human vascular alpha(1)-adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation*, **100**, 2336-2343.
- Russell, W. C. (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J.Gen.Virol.*, **81**, 2573-2604.
- Sakane, N., Yoshida, T., Yoshioka, K., Nakamura, Y., Umekawa, T., Kogure, A., Takakura, Y. & Kondo, M. (1997) Beta 3-adrenoreceptor gene polymorphism: a newly identified risk factor for proliferative retinopathy in NIDDM patients. *Diabetes*, **46**, 1633-1636.
- Sakane, N., Yoshida, T., Yoshioka, K., Nakamura, Y., Umekawa, T., Kogure, A., Takakura, Y. & Kondo, M. (1998) Trp64Arg mutation of beta3-adrenoceptor gene is associated with diabetic nephropathy in Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, **41**, 1533-1534.
- Sakr Y., Dubois, M. J., De Backer, D., Creteur, J. & Vincent, J. L. (2004) Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med.*, **32**, 1825-1831.

- Sappington, P. L., Yang, R., Yang, H., Tracey, K. J., Delude, R. L. & Fink, M. P. (2002) HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology*, **123**, 790-802.
- Sarsero, D., Russell, F. D., Lynham, J. A., Rabnott, G., Yang, I., Fong, K. M., Li, L., Kaumann, A. J. & Molenaar, P. (2003) (-)-CGP 12177 increases contractile force and hastens relaxation of human myocardial preparations through a propranolol-resistant state of the beta 1-adrenoceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, **367**, 10-21.
- Sartiani, L., De Paoli, P., Stillitano, F., Aimond, F., Vassort, G., Mugelli, A. & Cerbai, E. (2006) Functional remodeling in post-myocardial infarcted rats: focus on beta-adrenoceptor subtypes. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **40**, 258-266.
- Sato, M., Hutchinson, D. S., Bengtsson, T., Floren, A., Langel, U., Horinouchi, T., Evans, B. A. & Summers, R. J. (2005) Functional domains of the mouse beta3-adrenoceptor associated with differential G protein coupling. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **315**, 1354-1361.
- Scalia, R., Armstead, V. E., Minchenko, A. G. & Lefer, A. M. (1999) Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion. *J.Exp.Med.*, **189**, 931-938.
- Schaeffer, P., Bernat, A., Arnone, M., Manara, L., Gallas, J. F., Dol-Gleizes, F., Millet, L., Grosset, A. & Herbert, J. M. (2006) Effect of SR58611A, a potent beta-3 adrenoceptor agonist, on cutaneous wound healing in diabetic and obese mice. *Eur.J.Pharmacol.*, **529**, 172-178.
- Schaller, M. D., Waeber, B., Nussberger, J. & Brunner, H. R. (1985) Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia. *Am.J.Physiol*, **249**, H1086-H1092.
- Scheen, A. J. (2001) [Pharma-clinics medication of the month. Nebivolol (Nobiten)]. *Rev.Med.Liege*, **56**, 788-791.
- Schiffelers, S. L., van Harmelen, V. J., de Grauw, H. A., Saris, W. H. & van Baak, M. A. (1999) Dobutamine as selective beta(1)-adrenoceptor agonist in in vivo studies on human thermogenesis and lipid utilization. *J.Appl.Physiol*, **87**, 977-981.
- Schmidt, W., Hacker, A., Gebhard, M. M., Martin, E. & Schmidt, H. (1998) Dopexamine attenuates endotoxin-induced microcirculatory changes in rat mesentery: role of beta2 adrenoceptors. *Crit Care Med.*, **26**, 1639-1645.
- Schneider, J., Fruh, C., Wilffert, B. & Peters, T. (1990) Effects of the selective beta 1-adrenoceptor antagonist, nebivolol, on cardiovascular parameters in the pithed normotensive rat. *Pharmacology*, **40**, 33-41.
- Schranz, D., Droege, A., Broede, A., Brodermann, G., Schafer, E., Oelert, H. & Brodde, O. E. (1993) Uncoupling of human cardiac beta-adrenoceptors during cardiopulmonary bypass with cardioplegic cardiac arrest. *Circulation*, **87**, 422-426.
- Schrier, R. W. & Wang, W. (2004) Acute renal failure and sepsis. *N.Engl.J.Med.*, **351**, 159-169.
- Schulz, A., Schoneberg, T., Paschke, R., Schultz, G. & Gudermann, T. (1999) Role of the third intracellular loop for the activation of gonadotropin receptors. *Mol.Endocrinol.*, **13**, 181-190.
- Schulz, R., Rassaf, T., Massion, P. B., Kelm, M. & Balligand, J. L. (2005) Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol.Ther.*
- Schwarte, L. A., Fournell, A., van Bommel, J. & Ince, C. (2005) Redistribution of intestinal microcirculatory oxygenation during acute hemodilution in pigs. *J.Appl.Physiol*, **98**, 1070-1075.
- Schwartz, D., Mendonca, M., Schwartz, I., Xia, Y., Satriano, J., Wilson, C. B. & Blantz, R. C. (1997) Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J.Clin.Invest*, **100**, 439-448.

