



**HAL**  
open science

# Choc Septique: Défaillance Myocardique et Altérations des Relations Force-Fréquence et Relaxation-Fréquence

Olivier Joulin

► **To cite this version:**

Olivier Joulin. Choc Septique: Défaillance Myocardique et Altérations des Relations Force-Fréquence et Relaxation-Fréquence. Physiologie [q-bio.TO]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT: . tel-00459520

**HAL Id: tel-00459520**

**<https://theses.hal.science/tel-00459520>**

Submitted on 24 Feb 2010

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

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

**Université du Droit et de la Santé – Lille 2**  
**Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille**

*N° attribué par la bibliothèque*

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE  
pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2**  
Discipline : Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Par

Olivier JOULIN

Le 22 décembre 2009

**Choc Septique :**  
**Défaillance Myocardique et Altérations des Relations**  
**Force-Fréquence et Relaxation-Fréquence**

**Membres du Jury :**

Rapporteurs :	Professeur <b>Laurent ARGAUD</b>	(Lyon)
	Professeur <b>Michel SLAMA</b>	(Amiens)
Examineur :	Professeur <b>Benoît TAVERNIER</b>	(Lille)
Directeur de thèse :	Professeur <b>Rémi NEVIERE</b>	(Lille)

Ce travail a été réalisé au sein du :

Département de Physiologie - EA 2689

Faculté de Médecine - Pôle Recherche

1, place de Verdun

59045 Lille Cedex

sous la direction du Professeur Rémi Nevière

A Josette, Jacques, Andrée et Lucien.



## Remerciements

Mes remerciements vont tout particulièrement :

A mes parents qui m'ont toujours épaulé au cours de mes études et de mes choix professionnels et pour la confiance qu'ils m'ont toujours portée.

A ma famille qui subit mes absences répétées et en particulier à Marie-Hélène.

A mes amis avec qui j'ai le plaisir de partager mes moments libres et pour leur extrême disponibilité.

Au Professeur Rémi Nevière pour son invitation il y a dix ans au sein de son équipe, son accueil chaleureux et pour l'assistance qu'il m'a offert tout au long de ces années.

Au Professeur Benoît Vallet pour la confiance qu'il m'a accordé et pour l'attention qu'il porte à ma place au sein de son service.

Aux Professeurs Chopin et Fourrier qui m'ont donné le gout pour la réanimation.

A mes collègues du service de chirurgie thoracique et en particulier à Catherine, Emmanuel, Jacques et Nathalie qui malgré la charge de travail ont réussi à m'allouer le temps nécessaire à la réalisation de cette thèse.

Aux internes qui me donnent l'occasion de partager ce que les plus anciens m'ont donné et qui maintiennent ma curiosité en éveil par leurs questions perspicaces.

Aux membres du laboratoire de physiologie de Lille et en particulier à Sidi, Steve, Sylvestre, Brigitte et Xavier pour l'assistance qu'ils m'ont porté dans la réalisation de ce travail.

Aux Professeurs Argaud, Slama et Tavernier pour avoir accepté la charge d'évaluer ce travail.

La science est toujours utile, on ne perd pas le temps employé à l'acquérir.

Proverbe Chinois

# Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières.....	5
Abréviations .....	9
Liste des Figures.....	12
Liste des tableaux .....	16
Résumé.....	17
Abstract.....	17
1 Introduction.....	18
2 Le Couplage Excitation-Contraction Myocardique.....	20
2.1 Le Cardiomyocyte : une « machine à contraction ».....	20
2.2 Du signal électrique à la force mécanique.....	22
2.2.1 Canaux calciques de type L.....	23
2.2.2 Le réticulum sarcoplasmique et le récepteur à la ryanodine .....	23
2.2.3 L'appareil contractile du cardiomyocyte .....	24
2.2.4 De l'interaction biochimique à la génération d'une force motrice .....	26
2.3 La relaxation du cardiomyocyte .....	27
2.3.1 Initiation de la relaxation .....	27
2.3.2 Elimination du calcium cytosolique et relaxation .....	28
3 La Relation Force-Fréquence.....	31
3.1 Description Clinique et fonctionnelle.....	32

3.2	Mécanismes de la relation force-fréquence .....	35
3.2.1	Calcium intra-cytoplasmique et FFR .....	35
4	La Relation Relaxation-Fréquence .....	53
4.1	Présentation clinique et fonctionnelle .....	53
4.2	Mécanismes impliqués dans la relation relaxation-fréquence .....	55
4.2.1	Élimination du calcium cytoplasmique .....	56
4.2.2	Sensibilité des myofibrilles au calcium.....	66
4.3	Conclusion sur FDAR .....	68
5	Régulation Sympathique et Parasympathique de la Fonction Cardiaque.....	70
5.1	Organisation anatomique du système nerveux autonome.....	70
5.2	Neurotransmission du système nerveux autonome.....	71
5.2.1	Récepteurs catécholaminergiques du myocarde .....	72
5.3	Régulation parasympathique.....	78
5.4	Différences entre effet adrénérgique et effet fréquence .....	79
6	Défaillance myocardique septique.....	82
6.1	Caractérisation de la dysfonction myocardique septique.....	82
6.1.1	Mesure du débit cardiaque et de la pression veineuse centrale .....	83
6.1.2	Apports du cathétérisme artériel pulmonaire.....	84
6.1.3	Application des techniques de scintigraphie ventriculaire .....	85
6.1.4	Intérêt de l'échocardiographie.....	86
6.1.5	Marqueur biologique de la dysfonction myocardique septique.....	88
6.2	Phénomènes induisant la défaillance myocardique septique .....	91

6.2.1	La théorie ischémique .....	91
6.2.2	L'endotoxine bactérienne .....	93
6.2.3	Le facteur dépresseur myocardique circulant .....	99
6.2.4	Les cytokines pro-inflammatoire (second messagers du signal LPS) .	101
6.2.5	Le stress radicalaire .....	106
6.3	Mécanismes cellulaires intrinsèques aboutissant à la dysfonction myocardique .....	112
6.3.1	Altération de la signalisation adrénérgique au cours du sepsis.....	112
6.3.2	Modification des flux calciques.....	115
6.3.3	Altération de l'appareil contractile .....	119
6.3.4	Modifications des phosphorylation / déphosphorylation .....	121
6.3.5	La dysfonction mitochondriale.....	123
6.3.6	L'apoptose myocardique septique et la voie des caspases .....	125
7	Objectifs du Travail.....	134
8	Résultats .....	135
8.1	Article 1 : Ventricular Myocyte Caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction, Circulation 2005 .....	135
8.2	Article 2 : Cytokine Profile of Human Septic Shock Serum Inducing Cardiomyocyte Contractile Dysfunction, Physiological Research 2007 .....	146
8.2.1	Résultats non publiés.....	155
8.3	Article 3 : Cardiac force-frequency relationship and frequency-dependent acceleration of relaxation are impaired in LPS-treated rats, Critical Care 2009..	157
8.3.1	Résultats non publiés.....	169

9	Discussion .....	172
9.1	Altération fonctionnelles myocardiques .....	172
9.2	Médiateurs circulants de la dysfonction myocardique septique .....	173
9.3	Mécanismes impliqués dans la dysfonction myocardique .....	175
9.4	FFR et sepsis .....	176
9.5	FDAR et sepsis.....	178
9.6	Mécanismes de la tachycardie septique.....	179
9.7	Evaluation de la fonction diastolique myocardique .....	181
10	Conclusion.....	183
11	Références bibliographiques .....	184

## Abréviations

Une préférence a été donnée aux abréviations anglo-saxonnes afin de permettre une continuité entre le manuscrit et les articles mentionnés dans la bibliographie. Les traductions anglaises sont ici présentées entre parenthèse.

ACh : Acétylcholine

AMPc : Adénosine Mono-Phosphate cyclique

AR : adrénorécepteur

AIP : Autocamide-2 related Inhibitory Peptide

CAD : (*Caspase Activated DNase*)

CaMKII : Calcium Calmoduline Protéine Kinase II (Calcium Calmodulin Protein Kinase II)

DD : Domaine intracellulaire des récepteurs de mort (Death Domain)

DED : (Death Effector Domain)

DHPR : récepteur aux dihydropyridines = canal calcique de type L (Dihydropyridine Receptor)

FADD : (Fas-Associated Death Domain)

FFR : Relation Force Fréquence (Force-Frequency Relationship)

FDAR : Accélération de la Relaxation dépendant de la Fréquence (Frequency Dependent Acceleration of Relaxation)

GMPc : Guanosyl Mono-Phosphate cyclique

HCN : Canal activé par l'hyperpolarisation sensible aux nucléotides cycliques et non sélectif aux cations (Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel)

ICAD : (*Inhibitor of Caspase-Activated DNase*)

IFN : Interferon

IL : Interleukine

IP3 : phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate

LBP : Protéine liant le lipopolysaccharide (LPS Binding Protein)

LPS : Lipopolysaccharide

LVDP : Pression développée par le ventricule gauche (Left Ventricle Developed Pressure)

MLC2 : Chaîne légère régulatrice de la myosine de type 2 (Myosin regulatory Light Chain 2)

MLCK : Kinase de la chaîne légère de la myosine (Myosin Light Chain Kinase)

MLCP : Phosphatase de la chaîne légère de la myosine (Myosin Light Chain Phosphatase)

NCX : Echangeur Sodium Calcium (Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger)

NF-κB : Facteur nucléaire – kappa B (Nuclear Factor of immunoglobulin κ light-chain in B cells)

NLS : Séquence du signal d'adressage intranucléaire (Nuclear Localisation Sequence)

NO : Monoxide d'azote (Nitric Oxyde)

NOS : NO Synthase

PARP : Poly ADP Ribose Polymérase

PP : Protéine Phosphatase (Protein Phosphatase)

PVC : Pression Veineuse Centrale

RNS : Espèces réactives de l'azote (Reactive Nitrogen Species )



ROS : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

RyR : Canal Calcique Sarcoplasmique sensible à la Ryanodine (Ryanodine Receptor)

SR : Réticulum Sarcoplasmique (Sarcoplasmic Reticulum)

SERCA2a : Calcium ATPase Sarcoplasmique 2a (Sarco(endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase 2a)