- Secchi, A., Ortanderl, J. M., Schmidt, W., Walther, A., Gebhard, M. M., Martin, E. & Schmidt, H. (2001) Effects of dobutamine and dopexamine on hepatic micro- and macrocirculation during experimental endotoxemia: an intravital microscopic study in the rat. *Crit Care Med.*, **29**, 597-600.
- Seifert, R. & Wenzel-Seifert, K. (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, **366**, 381-416.
- Sellke, F. W., Tofukuji, M., Stamler, A., Li, J. & Wang, S. Y. (1997) Beta-adrenergic regulation of the cerebral microcirculation after hypothermic cardiopulmonary bypass. *Circulation*, **96**, II-10.
- Senger, D. R., Ledbetter, S. R., Claffey, K. P., Papadopoulos-Sergiou, A., Peruzzi, C. A. & Detmar, M. (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am.J.Pathol.*, **149**, 293-305.
- Sennitt, M. V., Kaumann, A. J., Molenaar, P., Beeley, L. J., Young, P. W., Kelly, J., Chapman, H., Henson, S. M., Berge, J. M., Dean, D. K., Kotecha, N. R., Morgan, H. K., Rami, H. K., Ward, R. W., Thompson, M., Wilson, S., Smith, S. A., Cawthorne, M. A., Stock, M. J. & Arch, J. R. (1998) The contribution of classical (beta1/2-) and atypical beta-adrenoceptors to the stimulation of human white adipocyte lipolysis and right atrial appendage contraction by novel beta3-adrenoceptor agonists of differing selectivities. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **285**, 1084-1095.
- Severn, A., Rapson, N. T., Hunter, C. A. & Liew, F. Y. (1992) Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *J.Immunol.*, **148**, 3441-3445.
- Shafiei, M., Omrani, G. & Mahmoudian, M. (2000) Coexistence of at least three distinct beta-adrenoceptors in human internal mammary artery. *Acta Physiol Hung.*, **87**, 275-286.
- Shah, A. M., Spurgeon, H. A., Sollott, S. J., Talo, A. & Lakatta, E. G. (1994) 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. *Circ.Res.*, **74**, 970-978.
- Shah, A. M. & MacCarthy, P. A. (2000) Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol.Ther.*, **86**, 49-86.
- Sharshar, T., Gray, F., Lorin, d. I. G., Hopkinson, N. S., Ross, E., Dorandeu, A., Orlikowski, D., Raphael, J. C., Gajdos, P. & Annane, D. (2003) Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet*, **362**, 1799-1805.
- Shen, Y. T., Zhang, H. & Vatner, S. F. (1994) Peripheral vascular effects of beta-3 adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **268**, 466-473.
- Shen, Y. T., Cervoni, P., Claus, T. & Vatner, S. F. (1996) Differences in beta 3-adrenergic receptor cardiovascular regulation in conscious primates, rats and dogs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **278**, 1435-1443.
- Sheu, W. H., Lee, W. J., Yao, Y. E., Jeng, C. Y., Young, M. M. & Chen, Y. T. (1999) Lack of association between genetic variation in the beta3-adrenergic receptor gene and insulin resistance in patients with coronary heart disease. *Metabolism*, **48**, 651-654.
- Shimizu, K. & McGrath, B. P. (1993) Sympathetic dysfunction in heart failure. *Baillieres Clin.Endocrinol.Metab*, **7**, 439-463.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, **359**, 843-845.
- Sibelius, U., Grandel, U., Buerke, M., Kiss, L., Klingenberger, P., Heep, M., Bournelis, E., Seeger, W. & Grimminger, F. (2003) Leukotriene-mediated coronary vasoconstriction and loss of myocardial contractility evoked by low doses of Escherichia coli hemolysin in perfused rat hearts. *Crit Care Med.*, **31**, 683-688.

- Siegemund, M., van Bommel, J., Schwarte, L. A., Studer, W., Girard, T., Marsch, S., Radermacher, P. & Ince, C. (2005) Inducible nitric oxide synthase inhibition improves intestinal microcirculatory oxygenation and CO₂ balance during endotoxemia in pigs. *Intensive Care Med.*, **31**, 985-992.
- Silva-Santos, J. E., Terluk, M. R. & Assreuy, J. (2002) Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. *Shock*, **17**, 70-76.
- Silverman, H. J., Penaranda, R., Orens, J. B. & Lee, N. H. (1993) Impaired beta-adrenergic receptor stimulation of cyclic adenosine monophosphate in human septic shock: association with myocardial hyporesponsiveness to catecholamines. *Crit Care Med.*, **21**, 31-39.
- Simons, M. & Ware, J. A. (2003) Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat.Rev.Drug Discov.*, **2**, 863-871.
- Simons, M. (2005) Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation*, **111**, 1556-1566.
- Sinaasappel, M., Donkersloot, C., van Bommel, J. & Ince, C. (1999) PO₂ measurements in the rat intestinal microcirculation. *Am.J.Physiol.*, **276**, G1515-G1520.
- Singel, D. J. & Stamler, J. S. (2005) Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. *Annu.Rev.Physiol.*, **67**, 99-145.
- Singer, M., De, S., Vitale, D. & Jeffcoate, W. (2004) Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*, **364**, 545-548.
- Sogawa, K., Numayama-Tsuruta, K., Ema, M., Abe, M., Abe, H. & Fujii-Kuriyama, Y. (1998) Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95**, 7368-7373.
- Soler, M., Camacho, M., Molins-Pujol, A. M. & Vila, L. (2001) Effect of an imidazolineoxyl nitric oxide on prostaglandin synthesis in experimental shock: possible role of nitrogen dioxide in prostacyclin synthase inactivation. *J.Infect.Dis.*, **183**, 105-112.
- Sooch, S. & Marshall, I. (1997) Atypical beta-adrenoceptors in the rat vasculature. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **812**, 211-212.
- Soriano, F. G., Nogueira, A. C., Caldini, E. G., Lins, M. H., Teixeira, A. C., Cappi, S. B., Lotufo, P. A., Bernik, M. M., Zsengeller, Z., Chen, M. & Szabo, C. (2006) Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med.*, **34**, 1073-1079.
- Spengler, R. N., Allen, R. M., Remick, D. G., Strieter, R. M. & Kunkel, S. L. (1990) Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J.Immunol.*, **145**, 1430-1434.
- Spiecker, M., Darius, H. & Liao, J. K. (2000) A functional role of I kappa B-epsilon in endothelial cell activation. *J.Immunol.*, **164**, 3316-3322.
- Spolarics, Z. & Meyenhofer, M. (2000) Augmented resistance to oxidative stress in fatty rat livers induced by a short-term sucrose-rich diet. *Biochim.Biophys.Acta*, **1487**, 190-200.
- Spronk, P. E., Ince, C., Gardien, M. J., Mathura, K. R., Oudemans-van Straaten, H. M. & Zandstra, D. F. (2002) Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet*, **360**, 1395-1396.
- Spronk, P. E., Zandstra, D. F. & Ince, C. (2004) Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care*, **8**, 462-468.