SNOs : S-nitrosothiols

SOD : SuperOxide Dismutase

TLR : Récepteur de type Toll (Toll Like Receptor)

TNF : Facteur de necrose tumorale (Tumor Necrosis Factor)

TnI : Troponine I (Troponin I)

TnT : troponine T (Troponin T)

TRADD : (TNFR-1-Associated Death Domain)

UCP : Proteines de découplage (UnCoupling Protein)

## Liste des Figures

Figure 1 : Le cardiomyocyte de la fibre jusqu'aux protéines contractiles .....	21
Figure 2 : Flux calciques au sein du cardiomyocyte .....	22
Figure 3 : Sarcomère .....	25
Figure 4 : Protéines de l'appareil contractile .....	25
Figure 5 : Interposition du complexe troponine-tropomyosine et action du calcium..	26
Figure 6 : Génération de la force contractile par l'interaction entre actine et myosine .....	27
Figure 7 : Couplage excitation-contraction .....	30
Figure 8 : Relation force-fréquence .....	31
Figure 9 : Cardiomyocytes isolés.....	32
Figure 10 : Schéma représentant la mesure de force contractile sur fibre musculaire. ....	33
Figure 11 : mesure de pression développée sur cœur isolé perfusé .....	33
Figure 12 : Evaluation échocardiographique et doppler de la fonction ventriculaire .	34
Figure 13 : Mesure de la force contractile et des transitoires calciques selon la fréquence.....	37
Figure 14 : Calmoduline.....	43
Figure 15 : CaMKII, conformation, action de la calmoduline et autophosphorylation	46
Figure 16 : Activité fréquence dépendante de CaMKII .....	47
Figure 17 : Inhibition de la relation force fréquence par des inhibiteurs de calmoduline. ....	48

Figure 18 : Mécanismes intra-cardiomyocytaires de la relation force fréquence .....	52
Figure 19 : Accélération fréquence dépendante de la relaxation .....	54
Figure 20 : Nécessité du bon fonctionnement du reticulum sarcoplasmique pour FDAR.....	57
Figure 21 : Représentation schématique de séquences protéiques du phospholamban .....	58
Figure 22 : Mécanisme d'action du phospholamban .....	59
Figure 23 : Phosphorylation fréquence dépendante du phospholamban.....	61
Figure 24 : Effet de la fréquence de stimulation sur la phosphorylation par CaMKII des membranes de SR .....	63
Figure 25 : Dissociation temporelle de la diminution de tau et de la phosphorylation de PLB sur Thr17 .....	64
Figure 26 : Sensibilité des myofibrilles au calcium .....	67
Figure 27 : Mécanismes intra-cardiomyocytaires de la relation relaxation fréquence	69
Figure 28 : Contingents sympathique et parasympathique du système nerveux autonome.....	71
Figure 29 : Effet de l'acétyl-choline et de la stimulation beta-adrénergique sur le potentiel d'action du nœud sinusal et la fréquence cardiaque .....	76
Figure 30 : Mécanismes d'activation, de désensibilisation et d'internalisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	78
Figure 31 : Relation entre relaxation et phosphorylation en Ser16 et Thr17 de phospholamban .....	81
Figure 32 : Relation de Frank-Starling et précharge dépendance .....	84
Figure 33 : Relation de Frank-Starling pour les patients septiques avec ou sans choc .....	86

Figure 34 : Hypothèse d'une lésion myocardique réversible selon Wu. ....	90
Figure 35 : Débit coronaire chez les patients septique .....	92
Figure 36 : Structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives.....	94
Figure 37 : Transduction intracellulaire du signal induit par le lipopolysaccharide....	96
Figure 38 : Mode d'action de la voie du NF- $\kappa$ B.....	98
Figure 39 : Effet du sérum de patient en choc septique sur la contractilité de cardiomyocytes.....	100
Figure 40 : Voies de signalisation du TNF- $\alpha$ .....	105
Figure 41 : Localisation dans le cardiomyocyte de la production de ROS et RNS .	108
Figure 42 : Origine mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène et principaux systèmes enzymatiques anti-oxydants .....	109
Figure 43 : Différents effets du sepsis sur la régulation adrénergique de la fonction myocardique .....	114
Figure 44 : Flux calciques dans le cardiomyocyte et effet du sepsis .....	115
Figure 45 : Effet du sepsis sur la recapture calcique par SERCA.....	117
Figure 46 : Fuite de calcium par le reticulum sarcoplasmique et endotoxine.....	118
Figure 47 : Atteinte structurelle du cardiomyocyte lors du sepsis. ....	121
Figure 48 : Régulation intrinsèque de la force contractile cardiaque par les protéines kinases et phosphatases. ....	122
Figure 49 : Mitochondries et effets du sepsis .....	125
Figure 50 : visualisation de l'apoptose nucléaire dans le myocarde .....	127
Figure 51 : Activation de l'apoptose par les voies intrinsèque et extrinsèque.....	131
Figure 52: Effet du plasma de patients septiques sur l'index de vitesse de relaxation .....	155

Figure 53 : Recapture calcique par le réticulum, activité phosphatase et effet de caspase-3.....	169
Figure 54 : Clivage des protéines du réticulum par caspase-3.....	170
Figure 55 : Clivage de PP2A au cours de l'endotoxémie.....	171
Figure 56 : Relation force-fréquence et sepsis d'après Ren et al. ....	177
Figure 57 : Effet du baroreflex sur la fréquence cardiaque et l'activité du nerf sympathique cardiaque et modifications par le sepsis.....	180

## Liste des tableaux

Tableau 1 : cibles protéiques de la calmoduline .....	44
Tableau 2 : Publications sur l'augmentation de troponine dans la dysfonction myocardique septique.....	90
Tableau 3 : Médiateurs potentiellement impliquées dans la dysfonction myocardique septique .....	101
Tableau 4 : Mécanismes à l'origine de la baisse des transitoires calciques induite par certaines cytokines pro-inflammatoires.....	103
Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des différents types de mort cellulaire. ....	126
Tableau 6 : Différentes caspases classés par sous groupes.....	128

## Résumé

L'état de choc septique est une des principales causes de mortalité hospitalière. Il est caractérisé par une vasoplégie, une tachycardie et s'y associe une défaillance myocardique chez de nombreux patients. Physiologiquement, la tachycardie est non seulement à l'origine d'une augmentation du débit par la multiplication des cycles cardiaques mais elle a de plus des effets propres qui augmentent la contractilité et la relaxation ventriculaire. Ces phénomènes sont appelés relation force-fréquence (FFR) et accélération de la relaxation par la fréquence (FDAR). La défaillance myocardique septique est caractérisée par une altération de la contractilité myocardique mais également par des modifications de la relaxation ventriculaire.

Dans un premier temps notre travail a consisté à mettre en évidence la défaillance contractile cardiaque dans un modèle de choc septique par injection d'endotoxine. Il met également en avant l'implication de l'activation des caspases (protéases participant à la voie de l'apoptose) comme étant un des mécanismes de cette défaillance. Ensuite nous avons mis en avant le rôle de médiateurs circulants dans l'apparition de cette dysfonction. L'identité de ces médiateurs est probablement cytokinique.  $TNF-\alpha$  et  $IL-1\beta$  ont déjà montré leur capacité à induire cette dysfonction mais dans notre modèle ils n'ont pas été nécessaires à son apparition, d'autres cytokines pourraient être impliquées. Enfin nous avons mis en évidence que cette dysfonction myocardique septique était associée à une altération de FFR et de FDAR et que cette particularité pourrait être liée à une augmentation de l'activité de phosphatases cardiomyocytaires.

L'apport de ces connaissances supplémentaires sur les mécanismes impliqués dans le choc septique ne permet pas de modification directe du traitement à proposer aux patients septiques, mais il ouvre de nouvelles voies d'investigation qui pourraient permettre une amélioration des stratégies thérapeutiques du choc septique.

## Abstract

Septic shock is a major cause of mortality in hospital. It is characterized by vasoplegia, tachycardia and by myocardial dysfunction for many patients. Physiologically, tachycardia raises cardiac output by multiplying cardiac cycles but it also has its own effects that raise ventricle contractility and relaxation. These phenomenons are named force-frequency relationship (FFR) and frequency dependant acceleration of relaxation (FDAR). Septic myocardial dysfunction is characterized by alterations of myocardial contractility and also by modifications of ventricular relaxation.

In the first part of this study, we showed that cardiac dysfunction is present in our septic shock model induced by injected endotoxin. It also reveals that caspase (proteases involved in the apoptosis pathway) activation takes part in the development of this dysfunction. Next, we investigated the role of circulating mediators in the onset of this dysfunction. Identity of these mediators is probably cytokinic.  $TNF-\alpha$  and  $IL-1\beta$  have already shown their ability to induce such a dysfunction but in our model they were not necessary to induce it, and other cytokines might be involved. At last we showed that septic myocardial dysfunction present alteration of FFR and FDAR and that this phenomenon may be linked to the increase of myocardial phosphatases.

Thus, these new knowledge of septic shock mechanisms doesn't allow direct modification of treatment for septic patients, but they point new investigation fields that could tend to improve therapeutic strategies of septic shock.

# 1 INTRODUCTION

On appelle sepsis, le syndrome de réaction inflammatoire systémique en réponse à une infection. Le sepsis sévère correspond à la survenue d'une défaillance d'une grande fonction associée au sepsis, le choc septique est la défaillance circulatoire définie par une hypotension artérielle malgré un remplissage vasculaire bien conduit <sup>[1]</sup>. Le sepsis sévère et le choc septique sont parmi les premières causes de mortalité chez les patients admis en réanimation. L'incidence du sepsis aux Etats-Unis a été évaluée à 750000 cas par an, ce qui correspond à une mortalité de 210000 cas par an <sup>[2]</sup>. Malgré de nombreuses nouvelles connaissances physiopathologiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques, la mortalité du sepsis sévère et du choc septique reste élevée <sup>[3]</sup>. Une étude française a évalué que le choc septique est la cause d'admission en réanimation pour 8,4% des cas, avec une mortalité de 60% <sup>[4]</sup>.

Le choc septique est caractérisé par une hypotension artérielle. Celle-ci est la conséquence d'une importante vasodilatation périphérique entraînant une hypovolémie à laquelle participe également l'augmentation de la perméabilité capillaire <sup>[5]</sup>. Dans ce contexte on constate de fréquentes perturbations de la fonction myocardique et chez certains patients apparaît une véritable défaillance cardiaque liée au sepsis.

La dysfonction myocardique septique a deux composantes : une altération de la force contractile d'une part et une perturbation de la relaxation myocardique d'autre part. La dysfonction myocardique septique n'est pas présente chez tous les patients <sup>[6, 7]</sup>, alors que la dysfonction diastolique, de découverte plus récente, semble être plus fréquente dans le choc septique <sup>[8, 9]</sup>.

La tachycardie retrouvée dans le sepsis est souvent considérée comme un mécanisme permettant le maintien du débit cardiaque malgré l'hypovolémie et la



dysfonction systolique et diastolique du myocarde. Cette augmentation du débit cardiaque par la tachycardie est un élément majeur du maintien de la bonne perfusion tissulaire.

Mais l'augmentation de la fréquence cardiaque a également ses effets propres sur la contractilité et la relaxation ventriculaire <sup>[10]</sup>. Une corrélation est physiologiquement retrouvée entre la variation de fréquence et la force contractile, c'est la relation force-fréquence, la relation entre la fréquence et la relaxation est appelée accélération fréquence dépendante de la relaxation. Ces relations sont liées à la variation de fréquence elle-même et non à l'effet combiné d'un stimulus sur la fréquence et la contractilité, comme on peut observer avec la stimulation bêta-adrénergique.

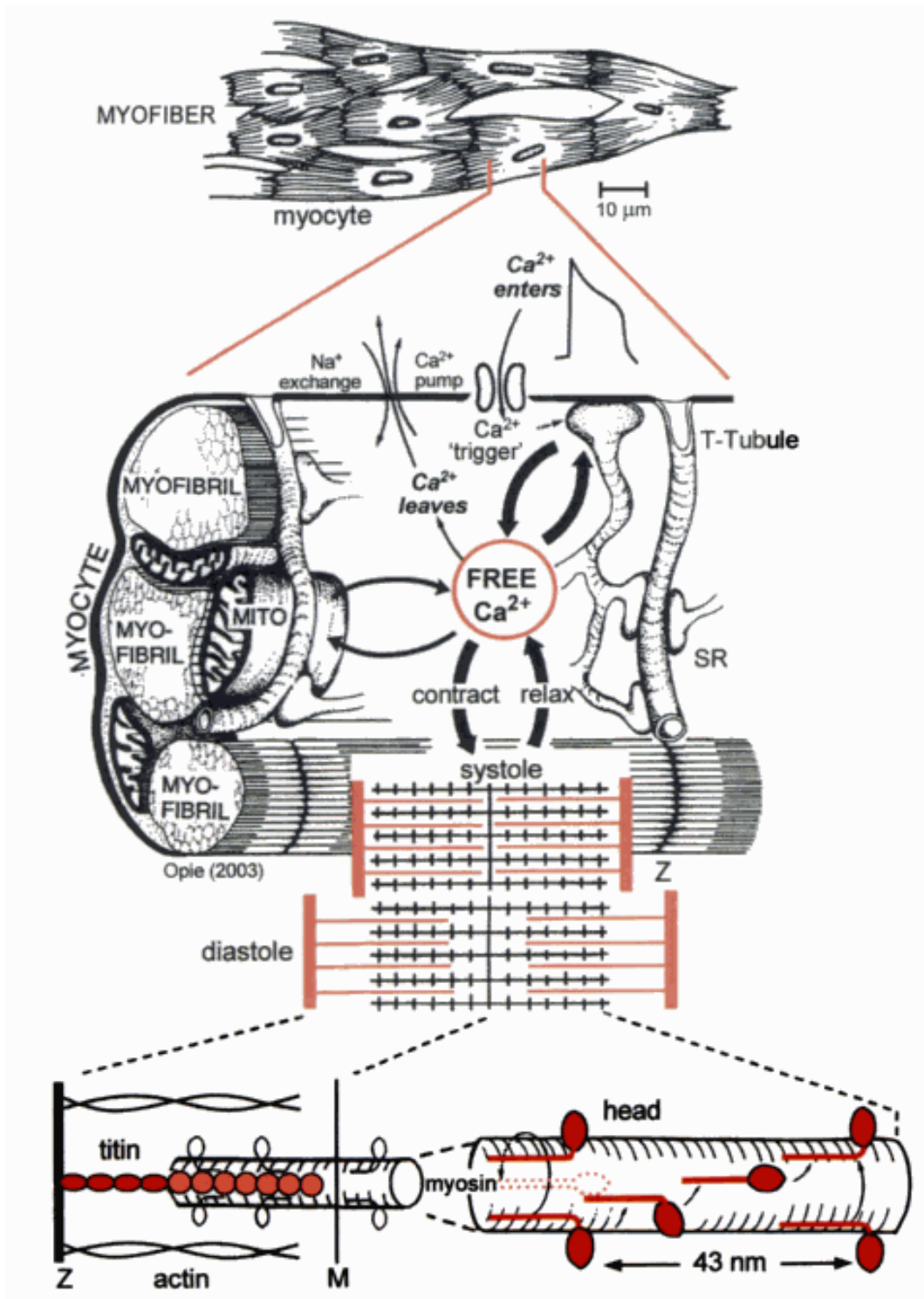
Ces mécanismes physiologiques participent au maintien du débit cardiaque en cas de tachycardie. La question du bon fonctionnement de ces mécanismes dans le sepsis se pose donc. En effet la performance ventriculaire étant déjà altérée au cours du choc septique et la tachycardie étant quasi constante les relations force fréquence et relaxation fréquence aurait un rôle particulièrement important à jouer dans le choc septique.

Notre travail a donc consisté d'une part à caractériser la dysfonction myocardique septique. D'autre part nous avons recherché les mécanismes impliqués dans cette défaillance. L'activation des voies caspases myocardique a particulièrement été explorée. Nous avons également constaté que les altérations fonctionnelles cardiaques sont induites par un ou des médiateurs sériques. Enfin nous avons exploré les relations force-fréquence et relaxation fréquence au cours de l'endotoxémie et nous avons donné quelques éléments sur le mécanisme de leur survenue.

## **2 LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION MYOCARDIQUE**

### **2.1 Le Cardiomyocyte : une « machine à contraction »**

Le cœur est constitué pour 75% de cellules contractiles : les cardiomyocytes. Le reste étant composé de tissu conducteur, de structures vasculaires et d'espace extracellulaire [5, 11]. Le myocarde est un muscle strié et sa structure présente de nombreuses analogies avec le muscle squelettique. Il présente des fibres contractiles organisées en faisceaux les myofibrilles dont la superstructure donne un aspect strié en microscopie. La membrane cytoplasmique également appelée sarcolemme présente des invaginations appelées tubules T en étroite relation avec le réticulum sarcoplasmique, les nombreuses mitochondries du myocyte et les myofibrilles. Ils permettent la proximité entre les organelles intracellulaire et le milieu extracellulaire. Les myofibrilles sont des faisceaux de protéines contractiles organisées en un enchevêtrement de filaments d'actine et de myosine dont l'unité fonctionnelle est appelée le sarcomère (figure 1).

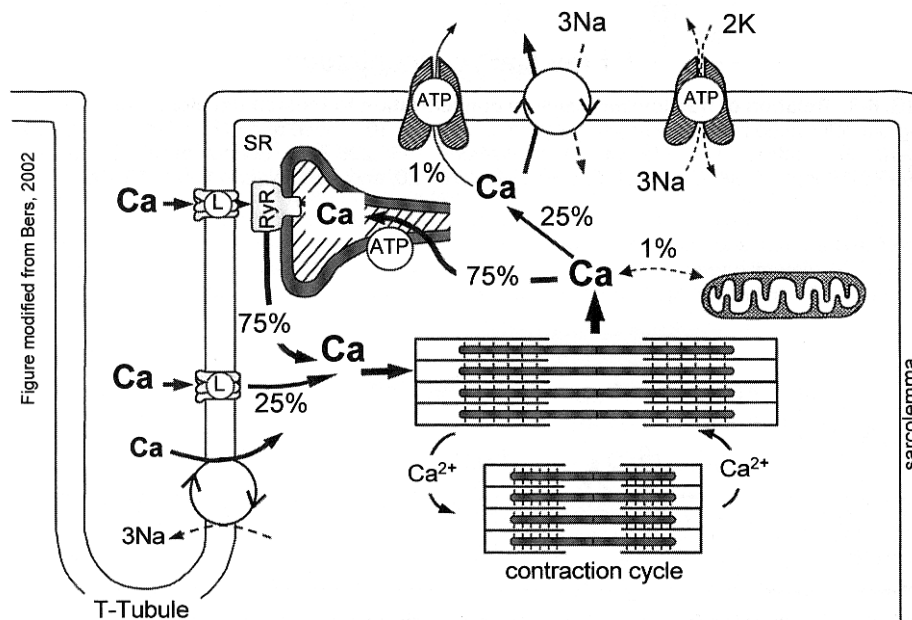


**Figure 1 : Le cardiomyocyte de la fibre jusqu'aux protéines contractiles**

Représentation, de haut en bas, de niveau d'agrandissement croissants de la structure des cardiomyocytes. La fibre myocardique présente un agencement particulier des cardiomyocytes. Le cardiomyocyte présente à son niveau une structure permettant grâce aux tubules T une proximité entre le milieu extérieur, le réticulum sarcoplasmique, les myofibrilles et les mitochondries. En bas on peut voir l'agencement des protéines contractiles au sein des unités contractiles des myofibrilles que sont les sarcomères. D'après <sup>[11]</sup>.

## 2.2 Du signal électrique à la force mécanique

Le couplage excitation-contraction est le mécanisme par lequel l'excitation électrique du cardiomyocyte va entraîner une réaction biochimique à l'origine de l'interaction entre les filaments de protéines contractiles qui sera à l'origine de la contraction générant une force mécanique. Dans ce processus l'ion Calcium présente un rôle prédominant puisqu'il fait être un vecteur du signal, mais également un substrat indispensable à la production de la force contractile (figure 2).