- Stangl, K., Cascorbi, I., Laule, M., Stangl, V., Meisel, C., Wernecke, K. D., Ziemer, S., Baumann, G., Roots, I. & Hauner, H. (2001) The beta3-adrenergic receptor Trp64Arg mutation is not associated with coronary artery disease. *Metabolism*, **50**, 184-188.
- Stasch, J. P., Becker, E. M., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Feurer, A., Gerzer, R., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schroder, H., Schroeder, W., Stahl, E., Steinke, W., Straub, A. & Schramm, M. (2001) NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*, **410**, 212-215.
- Steinberg, S. F. (1999) The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ.Res.*, **85**, 1101-1111.
- Steinle, J. J., Booz, G. W., Meininger, C. J., Day, J. N. & Granger, H. J. (2003) Beta 3-adrenergic receptors regulate retinal endothelial cell migration and proliferation. *J.Biol.Chem.*, **278**, 20681-20686.
- Steinle, J. J., Zamora, D. O., Rosenbaum, J. T. & Granger, H. J. (2005) Beta 3-adrenergic receptors mediate choroidal endothelial cell invasion, proliferation, and cell elongation. *Exp.Eye Res.*, **80**, 83-91.
- Sterin-Borda, L., Bernabeo, G., Ganzinelli, S., Joensen, L. & Borda, E. (2006) Role of nitric oxide/cyclic GMP and cyclic AMP in beta3 adrenoceptor-chronotropic response. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **40**, 580-588.
- Strazzullo, P., Iacone, R., Siani, A., Cappuccio, F. P., Russo, O., Barba, G., Barbato, A., D'Elia, L., Trevisan, M. & Farinaro, E. (2001) Relationship of the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenoceptor gene to central adiposity and high blood pressure: interaction with age. Cross-sectional and longitudinal findings of the Olivetti Prospective Heart Study. *J Hypertens.*, **19**, 399-406.
- Strieter, R. M., Burdick, M. D., Gomperts, B. N., Belperio, J. A. & Keane, M. P. (2005) CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **16**, 593-609.
- Strosberg, A. D. & Pietri-Rouxel, F. (1996) Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor. *Trends Pharmacol.Sci.*, **17**, 373-381.
- Strosberg, A. D. (1997) Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, **37**, 421-450.
- Summers, R. J., Kompa, A. & Roberts, S. J. (1997) Beta-adrenoceptor subtypes and their desensitization mechanisms. *J Auton.Pharmacol.*, **17**, 331-343.
- Sumpio, B. E., Riley, J. T. & Dardik, A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **34**, 1508-1512.
- Susulic, V. S., Frederich, R. C., Lawitts, J., Tozzo, E., Kahn, B. B., Harper, M. E., Himms-Hagen, J., Flier, J. S. & Lowell, B. B. (1995) Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J.Biol.Chem.*, **270**, 29483-29492.
- Suzuki, T., Morisaki, H., Serita, R., Yamamoto, M., Kotake, Y., Ishizaka, A. & Takeda, J. (2005) Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit Care Med.*, **33**, 2294-2301.
- Sylvestre, J.C., G. & Levy, B.I. (2002) Vasculogenèse et angiogenèse. Dans : Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux, édité par Flammarion., p. 463-470.
- Szabo, C., Thiemermann, C., Wu, C. C., Perretti, M. & Vane, J. R. (1994) Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **91**, 271-275.
- Szabo, C., Salzman, A. L. & Ischiropoulos, H. (1995) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett.*, **372**, 229-232.

- Tagaya, E., Tamaoki, J., Takemura, H., Isono, K. & Nagai, A. (1999) Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cyclic adenosine monophosphate-dependent pathway. *Lung*, **177**, 321-332.
- Tak, P. P. & Firestein, G. S. (2001) NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J.Clin.Invest*, **107**, 7-11.
- Takahashi, H., Yoshida, T., Nishimura, M., Nakanishi, T., Kondo, M. & Yoshimura, M. (1992) Beta-3 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.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K. & Shibuya, M. (2001) A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.*, **20**, 2768-2778.
- Takakura, K., Goto, Y., Kigoshi, S. & Muramatsu, I. (1994) Comparison between the effects of treatment in vitro and in vivo with lipopolysaccharide on responsiveness of rat thoracic aorta. *Circ.Shock*, **42**, 141-146.
- Takakura, K., Taniguchi, T., Muramatsu, I., Takeuchi, K. & Fukuda, S. (2002) Modification of alpha1 -adrenoceptors by peroxynitrite as a possible mechanism of systemic hypotension in sepsis. *Crit Care Med.*, **30**, 894-899.
- Takayama, S., Furukawa, Y., Ren, L. M., Inoue, Y., Sawaki, S. & Chiba, S. (1993) Positive chronotropic and inotropic responses to BRL 37344, a beta 3-adrenoceptor agonist in isolated, blood-perfused dog atria. *Eur J Pharmacol.*, **231**, 315-321.
- Tamaki, S., Iwai, N., Tsujita, Y., Nakamura, Y., Ohmichi, N. & Kinoshita, M. (1999) Variant of the beta3-adrenergic receptor gene and coronary atherosclerosis in Japanese subjects. *Int.J Cardiol.*, **69**, 309-311.
- Tamaoki, J., Tagaya, E., Isono, K. & Nagai, A. (1998) Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cAMP-dependent pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **248**, 722-727.
- Tang, C., Yang, J., Wu, L. L., Dong, L. W. & Liu, M. S. (1998) Phosphorylation of beta-adrenergic receptor leads to its redistribution in rat heart during sepsis. *Am.J.Physiol*, **274**, R1078-R1086.
- Tarui, T., Miles, L. A. & Takada, Y. (2001) Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, **276**, 39562-39568.
- Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., Shimada, K., Iwasaka, T. & Imaizumi, T. (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, **360**, 427-435.
- Taub, M., Wang, Y., Szczesny, T. M. & Kleinman, H. K. (1990) Epidermal growth factor or transforming growth factor alpha is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **87**, 4002-4006.
- Tavernier, B., Garrigue, D., Bouille, C., Vallet, B. & Adnet, P. (1998) Myofilament calcium sensitivity is decreased in skinned cardiac fibres of endotoxin-treated rabbits. *Cardiovasc.Res.*, **38**, 472-479.
- Tavernier, B., Mebazaa, A., Mateo, P., Sys, S., Ventura-Clapier, R. & Veksler, V. (2001) Phosphorylation-dependent alteration in myofilament ca²⁺ sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **163**, 362-367.
- Tavernier, B., Li, J. M., El Omar, M. M., Lanone, S., Yang, Z. K., Trayer, I. P., Mebazaa, A. & Shah, A. M. (2001) Cardiac contractile impairment associated with increased phosphorylation of troponin I in endotoxemic rats. *FASEB J.*, **15**, 294-296.
- Tavernier, G., Galitzky, J., Bousquet-Melou, A., Montastruc, J. L. & Berlan, M. (1992) The positive chronotropic effect induced by BRL 37344 and CGP 12177, two beta-3 adrenergic agonists, does not