**Figure 2 : Flux calciques au sein du cardiomyocyte**

Les mouvements des ions calcium se font à travers la membrane plasmique mais des échanges se font également entre les différents compartiments cellulaires. La présence de calcium au niveau cytosolique permet sont interaction avec l'appareil contractile et la génération de la contraction. Les principaux acteurs des flux de calcium sont ici représentés ainsi que leur participation relative dans les flux entrants ou sortants de calcium. ATP : adénosine triphosphate, L : canal calcique voltage dépendant de type L, RyR : récepteur canal sarcoplasmique sensible à la ryanodine. D'après <sup>[11]</sup>.

### **2.2.1 Canaux calciques de type L**

Sous l'influence de la dépolarisation de la membrane plasmique les canaux sodiques voltage dépendant vont rapidement changer de conformation permettant leur ouverture et l'entrée de sodium (Na) qui va majorer la dépolarisation membranaire. Les canaux calciques voltage dépendant de type L vont alors à leur tour s'ouvrir permettant une entrée de calcium dans le cytosol, c'est le courant calcium entrant (I<sub>Ca</sub>). Les canaux calciques voltages dépendant de type L se situent au niveau de la membrane plasmique mais en particulier au niveau des tubules T permettant une plus grande proximité avec le réticulum sarcoplasmique (SR).

### **2.2.2 Le réticulum sarcoplasmique et le récepteur à la ryanodine**

Le SR joue un rôle central dans la fonction contractile du cardiomyocyte : 1) c'est le réservoir calcique principal de la cellule, 2) il libère le calcium dans le cytosol pour assurer la contraction 3) il assure la recapture du calcium pour entraîner la relaxation. Le SR a donc des rapports étroits avec les tubules T qui forment un réseau au sein du cardiomyocyte. En effet le SR présente des récepteurs calciques localisées à proximité des tubules T et entrant en interaction avec celui-ci par une partie intracytosolique de la protéine, ce sont les récepteurs calciques sarcoplasmiques sensibles à la ryanodine de type II (RyR). Cette portion intracytoplasmique du RyR appelée pied de la molécule est le site de nombreuses fonction notamment de liaison entre les RyR par l'intermédiaire de la protéine FKBP. Ainsi se forme une proximité entre le canal calcique de type L sur le tubule T et plusieurs RyR fixés sur le SR. Le RyR est sensible à l'augmentation du calcium cytoplasmique et en particulier lors de l'ouverture des canaux de type L. Il va alors se lier au calcium et modifier sa conformation pour ouvrir un canal dans le SR permettant la libération dans le cytosol de grandes quantités de calcium contenues dans le SR. C'est donc une libération de calcium induite par le calcium, *Calcium Induced Calcium Release* (CICR) décrit depuis 1978 <sup>[12]</sup>.

### **2.2.2.1 Le récepteur à la ryanodine**

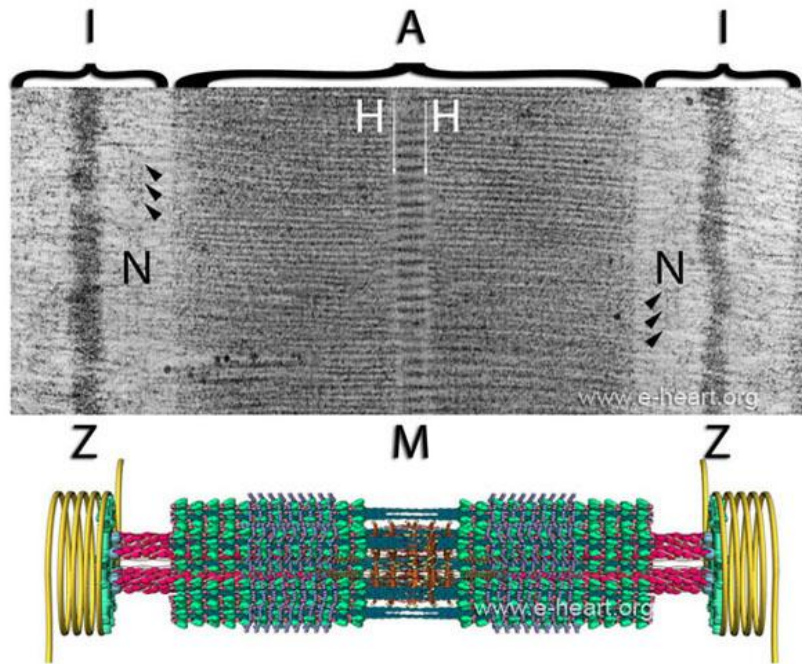
Le RyR est une grosse protéine transmembranaire de type homotetramère. Chacun des quatre monomères fait 5000 acides aminés pour une masse de 565kDa chacun. Quatre-vingt dix pourcents de la molécule est intracytosolique et forme le « pied » de la molécule qui interagit avec de nombreux ligands dont le calcium, la calmoduline, le FKBP12 et plusieurs sites de liaisons de kinases (PKA, CaMKII...) et de phosphatases (PP1, PP2A...). Les RyR pourraient être couplés entre eux par l'intermédiaire de FKBP12 <sup>[13]</sup>. La partie intracytoplasmique forme un canal ionique permettant la sortie du calcium du SR après stimulation du RyR par le calcium. L'activation du RyR par le calcium est biphasique ce qui suggère la présence de deux sites différents de fixation du calcium : un site avec une grande affinité ( $K_m \sim 1 \mu M$ ) qui stimule l'ouverture du canal, et un autre site avec une faible affinité ( $K_m \sim 1 mM$ ) qui inhibe le canal <sup>[14, 15]</sup>. De plus l'augmentation de calcium va entraîner la formation de complexes Ca-calmodulin qui vont se lier au RyR et inhiber son activité ce qui tendra à diminuer la libération de calcium <sup>[16]</sup>.

### **2.2.3 L'appareil contractile du cardiomyocyte**

L'augmentation du calcium intracytosolique sous l'effet du courant calcique entrant (ICa) et surtout de la libération de Calcium du SR par le RyR va permettre son interaction avec l'appareil contractile au niveau des sarcomères.

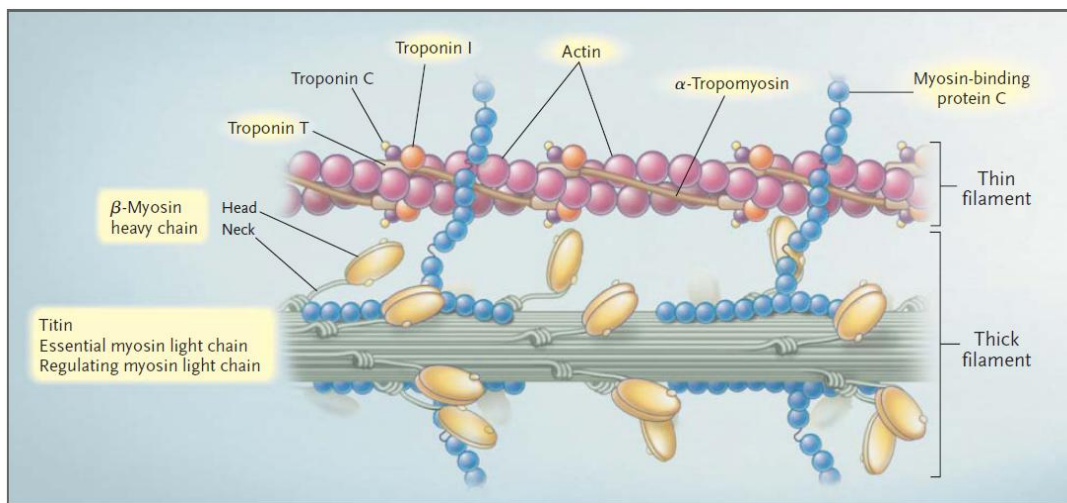
Le sarcomère est principalement constitué par d'une part les filaments d'actine coiffés par des molécules de troponine reliées à l'actine par la tropomyosine et d'autre part par les filaments de myosine présentant une tête (la chaîne légère) en regard de l'actine mais dont l'interaction est bloqué par l'interposition de la troponine (figures 3 et 4).

Au repos et l'absence de force de traction sur le cardiomyocyte la longueur du sarcomère est de  $1,65\mu m$ , mais physiologiquement les cardiomyocytes sont soumis en permanence a une tension modérée et la longueur du sarcomère est alors entre 2 et  $2,5\mu m$ . L'état d'étirement de base va influencer la performance de l'appareil contractile lors de sa contraction, la longueur optimale se situant vers  $2,2\mu m$  <sup>[5]</sup>.



**Figure 3 : Sarcomère**

Image obtenue par microscopie électronique (en haut) de la striation d'un sarcomère avec mentions des différentes stries (A, H, I, M, N, Z) ainsi qu'au dessous une représentation schématique de l'agencement des protéines du sarcomère à l'origine de cet aspect microscopie. Actine en rose, Myosine en bleu clair. Source [www.e-heart.org](http://www.e-heart.org).

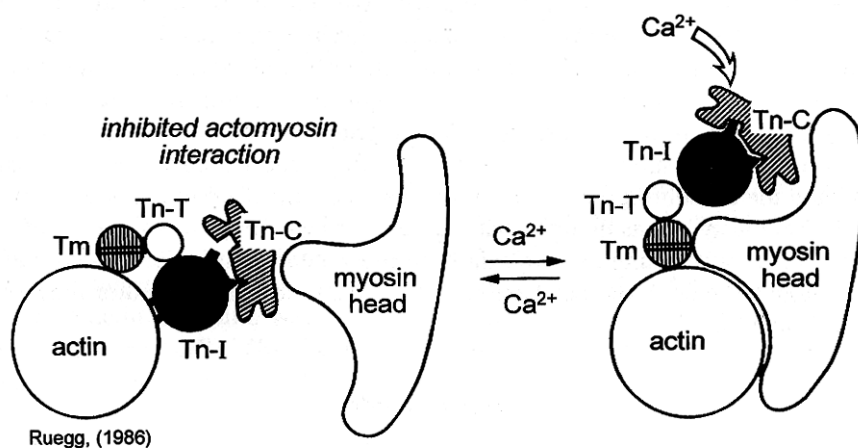


**Figure 4 : Protéines de l'appareil contractile**

Représentation des protéines constituant les filaments fins (actine, tropomyosine, troponines) et épais (chaines légères et lourdes de la myosine) ainsi que la *myosin binding protein C* reliant les différents filaments. D'après <sup>[17]</sup>.

## 2.2.4 De l'interaction biochimique à la génération d'une force motrice

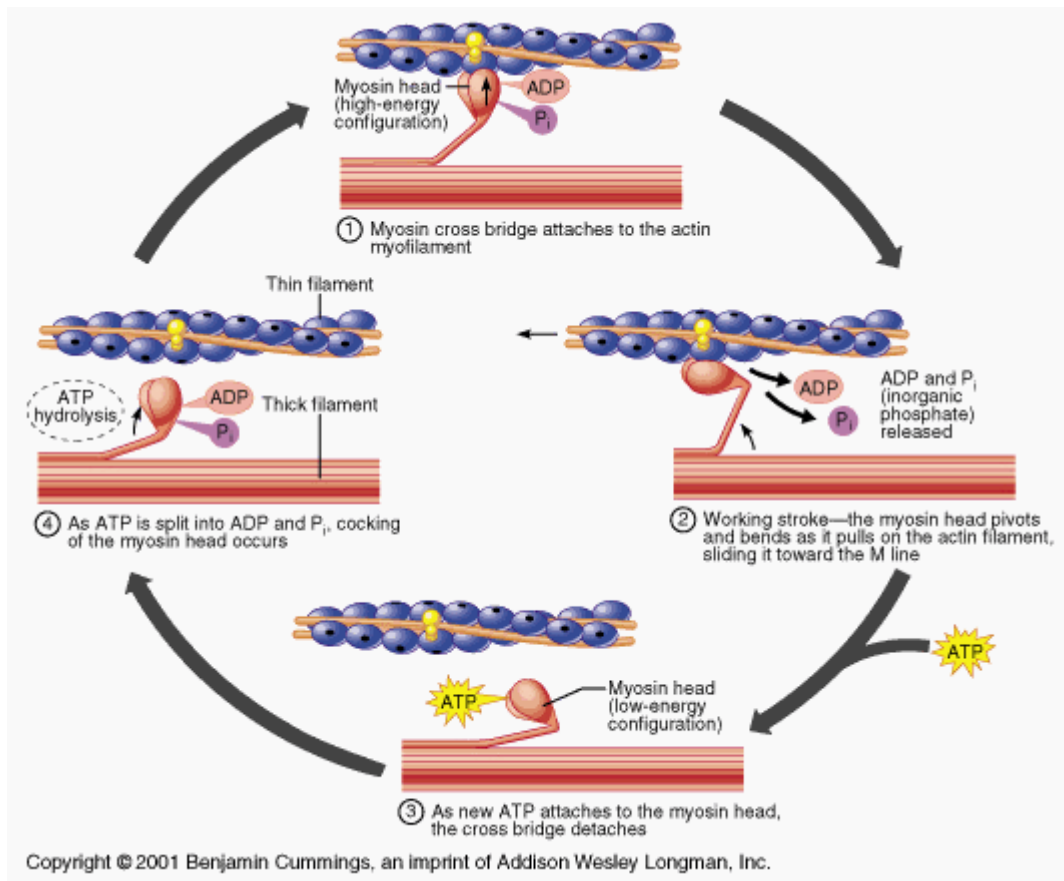
La fixation du calcium sur la troponine C va induire une modification de conformation du complexe troponine-tropomyosine qui va alors permettre l'interaction étroite entre l'actine et la myosine (figure 5). Une tête de myosine peut alors se fixer à l'actine ce qui va entraîner un changement de conformation et générer une action mécanique. La myosine va alors libérer un ADP et un Pi et la fixation d'un ATP va entraîner la libération de la tête de myosine de son site de fixation sur l'actine. La myosine va alors fixer un ion magnésium et hydrolyser une molécule d'ATP en ADP et Pi. Cela va lui permettre de retourner à sa conformation initiale avant de fixer à nouveau l'actine et de poursuivre son action mécanique. Cela permet ainsi la progression des filaments d'actine le long des filaments de myosine et donc le raccourcissement des unités contractiles (figure 6).



**Figure 5 : Interposition du complexe troponine-tropomyosine et action du calcium**

En l'absence de calcium le complexe troponine-tropomyosine empêche la liaison de la tête de la chaîne lourde de myosine à son site de fixation sur l'actine. La fixation de calcium sur la troponine C va induire un changement de conformation et un déplacement de ce complexe ce qui permet la liaison de la tête de myosine à l'actine. D'après <sup>[11]</sup>.





**Figure 6 : Génération de la force contractile par l'interaction entre actine et myosine**

Représentation de la séquence d'interaction entre les filaments d'actine et la myosine avec les changements de conformation de la tête de myosine à l'origine de la génération de la force mécanique. (Pour détails voir texte plus haut).

## 2.3 La relaxation du cardiomyocyte

### 2.3.1 Initiation de la relaxation

La relaxation du cardiomyocyte est liée à la diminution de la concentration cytoplasmique en calcium  $[Ca^{2+}]_i$ . Celle-ci est liée d'une part à l'arrêt de la libération de calcium par le SR et d'autre part à l'élimination du calcium présent dans le cytoplasme.

L'interruption de la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique est un phénomène encore mal expliqué. Plusieurs phénomènes sont évoqués <sup>[18, 19]</sup>.

- La diminution du contenu en calcium dans les citernes terminales du SR mais la rapidité de diffusion du calcium dans le SR est difficile à déterminer étant donné sa forme complexe.
- L'action d'autres effecteurs protéiques tels que la Calmoduline qui inhibe le RyR lorsqu'elle est couplée au calcium <sup>[20]</sup>.
- La diminution de probabilité d'ouverture du RyR lors de la diminution de concentration calcique du SR <sup>[21]</sup>.
- Le couplage des RyR entre eux agissant groupés comme un canal unique <sup>[13]</sup>.

### **2.3.2 Elimination du calcium cytosolique et relaxation**

L'élimination du calcium présent dans le cytoplasme va permettre l'arrêt de l'activité de la myosine qui est activée par l'augmentation du calcium cytosolique, la génération de la force mécanique va s'interrompre et la cellule va se relâcher pour revenir à son état de « repos ». Les flux calciques permettant l'élimination du calcium cytosolique sont de deux types : les flux calciques vers le SR et les flux calciques sortant le calcium de la cellule.

Le principal effecteur de la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique est la Calcium ATPase Sarcoplasmique 2a (SERCA2a), c'est par son intermédiaire que la plupart du calcium cytoplasmique va être éliminé pendant la relaxation. Son action peut représenter 70 à 90% de la diminution de  $[Ca]_i$  selon les espèces <sup>[22-24]</sup>. Son action peut-être modulée par le phospholamban (PLB) qui dans sa forme déphosphorylée inhibe l'activité ATPasique de SERCA. La quantité de PLB phosphorylé étant dépendant, d'une part, de l'activité de Kinases tels que la Protéine Kinase A (PKA) stimulée par la stimulation  $\beta$ -adrénergique et de la Calcium-

calmoduline Kinase II (CaMKII) et d'autre part de l'activité de phosphatases tels que PP1 et PP2a.

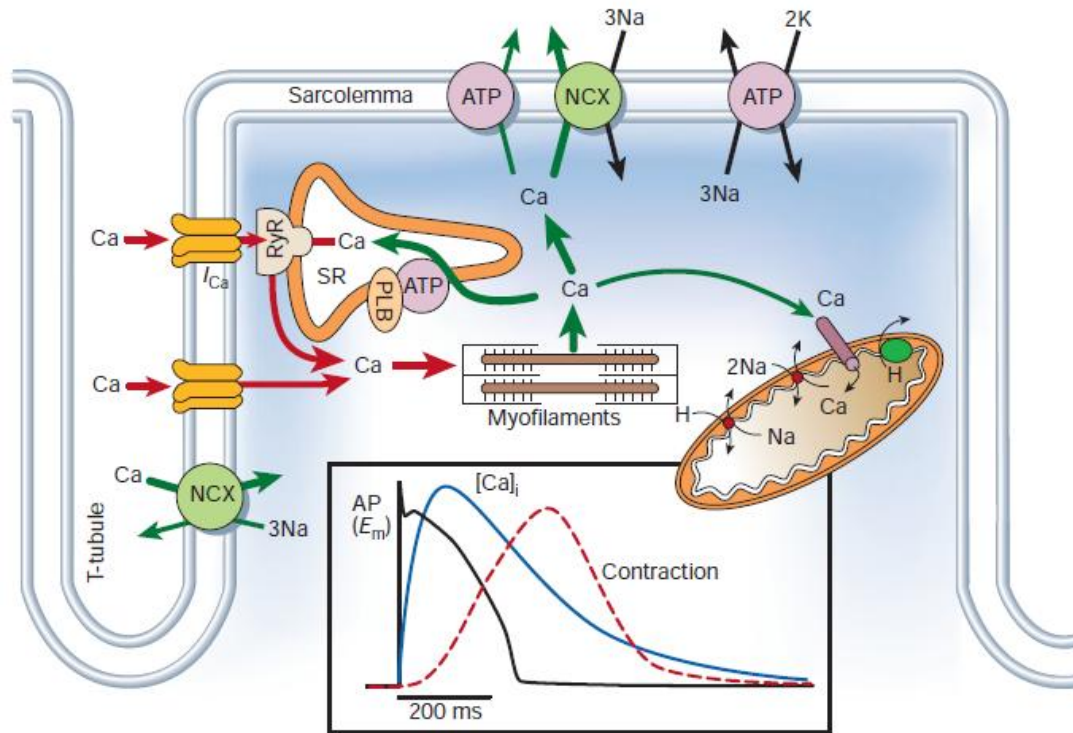
Le calcium ainsi transféré dans le SR est alors pris en charge par la calséquestrine et la calréticuline, des protéines sarcoplasmiques de stockage du calcium.

Le calcium qui n'a pas été recapturé par le SR est éliminé du cytosol vers le milieu extra cellulaire principalement par l'action de l'échangeur Sodium/Calcium, c'est un échangeur qui peut fonctionner dans les deux sens en fonction de la phase du cycle cardiaque en particulier il entraîne une entrée de calcium et une sortie de calcium au début du potentiel d'action afin de compenser l'entrée sodique par les canaux sodiques voltage dépendant. Mais sa principale action est l'élimination du calcium intracytosolique, le sodium étant éliminé par la Sodium/Potassium ATPase et l'échangeur Sodium/Proton.