- involve cardiac beta adrenoceptors but baroreflex mechanisms. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **263**, 1083-1090.
- Tavernier, G., Toumaniantz, G., Erfanian, M., Heymann, M. F., Laurent, K., Langin, D. & Gauthier, C. (2003) beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor. *Cardiovasc.Res.*, **59**, 288-296.
- Teixeira, C. E., Baracat, J. S., Zanesco, A., Antunes, E. & De Nucci, G. (2004) Atypical beta-adrenoceptor subtypes mediate relaxations of rabbit corpus cavernosum. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **309**, 587-593.
- Thaker, P. H., Han, L. Y., Kamat, A. A., Arevalo, J. M., Takahashi, R., Lu, C., Jennings, N. B., Armaiz-Pena, G., Bankson, J. A., Ravoori, M., Merritt, W. M., Lin, Y. G., Mangala, L. S., Kim, T. J., Coleman, R. L., Landen, C. N., Li, Y., Felix, E., Sanguino, A. M., Newman, R. A., Lloyd, M., Gershenson, D. M., Kundra, V., Lopez-Berestein, G., Lutgendorf, S. K., Cole, S. W. & Sood, A. K. (2006) Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat.Med.*, **12**, 939-944.
- Thomas, G. N., Tomlinson, B., Chan, J. C., Young, R. P. & Critchley, J. A. (2000) The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene and obesity in Chinese subjects with components of the metabolic syndrome. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, **24**, 545-551.
- Thomas, K. A. (1996) Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J.Biol.Chem.*, **271**, 603-606.
- Thuillez, C. & Richard, V. (2005) Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects. *J Hum.Hypertens.*, **19 Suppl 1**, S21-S25.
- Titheradge, M. A. (1999) Nitric oxide in septic shock. *Biochim.Biophys.Acta*, **1411**, 437-455.
- Toda, N. (2003) Vasodilating beta-adrenoceptor blockers as cardiovascular therapeutics. *Pharmacol.Ther.*, **100**, 215-234.
- Tonello, C., Giordano, A., Cozzi, V., Cinti, S., Stock, M. J., Carruba, M. O. & Nisoli, E. (1999) Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. *FEBS Lett.*, **442**, 167-172.
- Tonolo, G., Melis, M. G., Secchi, G., Atzeni, M. M., Angius, M. F., Carboni, A., Ciccarese, M., Malavasi, A. & Maioli, M. (1999) Association of Trp64Arg beta 3-adrenergic-receptor gene polymorphism with essential hypertension in the Sardinian population. *J Hypertens.*, **17**, 33-38.
- Torres, J., Darley-Usmar, V. & Wilson, M. T. (1995) Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. *Biochem.J*, **312 (Pt 1)**, 169-173.
- Trochu, J. N., Leblais, V., Rautureau, Y., Beverelli, F., Le Marec, H., Berdeaux, A. & Gauthier, C. (1999) Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br.J Pharmacol.*, **128**, 69-76.
- Trochu, J. N., Bouhour, J. B., Kaley, G. & Hintze, T. H. (2000) Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of cardiac oxygen metabolism: implications in health and disease. *Circ.Res.*, **87**, 1108-1117.
- Turner, N. C. & White, P. (1996) Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinaemic obese Zucker rats. *J Cardiovasc.Pharmacol.*, **27**, 884-890.
- Ulbrich, H., Eriksson, E. E. & Lindbom, L. (2003) Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol.Sci.*, **24**, 640-647.
- Umino, T., Kusano, E., Muto, S., Akimoto, T., Yanagiba, S., Ono, S., Amemiya, M., Ando, Y., Homma, S., Ikeda, U., Shimada, K. & Asano, Y. (1999) AVP inhibits LPS- and IL-1beta-stimulated NO and cGMP via V1 receptor in cultured rat mesangial cells. *Am.J.Physiol*, **276**, F433-F441.