D'autres mécanismes permettent le transfert du calcium hors du cytoplasme mais de manière quantitativement plus marginale : la calcium-ATPase de la membrane plasmique, l'uniport et le transport RaM mitochondrial...

Au repos le cytoplasme contient une faible concentration en calcium. En l'absence de calcium l'ensemble troponine-tropomyosine reste dans sa position inhibitrice, ne permettant pas la fixation de la myosine et empêchant ainsi la contraction.

Le couplage excitation contraction est donc une succession de mouvements calciques allant de la signalisation à la réalisation de la contraction passant par l'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium.

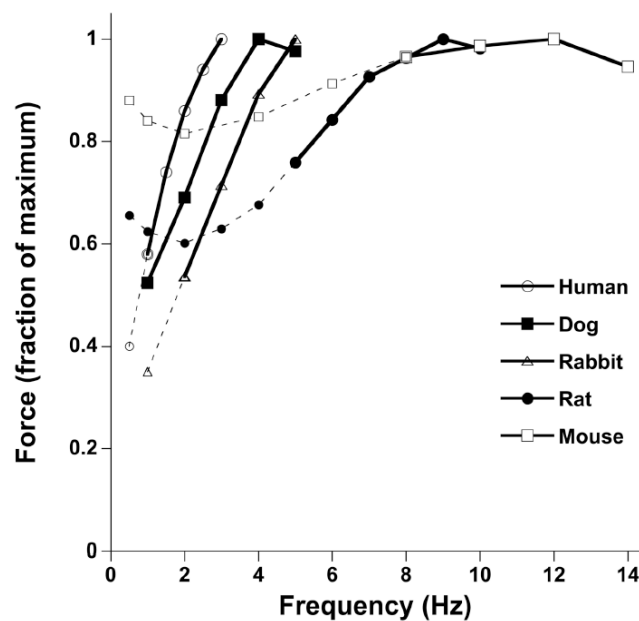


**Figure 7 : Couplage excitation-contraction**

Flux calciques au sein du cardiomyocyte, en rouge les flux vers le cytosol lors de la contraction, en vert les flux sortant du cytosol lors de la relaxation. Dans l'insert, en bas, est représenté la séquence de survenue du potentiel d'action (en noir), le transitoire calcique (en bleu) et la contraction (en rouge). D'après <sup>[19]</sup>.

### 3 LA RELATION FORCE-FREQUENCE

La relation suivant laquelle la force de contraction d'une fibre musculaire myocardique varie avec la fréquence de contraction a été décrite dès le 19<sup>ème</sup> siècle par Bowditch [25]. Il est maintenant bien accepté que la force contractile du myocarde dépend de sa fréquence de contraction [26]. Ce mécanisme joue un rôle important dans la régulation de la performance cardiaque au même titre que la relation de Frank et Starling. Ils permettent l'adaptation hémodynamique aux permanentes variations de besoins métaboliques de l'organisme. C'est principalement au cours des 50 dernières années que les mécanismes de cette relation ont été explorés.



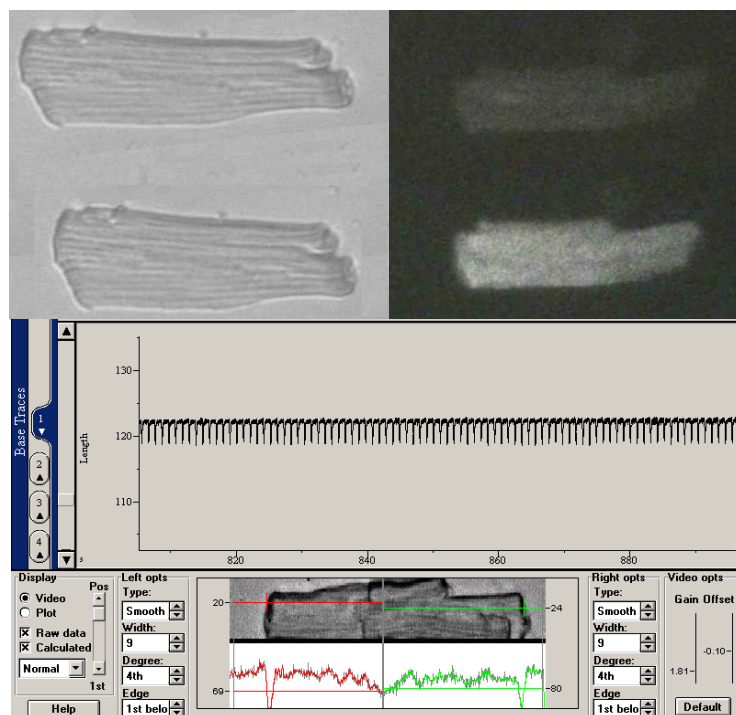
**Figure 8 : Relation force-fréquence**

Relation force fréquence observée sur la contractilité pour différentes espèces. On remarque l'aspect triphasique pour les plus petites espèces (rat et souris). D'après [10].

### 3.1 Description Clinique et fonctionnelle

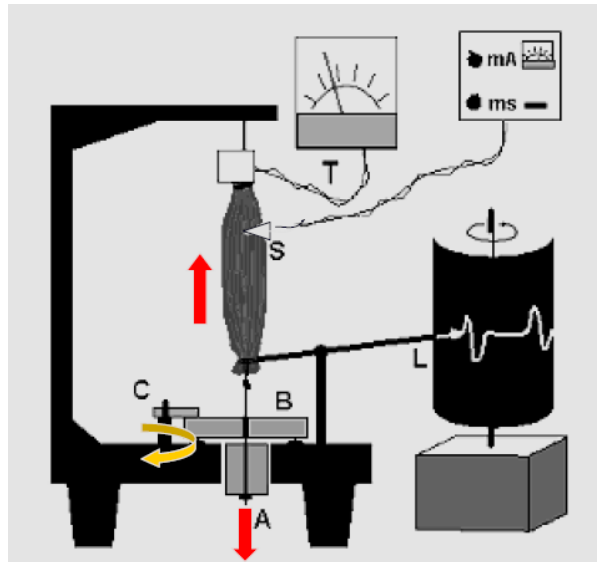
En 1871, Bowditch <sup>[25]</sup>, pour la première fois décrit une relation entre la fréquence de contraction myocardique et la force développée par le muscle, Woodworth confirmera cette observation en 1902 <sup>[27]</sup>. Ils décrivent cette relation comme répondant à une corrélation en escalier : chaque changement de fréquence donnant lieu à une modification de la force contractile. Cette relation est dite positive lorsque l'augmentation de fréquence entraîne une augmentation de la force contractile, ce qui est le cas chez la plupart des mammifères <sup>[26]</sup> (figure 8).

Cette relation a pu être observée sur cardiomyocytes isolés, comme sur des préparations plus complexes telles que des fibres musculaires, des préparations de cœur isolés perfusés et également in vivo par des méthodes non invasives telles que l'échocardiographie (figures 9 à 12).



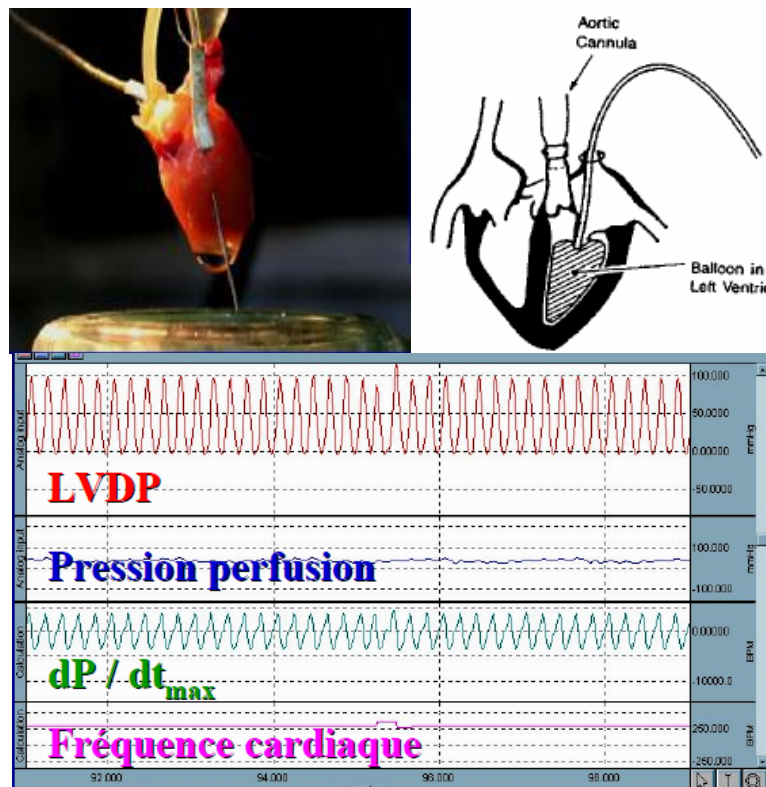
**Figure 9 : Cardiomyocytes isolés**

(En haut à gauche) microscopie optique a l'état relâché et contracté. (En haut à droite) microscopie après chargement avec un marqueur fluorescent sensible au calcium et visualisation du transitoire calcique. (En bas) Logiciel d'analyse d'image et de détection de contour permettant de réaliser en temps réel les mesures de contraction et de relaxation sur cardiomyocyte isolé.