- Uydes-Dogan, B. S., Nebigil, M., Aslamaci, S., Onuk, E., Kanzik, I. & Akar, F. (1996) The comparison of vascular reactivities of arterial and venous grafts to vasodilators: management of graft spasm. *Int.J.Cardiol.*, **53**, 137-145.
- Vallet, B. (2002) Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. *Crit Care Med.*, **30**, S229-S234.
- Van Bortel, L. M., de Hoon, J. N., Kool, M. J., Wijnen, J. A., Vertommen, C. I. & Van Nueten, L. G. (1997) Pharmacological properties of nebivolol in man. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, **51**, 379-384.
- van den Berg, B. M., Vink, H. & Spaan, J. A. (2003) The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ.Res.*, **92**, 592-594.
- van der Poll, T., Coyle, S. M., Barbosa, K., Braxton, C. C. & Lowry, S. F. (1996) Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J.Clin.Invest*, **97**, 713-719.
- van der Poll, T. & Lowry, S. F. (1997) Lipopolysaccharide-induced interleukin 8 production by human whole blood is enhanced by epinephrine and inhibited by hydrocortisone. *Infect.Immun.*, **65**, 2378-2381.
- Van Gieson, E. J. & Skalak, T. C. (2001) Chronic vasodilation induces matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression during microvascular remodeling in rat skeletal muscle. *Microcirculation.*, **8**, 25-31.
- van Hinsbergh, V. W., Collen, A. & Koolwijk, P. (2001) Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **936**, 426-437.
- van Kleef, E. M., Smits, J. F., De Mey, J. G., Cleutjens, J. P., Lombardi, D. M., Schwartz, S. M. & Daemen, M. J. (1992) Alpha 1-adrenoreceptor blockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA synthesis in the rat thoracic aorta and carotid artery. *Circ.Res.*, **70**, 1122-1127.
- van Spronsen, A., Nahmias, C., Krief, S., Briend-Sutren, M. M., Strosberg, A. D. & Emorine, L. J. (1993) The promoter and intron/exon structure of the human and mouse beta 3-adrenergic-receptor genes. *Eur J Biochem.*, **213**, 1117-1124.
- Varghese, P., Harrison, R. W., Lofthouse, R. A., Georgakopoulos, D., Berkowitz, D. E. & Hare, J. M. (2000) beta(3)-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin.Invest*, **106**, 697-703.
- Varma, D. R., Shen, H., Deng, X. F., Peri, K. G., Chemtob, S. & Mulay, S. (1999) Inverse agonist activities of beta-adrenoceptor antagonists in rat myocardium. *Br.J.Pharmacol.*, **127**, 895-902.
- Verhoeckx, K. C., Doornbos, R. P., Witkamp, R. F., van der, G. J. & Rodenburg, R. J. (2006) Beta-adrenergic receptor agonists induce the release of granulocyte chemotactic protein-2, oncostatin M, and vascular endothelial growth factor from macrophages. *Int.Immunopharmacol.*, **6**, 1-7.
- Viard, P., Macrez, N., Coussin, F., Morel, J. L. & Mironneau, J. (2000) Beta-3 adrenergic stimulation of L-type Ca(2+) channels in rat portal vein myocytes. *Br.J Pharmacol.*, **129**, 1497-1505.
- Victor, V. M., Rocha, M. & De la, F. M. (2004) Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int.Immunopharmacol.*, **4**, 327-347.
- Vieillard, B. A., Schmitt, J. M., Beauchet, A., Augarde, R., Prin, S., Page, B. & Jardin, F. (2001) Early preload adaptation in septic shock? A transesophageal echocardiographic study. *Anesthesiology*, **94**, 400-406.
- Vincent, J. L., Sakr, Y., Sprung, C. L., Ranieri, V. M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J. R. & Payen, D. (2006) Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.*, **34**, 344-353.
- Vo, P. A., Lad, B., Tomlinson, J. A., Francis, S. & Ahluwalia, A. (2005) autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. *J.Biol.Chem.*, **280**, 7236-7243.

- Vu, T. H. & Werb, Z. (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.*, **14**, 2123-2133.
- Wachulec, M., Peloso, E. & Satinoff, E. (1997) Individual differences in response to LPS and psychological stress in aged rats. *Am.J.Physiol*, **272**, R1252-R1257.
- Waeber, B. (2000) [Nebivolol: a beta blocker with vasodilator properties]. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.*, **89**, 631-633.
- Wahler, G. M. & Dollinger, S. J. (1995) Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am.J Physiol*, **268**, C45-C54.
- Wakatsuki, T., Nakaya, Y. & Inoue, I. (1992) Vasopressin modulates K(+) -channel activities of cultured smooth muscle cells from porcine coronary artery. *Am.J.Physiol*, **263**, H491-H496.
- Walston, J., Silver, K., Bogardus, C., Knowler, W. C., Celi, F. S., Austin, S., Manning, B., Strosberg, A. D., Stern, M. P., Raben, N. & . (1995) Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N.Engl.J Med.*, **333**, 343-347.
- Walston, J., Lowe, A., Silver, K., Yang, Y., Bodkin, N. L., Hansen, B. C. & Shuldiner, A. R. (1997) The beta3-adrenergic receptor in the obesity and diabetes prone rhesus monkey is very similar to human and contains arginine at codon 64. *Gene*, **188**, 207-213.
- Wang, C. & Martyn, J. A. (1996) Burn injury alters beta-adrenergic receptor and second messenger function in rat ventricular muscle. *Crit Care Med.*, **24**, 118-124.
- Wang, C., Mansard, A., Giummelly, P. & Atkinson, J. (2004) Decreased aortic smooth muscle contraction in a rat model of multibacterial sepsis. *Fundam.Clin.Pharmacol.*, **18**, 679-683.
- Wang, J. & Lenardo, M. J. (2000) Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J.Cell Sci.*, **113 (Pt 5)**, 753-757.
- Wang, P., Zhou, M., Rana, M. W., Ba, Z. F. & Chaudry, I. H. (1992) Differential alterations in microvascular perfusion in various organs during early and late sepsis. *Am.J.Physiol*, **263**, G38-G43.
- Wang, P. & Chaudry, I. H. (1996) Mechanism of hepatocellular dysfunction during hyperdynamic sepsis. *Am.J.Physiol*, **270**, R927-R938.
- Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., de Jager, T., Schwartz, P. J., Toubin, J. A., Moss, A. J., Atkinson, D. L., Landes, G. M., Connors, T. D. & Keating, M. T. (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat.Genet.*, **12**, 17-23.
- Warrillow, S., Egi, M. & Bellomo, R. (2006) Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study of a potassium channel blocker in patients with septic shock. *Crit Care Med.*, **34**, 980-985.
- Warth, J. D., Collier, M. L., Hart, P., Geary, Y., Gelband, C. H., Chapman, T., Horowitz, B. & Hume, J. R. (1996) CFTR chloride channels in human and simian heart. *Cardiovasc.Res.*, **31**, 615-624.
- Wei, W., Jin, H., Chen, Z. W., Zioncheck, T. F., Yim, A. P. & He, G. W. (2004) Vascular endothelial growth factor-induced nitric oxide- and PGI2-dependent relaxation in human internal mammary arteries: a comparative study with KDR and Flt-1 selective mutants. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **44**, 615-621.
- Weil, J., Benndorf, R., Fredersdorf, S., Griese, D. P. & Eschenhagen, T. (2003) Norepinephrine upregulates vascular endothelial growth factor in rat cardiac myocytes by a paracrine mechanism. *Angiogenesis.*, **6**, 303-309.
- Werstiuk, E. S. & Lee, R. M. (2000) Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can.J Physiol Pharmacol.*, **78**, 433-452.

- Wheeldon, N. M., McDevitt, D. G. & Lipworth, B. J. (1993) Investigation of putative cardiac beta 3-adrenoceptors in man. *Q.J.Med.*, **86**, 255-261.
- Wheeldon, N. M., McDevitt, D. G. & Lipworth, B. J. (1994) Cardiac effects of the beta 3-adrenoceptor agonist BRL35135 in man. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, **37**, 363-369.
- Whitfield, C., Kaniuk, N. & Frirdich, E. (2003) Molecular insights into the assembly and diversity of the outer core oligosaccharide in lipopolysaccharides from Escherichia coli and Salmonella. *J.Endotoxin.Res.*, **9**, 244-249.
- Wichterman, K. A., Baue, A. E. & Chaudry, I. H. (1980) Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J.Surg.Res.*, **29**, 189-201.
- Widen, E., Lehto, M., Kanninen, T., Walston, J., Shuldiner, A. R. & Groop, L. C. (1995) Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N.Engl.J.Med.*, **333**, 348-351.
- Wilson, M. F., Brackett, D. J., Tompkins, P., Benjamin, B., Archer, L. T. & Hinshaw, L. B. (1981) Elevated plasma vasopressin concentrations during endotoxin and E. coli shock. *Adv.Shock Res.*, **6**, 15-26.
- Wilson, R. F., Chiscano, A. D., Quadros, E. & Tarver, M. (1967) Some observations on 132 patients with septic shock. *Anesth.Analg.*, **46**, 751-763.
- Wilson, S., Chambers, J. K., Park, J. E., Ladurner, A., Cronk, D. W., Chapman, C. G., Kallender, H., Browne, M. J., Murphy, G. J. & Young, P. W. (1996) Agonist potency at the cloned human beta-3 adrenoceptor depends on receptor expression level and nature of assay. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **279**, 214-221.
- Winslow, E. J., Loeb, H. S., Rahimtoola, S. H., Kamath, S. & Gunnar, R. M. (1973) Hemodynamic studies and results of therapy in 50 patients with bacteremic shock. *Am.J.Med.*, **54**, 421-432.
- Wu, A. H. (2001) Increased troponin in patients with sepsis and septic shock: myocardial necrosis or reversible myocardial depression? *Intensive Care Med.*, **27**, 959-961.
- Wu, C. C., Liao, M. H., Chen, S. J., Chou, T. C., Chen, A. & Yen, M. H. (2000) Terbutaline prevents circulatory failure and mitigates mortality in rodents with endotoxemia. *Shock*, **14**, 60-67.
- Wu, C. C., Chen, S. J. & Garland, C. J. (2004) NO and KATP channels underlie endotoxin-induced smooth muscle hyperpolarization in rat mesenteric resistance arteries. *Br.J.Pharmacol.*, **142**, 479-484.
- Wu, K. K. & Thiagarajan, P. (1996) Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu.Rev.Med.*, **47**, 315-331.
- Wu, K. K. (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **962**, 122-130.
- Wu, L. L., Tang, C. & Liu, M. S. (1997) Hyper- and hypocardiodynamic states are associated with externalization and internalization, respectively, of alpha-adrenergic receptors in rat heart during sepsis. *Shock*, **7**, 318-323.
- Wu, W. Z., Sun, H. C., Shen, Y. F., Chen, J., Wang, L., Tang, Z. Y., Iliakis, G. & Liu, K. D. (2005) Interferon alpha 2a down-regulates VEGF expression through PI3 kinase and MAP kinase signaling pathways. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **131**, 169-178.
- Xiang, K., Jia, W., Lu, H., Zheng, T., Lu, J., Tang, J., Ding, W., Sun, D. & Li, J. (1998) [Effects of Trp64Arg mutation in the beta 3-adrenergic receptor gene on body fat, plasma glucose level, lipid profile, insulin secretion and action in Chinese]. *Zhonghua Yi.Xue.Yi.Chuan Xue.Za Zhi.*, **15**, 337-340.
- Xiao, R. P., Cheng, H., Zhou, Y. Y., Kuschel, M. & Lakatta, E. G. (1999) Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ.Res.*, **85**, 1092-1100.