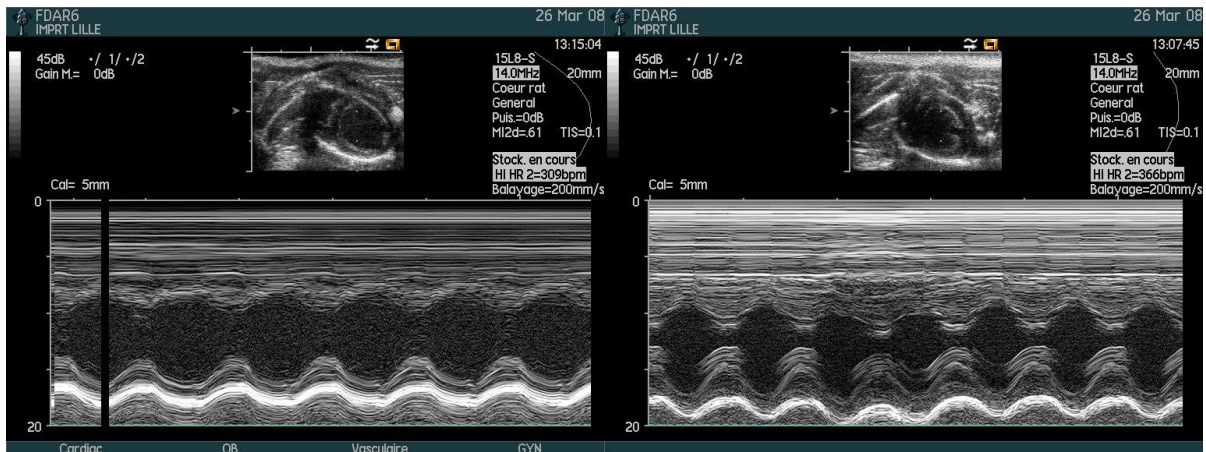
**Figure 10 : Schéma représentant la mesure de force contractile sur fibre musculaire.**

Fibre musculaire installée sur un dispositif permettant de fixer la longueur ou la tension appliquée, un générateur électrique permet la stimulation de la fibre et un dispositif permet la mesure de la force développée ou du raccourcissement.



**Figure 11 : mesure de pression développée sur cœur isolé perfusé**

(En haut à gauche) un cœur isolé, perfusé et stimulé électriquement par des électrodes épicaudiques. (En haut à droite) schéma représentant la position de la canule de perfusion au niveau aortique et le ballonnet placé dans le ventricule gauche permettant la mesure de pression développée (LVDP). (En bas) logiciel d'analyse de signaux mesurant la LVDP, la pression de perfusion par la canule aortique, calculant la fréquence cardiaque et la dérivée sur le temps de la LVDP ( $dP/dt$ ).



**Figure 12 : Evaluation échocardiographique et doppler de la fonction ventriculaire**

Echographie TM du ventricule gauche d'un rat anesthésié. Images obtenues à partir d'un même animal à deux fréquences cardiaques différentes. Noter la différence de contractilité entre les deux fréquences.

Ce phénomène a été observé dans de nombreuses espèces mammifères y compris chez l'humain [28-31]. Mais il a été décrit des différences dans l'expression de cette relation Force-fréquence (FFR) dans certaines espèces, tel que chez le hamster [32] ou on retrouve une relation négative, de même que dans certaines situations pathologiques [33] ou en modifiant les conditions expérimentales [34-37].

Chez l'humain la FFR est responsable pour 40% de l'augmentation du débit cardiaque lors de l'augmentation de fréquence [31].

Sur des préparations de muscle ventriculaire de souris une FFR positive a également été retrouvée mais plus aplatie que dans les autres espèces [30, 38]. On retrouve pour des fréquences basses (1 à 2 Hz chez la souris) une première phase de la FFR négative [37, 39].

Sur des préparations de cœur isolé perfusé de rat, une FFR positive a été observée pour des fréquences de 3 à 5 Hz et s'aplatissant en cas de dysfonction cardiaque [29]. Sur des préparations de muscle isolé la FFR a été retrouvée plate [40] ou légèrement positive [41, 42] jusqu'à des fréquences de 3-4 Hz. Taylor en 2004 a constaté une FFR positive chez le rat sur une plage de fréquence de 1 à 4 Hz sans différence qualitative significative avec les muscles ventriculaires canins ou humains [28]. Par contre une FFR négative a été retrouvée pour les fréquences les plus basses (0,3 à



1 Hz) <sup>[41-43]</sup>. Pour les fréquences plus élevées, comme dans toutes les espèces, mais proche de la fréquence physiologique chez le rat, on retrouve une FFR négative, donnant à la courbe de la relation force fréquence un aspect triphasique chez le rat (figure 8).

On ne retrouve pas de première phase de FFR négative chez les plus grands mammifères comme par exemple chez le lapin <sup>[44]</sup>.

## **3.2 Mécanismes de la relation force-fréquence**

Pendant longtemps il a été admis que la FFR était liée à une augmentation de l'entrée de calcium dans le cardiomyocyte à chaque contraction puisque le couplage excitation-contraction était principalement dépendant de l'entrée de Calcium pendant la phase de plateau du potentiel d'action <sup>[19, 45]</sup>. Cette observation a pu être confirmée ultérieurement par l'observation d'une augmentation de l'amplitude des transitoires calciques lors de l'augmentation de fréquence de stimulation de préparation de muscle cardiaque chargé avec un marqueur bioluminescent sensible au calcium l'aequorin <sup>[46, 47]</sup>.

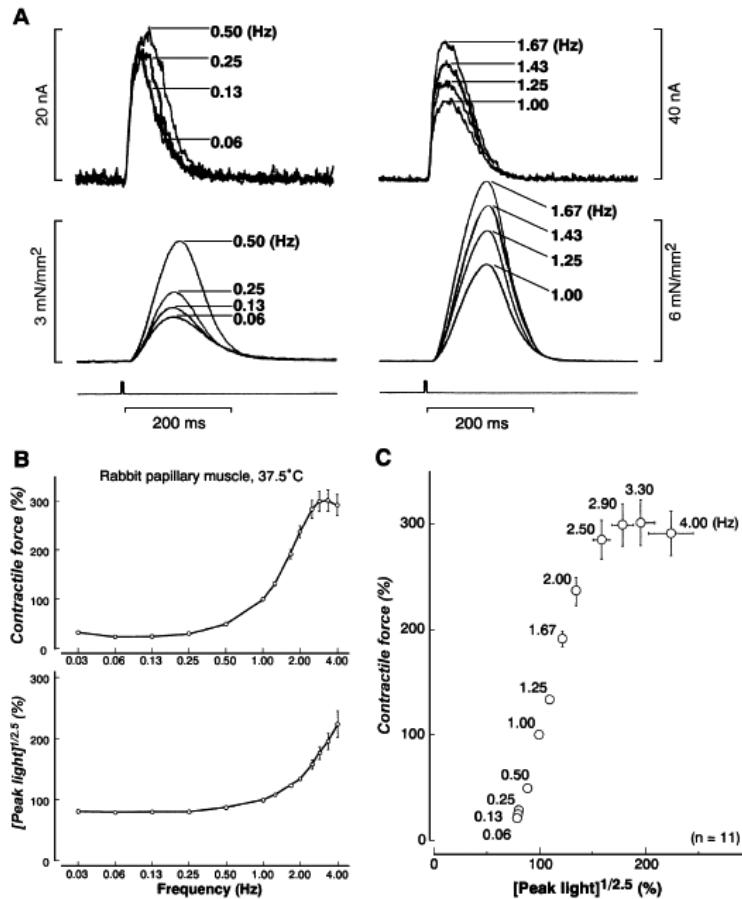
### **3.2.1 Calcium intra-cytoplasmique et FFR**

#### **3.2.1.1 Transitoire calcique et FFR**

L'afflux intra-cytoplasmique de calcium lors de la stimulation du cardiomyocyte est la base du couplage excitation-contraction, on l'appelle le « transitoire calcique ». L'amplitude et la durée de l'augmentation de concentration calcique est en relation directe avec la force contractile du myocyte.

Sur des préparations de muscles papillaires de lapin chargés avec l'aequorin, Endoh a montré que l'amplitude et la durée d'augmentation du calcium intra-cytoplasmique ne jouaient pas le même rôle en fonction de la fréquence de stimulation <sup>[44]</sup>. Pour de basses fréquences de stimulation (entre 0,06 et 0,5 Hz) l'augmentation de force contractile semble être plus liée à l'augmentation de la durée du transitoire calcique

(figure 13A à gauche), tandis que pour des fréquences plus élevées (1 à 1,67 Hz), l'augmentation de force contractile suit une augmentation d'amplitude des transitoires calciques, parallèlement à l'augmentation de fréquence (cf figure 13A à droite). Pour les fréquences inférieures à 0,5 Hz chez le lapin cette prolongation ne semble pas liée à un allongement du potentiel d'action puisqu'il a été montré que sa durée ne change presque pas sur cette plage de fréquence <sup>[48]</sup>. Par contre entre 0,5 et 5 Hz la durée du potentiel d'action augmente graduellement <sup>[48]</sup>, ce qui peut être à l'origine d'une augmentation du courant calcium entrant par les canaux Calcium voltage dépendant de type L et participer à l'augmentation au FFR positif par l'augmentation de la libération sarcoplasmique de calcium. La figure 13B retrace la relation entre l'amplitude du transitoire calcique et la force contractile du muscle papillaire de lapin, on constate que toute la phase d'augmentation de force contractile est associée à une augmentation de l'intensité du marqueur bioluminescent correspondant à une augmentation de la concentration cytosolique de calcium. La figure 13C illustre qu'à partir d'une fréquence de 2,5 Hz la force contractile du muscle papillaire de lapin augmente de moins en moins malgré une augmentation de l'amplitude de transitoire calcique, voire tend à diminuer légèrement si l'on augmente encore cette fréquence.



**Figure 13 : Mesure de la force contractile et des transitoires calciques selon la fréquence**

Relation force-fréquence obtenue sur des muscles papillaires de lapin chargé avec l'aéquirin à 37,5°C. (A) représentation des tracés des transitoires lumineux d'aéquirin (tracé du haut) et de force contractile (tracé du bas) pour des plages de fréquences basses (à gauche) et des plages de fréquences hautes (à droite). (B) relations force-fréquence (en haut) et transitoire calcique-fréquence (en bas) (C) relation entre l'amplitude des transitoires calciques (abscisse) et la force contractile (ordonnée) lors de la variation de la fréquence de stimulation. D'après <sup>[26]</sup>.

L'interprétation des résultats aux plus basses fréquences (inférieures à 0,5 Hz) est difficile car il s'agit de fréquences très différentes des conditions physiologiques du lapin (entre 120 et 325/min) <sup>[49]</sup>.