- Xiao, R. P. (2001) Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci.STKE.*, **2001**, RE15.
- Xie, Y. W., Kaminski, P. M. & Wolin, M. S. (1998) Inhibition of rat cardiac muscle contraction and mitochondrial respiration by endogenous peroxynitrite formation during posthypoxic reoxygenation. *Circ.Res.*, **82**, 891-897.
- Xiu, L. L., Weng, J. P., Sui, Y., Wang, J., Yan, J. H. & Huang, Z. M. (2004) [Common variants in beta 3-adrenergic-receptor and uncoupling protein-2 genes are associated with type 2 diabetes and obesity]. *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.*, **84**, 375-379.
- Yamada, T., Fujino, T., Yuhki, K., Hara, A., Karibe, H., Takahata, O., Okada, Y., Xiao, C. Y., Takayama, K., Kuriyama, S., Taniguchi, T., Shiokoshi, T., Ohsaki, Y., Kikuchi, K., Narumiya, S. & Ushikubi, F. (2003) Thromboxane A2 regulates vascular tone via its inhibitory effect on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Circulation*, **108**, 2381-2386.
- Yamaguchi, N., Anand-Apte, B., Lee, M., Sasaki, T., Fukai, N., Shapiro, R., Que, I., Lowik, C., Timpl, R. & Olsen, B. R. (1999) Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J.*, **18**, 4414-4423.
- Yamamoto, K., Ikeda, U., Okada, K., Saito, T. & Shimada, K. (1997) Arginine vasopressin inhibits nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Hypertens.Res.*, **20**, 209-216.
- Yamamoto, M., Takeda, K. & Akira, S. (2004) TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol.Immunol.*, **40**, 861-868.
- Yamamoto, Y. & Gaynor, R. B. (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J.Clin.Invest*, **107**, 135-142.
- Yamaoka-Tojo, M., Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Dikalov, S. I., Chen, Y. E., Tojo, T., Fukai, T., Fujimoto, M., Patrushev, N. A., Wang, N., Kontos, C. D., Bloom, G. S. & Alexander, R. W. (2004) IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circ.Res.*, **95**, 276-283.
- Yang, R., Thomas, G. R., Bunting, S., Ko, A., Ferrara, N., Keyt, B., Ross, J. & Jin, H. (1996) Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **27**, 838-844.
- Yang, S., Cioffi, W. G., Bland, K. I., Chaudry, I. H. & Wang, P. (1999) Differential alterations in systemic and regional oxygen delivery and consumption during the early and late stages of sepsis. *J.Trauma*, **47**, 706-712.
- Yasuda, S. & Lew, W. Y. (1997) Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and beta-adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca²⁺ in cardiac myocytes. *Circ.Res.*, **81**, 1011-1020.
- Yasuhara, T., Shingo, T., Muraoka, K., Kameda, M., Agari, T., Wen, J. Y., Hayase, H., Hamada, H., Borlongan, C. V. & Date, I. (2005) Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.*, **1053**, 10-18.
- Yoshizumi, M., Perrella, M. A., Burnett, J. C., Jr. & Lee, M. E. (1993) Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ.Res.*, **73**, 205-209.
- Yousif, M. H. & Oriowo, M. A. (2002) BRL 37344 inhibited adrenergic transmission in the rat portal vein via atypical beta-adrenoceptors. *Pharmacol.Res.*, **45**, 313-317.
- Yu, J., deMuinck, E. D., Zhuang, Z., Drinane, M., Kauser, K., Rubanyi, G. M., Qian, H. S., Murata, T., Escalante, B. & Sessa, W. C. (2005) Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **102**, 10999-11004.

- Yu, M., Levy, M. M., Smith, P., Takiguchi, S. A., Miyasaki, A. & Myers, S. A. (1993) Effect of maximizing oxygen delivery on morbidity and mortality rates in critically ill patients: a prospective, randomized, controlled study. *Crit Care Med.*, **21**, 830-838.
- Yuan, S. Y. (2002) Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascul.Pharmacol.*, **39**, 213-223.
- Zanchetti, A. (2004) Clinical pharmacodynamics of nebivolol: new evidence of nitric oxide-mediated vasodilating activity and peculiar haemodynamic properties in hypertensive patients. *Blood Press Suppl.*, **1**, 17-32.
- Zellweger, R., Wichmann, M. W., Ayala, A., Stein, S., DeMaso, C. M. & Chaudry, I. H. (1997) Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Crit Care Med.*, **25**, 106-110.
- Zhang, C., Williams, M. A., Edwards, K. L. & Austin, M. A. (2005b) Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene, pre-pregnancy obesity and risk of pre-eclampsia. *J Matern.Fetal Neonatal Med.*, **17**, 19-28.
- Zhang, H. & Faber, J. E. (2001) Trophic effect of norepinephrine on arterial intima-media and adventitia is augmented by injury and mediated by different alpha1-adrenoceptor subtypes. *Circ.Res.*, **89**, 815-822.
- Zhang, H., De Jongh, R., De Backer, D., Cherkaoui, S., Vray, B. & Vincent, J. L. (2001) Effects of alpha - and beta -adrenergic stimulation on hepatosplanchnic perfusion and oxygen extraction in endotoxic shock. *Crit Care Med.*, **29**, 581-588.
- Zhang, H., Chalothorn, D., Jackson, L. F., Lee, D. C. & Faber, J. E. (2004) Transactivation of epidermal growth factor receptor mediates catecholamine-induced growth of vascular smooth muscle. *Circ.Res.*, **95**, 989-997.
- Zhang, R., Wang, L., Zhang, L., Chen, J., Zhu, Z., Zhang, Z. & Chopp, M. (2003) Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ.Res.*, **92**, 308-313.
- Zhang, S. J., Cheng, H., Zhou, Y. Y., Wang, D. J., Zhu, W., Ziman, B., Spurgoen, H., Lefkowitz, R. J., Lakatta, E. G., Koch, W. J. & Xiao, R. P. (2000) Inhibition of spontaneous beta 2-adrenergic activation rescues beta 1-adrenergic contractile response in cardiomyocytes overexpressing beta 2-adrenoceptor. *J.Biol.Chem.*, **275**, 21773-21779.
- Zhang, Z. S., Cheng, H. J., Onishi, K., Ohte, N., Wannenburg, T. & Cheng, C. P. (2005a) Enhanced inhibition of L-type Ca²⁺ current by beta3-adrenergic stimulation in failing rat heart. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **315**, 1203-1211.
- Zhou, S., Paz, O., Cao, J. M., Asotra, K., Chai, N. N., Wang, C., Chen, L. S., Fishbein, M. C., Sharifi, B. & Chen, P. S. (2005) Differential beta-adrenoceptor expression induced by nerve growth factor infusion into the canine right and left stellate ganglia. *Heart Rhythm.*, **2**, 1347-1355.
- Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerini, S., Granger, H. J., Maggi, C. A., Geppetti, P. & Ledda, F. (1994) Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J.Clin.Invest.*, **94**, 2036-2044.
- Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Granger, H. J. & Bicknell, R. (1997) Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J.Clin.Invest.*, **99**, 2625-2634.
- Zinyama, R. B., Bancroft, G. J. & Sigola, L. B. (2001) Adrenaline suppression of the macrophage nitric oxide response to lipopolysaccharide is associated with differential regulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Immunology*, **104**, 439-446.

ANNEXES

Articles de revue et chapitre d'ouvrages

[Arch Mal Coeur Vaiss.](#) 2003 Sep;96(9):905-13.

Place of beta 3-adrenoceptors among other beta-adrenoceptor subtypes in the regulation of the cardiovascular system.

- [Rozec B](#), [Noireaud J](#), [Trochu JN](#), [Gauthier C](#).

Laboratoire de physiopathologie et pharmacologie cellulaires et moléculaires, INSERM U533, Htel-Dieu, 1, place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes.

Knowledge of the sympathetic system is a basic element in the understanding of numerous physiological and physiopathological phenomena. In the two last decades, new pharmacological, biochemical and molecular tools have changed our approach to the roles of beta-adrenoceptors in the cardiovascular system. In the heart, the positive inotropic effect of predominant beta 1-adrenoceptor stimulation is classically recognised. Several studies reveal a significant physiological relevance of the beta 2-adrenoceptor which could activate different signalling pathways in addition to that of cAMP. Moreover, the detection of a third beta-adrenoceptor subtype, beta 3, in human heart, responsible for a negative inotropic effect through a NO signalling pathway, has changed the classically admitted paradigm on the regulation of heart function by the beta-adrenergic system. The identification of atypical beta-adrenoceptors, based on pharmacological tools, led to the discovery of "putative" beta 4-adrenoceptors, which constituted a low affinity state of the beta 1-adrenoceptors. In vessels, all beta-adrenoceptors subtypes, beta 1, beta 2 and beta 3, mediated a vasodilation, but the signalling pathway involved in this effect was variable according to their localization (endothelial or smooth muscle cells), the species and the vascular bed. beta-adrenoceptors are involved in several cardiovascular disease and could constitute a determinant therapeutic target. The efficiency of some beta-blockers used in the treatment of heart failure could result from action on beta 3-adrenoceptors. Moreover, a mutation of the beta-adrenoceptor subtype suggested a role in hypertension and diabetes mellitus.

PMID: 14571645 [PubMed - indexed for MEDLINE]

[Pharmacol Ther.](#) 2006 Sep;111(3):652-73. Epub 2006 Feb 15.

beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies.

- [Rozec B, Gauthier C.](#)

Inserm U533, L'institut du thorax, Nantes, France.

The sympathetic nervous system is central for the neurohumoral regulation of the cardiovascular system and is largely involved in many cardiovascular diseases affecting millions of people around the world. It is classically admitted that beta-adrenoceptors (beta-AR) of the beta1 and beta2 subtypes mediate the effects of catecholamines on the force of contraction of cardiac muscle, and on the relaxation of vascular smooth muscle. However, the molecular characterization in 1989 of a third beta-AR subtype, beta3, and later its identification in human heart has changed the classically admitted paradigm on the regulation of heart function by the beta-adrenergic system. In blood vessels, beta3-AR, like beta1 and beta2, produced a relaxation. But at the present time, the physiological role of beta3-AR is not clearly identified. Thus, the purpose of this review is to summarize the pharmacological and molecular evidence supporting the functional roles of beta3-AR in cardiovascular tissues of various species, including humans. In addition, this review discusses the potential role of beta3-AR in several cardiovascular diseases and emphasizes their putative involvement as new therapeutic targets.

PMID: 16480771 [PubMed - indexed for MEDLINE]

beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system

In ENDOTHELIAL CELLS AND HYPERTENSION
IOS edition

Chantal Gauthier, Camille Sèze-Goismier, Bertrand Rozec
Inserm U533

Les récepteurs β_3 -adrénergiques dans le système cardiovasculaire : rôles physiopathologiques et implications thérapeutiques.

Mon travail de thèse s'est articulé autour de plusieurs projets complémentaires concernant le récepteur β_3 -adrénergique (β_3 -AR) dans le système cardiovasculaire.

Nous avons identifié la présence de récepteurs β_3 -ARs sur l'endothélium de l'artère mammaire interne humaine, artère utilisée pour la revascularisation myocardique. Leur stimulation induit une vasodilatation dépendante de la voie du monoxyde d'azote (NO). Ces récepteurs pourraient avoir un intérêt dans la prévention du vasospasme après pontage aortocoronarien.

Actuellement, les cibles cellulaires des effets d'un β -bloquant de 3^{ème} génération efficace dans l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque, le nébivolol, étant mal connues, nous avons démontré qu'il active les récepteurs β_3 -ARs à la fois dans l'aorte thoracique de rat et dans le myocarde humain.

La surexpression du récepteur β_3 -AR grâce à un vecteur adénoviral conduit à des effets pro-angiogéniques dans différents modèles expérimentaux.

Dans le choc endotoxémique, la vasodilatation β_3 -AR est diminuée et peut être partiellement compensée par une potentialisation de la réponse induite par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs.

L'ensemble de ces résultats suggère un rôle potentiel des récepteurs β_3 -ARs dans différentes pathologies cardiovasculaires.

Mots clés : récepteur β_3 -adrénergique, vaisseaux, myocarde, endothélium, nébivolol, NO, insuffisance cardiaque, adénovirus, angiogenèse, endotoxémie

β_3 -adrenoceptors in cardiovascular system: physiological roles and therapeutics implications

My work of thesis was articulated around several complementary projects concerning the β_3 -adrenoceptor (β_3 -AR) in the cardiovascular system.

We identified the presence of β_3 -ARs on internal mammary artery endothelium, an artery used as graft for the myocardial revascularisation. Their stimulation induces a vasodilation dependent of nitric oxide (NO). These receptors could prevent vasospasm after coronary artery bypass surgery.

Currently, the cellular targets of a third generation β -blocker efficient in systemic hypertension and heart failure, nebivolol, being poorly characterised, we shown that it activates β_3 -ARs both in rat thoracic aorta and in human myocardium.

The overexpression of β_3 -AR by using an adenoviral vector, leads to pro-angiogenic effects in various angiogenesis assays.

In endotoxemic shock, the β_3 -AR induced vasodilation is decreased, and is partly compensated by β_1 - and β_2 -AR activity potentialisation.

Taken together these results highlight the potential role of β_3 -AR in various cardiovascular diseases.

Keywords: β_3 -adrenoceptor, vessels, myocardium, endothelium, nebivolol, NO, heart failure, adenovirus, angiogenesis, endotoxemia,

ROZEC Bertrand

INSERM U533-L'Institut du Thorax. Faculté de Médecine, 44093 Nantes, France.

Laboratoire de pharmacothérapie, Université Catholique de Louvain, 52 avenue Mounier, 1200 Bruxelles, Belgique.