Les observations faites sur du muscle ventriculaire de souris, bien que montrant une FFR moins prononcée que dans d'autres espèces <sup>[30, 38]</sup>, retrouvent une augmentation de force contractile induite par l'augmentation de fréquence disproportionnellement grande par rapport à l'augmentation des transitoires calciques. Cela évoque l'implication d'autres mécanismes dans cette espèce, tels qu'une modification de la sensibilité des myofilaments au calcium <sup>[50]</sup>.

### 3.2.1.2 Rôle du Réticulum Sarcoplasmique

La charge en calcium dans le réticulum endoplasmique (SR) semble jouer un rôle important dans la FFR. En effet, dans le cœur humain sain, lorsque la fréquence de stimulation est élevée la part relative de calcium réabsorbé par le SR augmente par rapport à la sortie de calcium par l'échangeur  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  [51]. Le principal effecteur de cette recapture est la Calcium ATPase sarcoplasmique (SERCA2a) et la réduction de son activité dans l'insuffisance cardiaque humaine contribue à l'altération des fonctions systoliques et diastoliques myocardiques [52].

Des souris transgéniques surexprimant SERCA2a présentent une FFR positive alors que cette relation est plate chez les souris contrôle de lignée et d'âge équivalent [53]. Les auteurs évoquent la possibilité d'un stockage accru de calcium dans le RS permettant d'avoir plus de calcium disponible lorsque la fréquence augmente. D'autres arguments mettent en avant le rôle de SERCA2a dans la FFR, dans l'insuffisance cardiaque Munch [54] ne retrouve pas de diminution d'expression protéique de SERCA2, mais une diminution de fonction bien corrélée aux anomalies de la FFR.

L'action régulatrice du phospholamban sur SERCA2a pourrait expliquer ces constatations. Des préparations de muscles papillaires de souris *Knock-Out* pour le phospholamban présentes une FFR négative alors que les souris contrôle présente une FFR positive [30]. L'action du phospholamban se faisant selon son degré de phosphorylation au site Ser16 principalement par la Protéine Kinase A (PKA) et au site Thr17 principalement par la Calcium Calmoduline Protéine Kinase (CaMKII) [55]. La diminution de phosphorylation par une activité augmentée de la protéine phosphatase-1 (PP-1) est associée chez les souris *Knock-Out* pour le CREM (*cyclic AMP response element modulator*), un inhibiteur de PP-1, à une nette diminution de la FFR [56]. L'implication du phospholamban a été retrouvée par Meyer [57], mais avec des résultats divergeant, puisque chez les souris surexprimant SERCA2a il retrouvait une FFR négative et chez celles surexprimant le phospholamban une FFR positive, il évoque l'importance du ratio entre phospholamban et SERCA2a comme étant plus important que la quantité de SERCA2a elle-même. Mais ses constatations n'expliquent pas la FFR négative dans le groupe surexprimant SERCA2a et

nécessiteront d'autres expérimentation pour éclaircir cette situation qui va à l'encontre des constatations d'autres auteurs mettant en avant le rôle de SERCA2a dans la facilitation de la FFR <sup>[53, 54]</sup>.

Des arguments pharmacologiques supportent également l'implication de SERCA2a dans la FFR mais les résultats sont également divergeant. Son inhibition pharmacologique par le 2,5 di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone dans le travail de Baudet <sup>[48]</sup> ou par l'acide cyclopiazonique dans le travail de Taylor <sup>[28]</sup>, entraîne une diminution de l'amplitude de la FFR positive. Mais Schwinger <sup>[58]</sup> avec de l'acide cyclopiazonique et Money-Kyrle <sup>[59]</sup> avec de la thapsigargin retrouvent respectivement une négativation ou une annulation de la FFR. Ces travaux mettent en avant l'implication de SERCA2a dans la FFR mais le niveau d'inhibition de SERCA2a obtenu dans ces expérimentations n'étant pas connu, il pourrait être à l'origine des différences obtenues en termes de réduction ou d'inversion de la FFR. Si la recapture calcique est totalement abolie dans ces conditions, bloquant ainsi le fonctionnement du réticulum sarcoplasmique, la FFR positive pourrait être expliquée par une entrée de Calcium extracellulaire comme il a été montré lors d'inhibition de la fonction sarcoplasmique par la ryanodine chez l'animal ou l'humain présentant une insuffisance cardiaque <sup>[60, 61]</sup>.

La deuxième phase de FFR négative a été observée chez le rat à partir de fréquences de 4-5 Hz proches des fréquences de contractions physiologiques de cette espèce (3 à 6 Hz) <sup>[49]</sup>. Des mécanismes impliquant le réticulum sarcoplasmique ont également été évoqués : une altération des transferts calciques par saturation de la recapture sarcoplasmique en calcium pour des fréquences élevées ou en cas de surcharge calcique cytoplasmique <sup>[62]</sup>, ou par un caractère réfractaire des canaux de libération calciques du réticulum <sup>[63]</sup>. La possibilité d'une modification du pH intracellulaire à l'origine d'une désensibilisation des myofibrilles au calcium <sup>[64]</sup> est également une cause envisagée de cette seconde phase de FFR négative. Les conditions expérimentales ont également été évoquées comme ayant un rôle dans les constatations effectuées concernant la FFR, notamment, après excision de myofibrilles ventriculaire de rat il a été montré une augmentation de l'activité de la calcium ATPase sarcoplasmique (SERCA2a) <sup>[28]</sup>.

Chez le rat, la première phase négative correspondant à des fréquences très basses (inférieures à 1 Hz) et très éloignées des fréquences contractiles physiologiques dans cette espèce (supérieures à 3 Hz) <sup>[49]</sup> est d'interprétation difficile car l'ensemble des mécanismes liés à la FFR sont très loin de leurs conditions habituelles de fonctionnement. Cette portion négative de la FFR observée chez le rat pourrait également être liée à l'implication de la recapture calcique par le réticulum sarcoplasmique <sup>[41]</sup>. L'utilisation de bloqueurs de la recapture calcique du réticulum sarcoplasmique (caféine, théophylline) inhibe cette FFR négative alors qu'elle est inchangée par les inhibiteurs calciques (nifedipine et  $Mn^{2+}$ ) qui diminuent le courant calcique entrant I<sub>Ca</sub>. Il est à noter que pour des fréquences plus élevées la FFR positive est abolie par les inhibiteurs calciques mais pas par la caféine ou la théophylline <sup>[41]</sup>.

### **3.2.1.3 Rôle des Canaux Calciques de type L**

L'entrée de calcium intracytoplasmique par les canaux calcium voltage dépendant de type L est déterminante dans le couplage excitation contraction. D'une part elle est à l'origine de la libération du calcium sarcoplasmique par les canaux calciques sensibles à la ryanodine, c'est ce que les anglophones appellent le « *Calcium Induced Calcium Release* ». D'autre part elle apporte du calcium extracellulaire nécessaire aux stocks calciques du réticulum sarcoplasmique.

Il a été montré que les inhibiteurs calciques abolissent la FFR positive chez le rat <sup>[41]</sup> ce qui témoigne de l'implication de ce courant calcique entrant dans la FFR positive. L'entrée de calcium par les canaux de type L augmente lors que la fréquence est augmentée. Pour des fréquences élevées de stimulation, la durée relative du plateau du potentiel d'action augmente, ce qui entraîne une prolongation de la durée de dépolarisation pendant laquelle l'entrée de calcium par les canaux de type L est importante <sup>[26]</sup>. La FFR positive peut même être maintenue par l'augmentation des courants calciques de type L avec l'augmentation de fréquence lorsque la fonction sarcoplasmique est inhibée par la Ryanodine (inhibant ainsi la libération du calcium sarcoplasmique) <sup>[60]</sup>.

Les résultats obtenus en modulant l'activité des canaux de type L dans l'insuffisance cardiaque humaine sont divergeant. Dans un travail de Rossman <sup>[65]</sup>, l'augmentation du courant calcique entrant en augmentant la concentration calcique du milieu ou en utilisant des agonistes des canaux calciques de type L (Bay K 8644 et FPL 64176) augmente la contractilité myocardique mais ne normalise pas la FFR négative, au contraire de l'augmentation pharmacologique de l'activité de la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique qui rétabli une FFR positive. Reuter, quand à lui, retrouve que le Bay K 8644 (à 10<sup>-7</sup> M) et la nifedipine (à 10<sup>-8</sup>M) rétablissent une FFR positive dans le myocarde humain d'insuffisant cardiaque <sup>[66]</sup>.

#### **3.2.1.4 Rôle des courants sodiques**

Dès 1971 Langer évoquait la possible implication des courants sodiques dans la FFR. Il suggérait qu'avec l'augmentation de fréquence une augmentation de la concentration cytoplasmique de sodium entrainerait, par l'intermédiaire de l'échangeur sodium calcium, une augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium. Ce mécanisme pourrait ainsi augmenter les transitoires calciques au cours de l'augmentation de fréquence. Des travaux utilisant des microélectrodes sensibles au sodium ont montré qu'avec l'augmentation de fréquence on retrouvait une augmentation de l'entrée sodique mesuré par l'activité sodium intracellulaire <sup>[67, 68]</sup>. Cette augmentation d'activité sodium intracellulaire est corrélée à la force contractile observée sur des muscles papillaire de cochon d'inde, avec une relation de type sigmoïde particulièrement raide entre 1 et 4 Hz <sup>[69]</sup>. Chez le rat il a été montré que l'augmentation de fréquence avait peu d'effet sur l'activité sodium intracellulaire des myocytes présentant une FFR négative que ceux présentant une FFR positive <sup>[70]</sup>.

Mais l'augmentation du sodium intra cellulaire obtenue, à l'aide d'un ionophore monensin, entraine une inversion de la FFR positive, la rendant négative sur des préparations de muscle ventriculaire de lapin et de cochon d'inde <sup>[43]</sup>. Il est évoqué que les concentrations intracytoplasmique élevées en sodium peuvent entrainer une entrée en calcium par l'échangeur sodium calcium qui pourrait favoriser la charge sarcoplasmique et ainsi augmenter le transitoire calcique lors des fréquences de

stimulation les plus basses. De plus l'augmentation de fréquence augmentant l'activité sodium intracellulaire, cela entrainerai une majoration de l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> qui entrainerai une hyperpolarization de la membrane du myocyte [69].

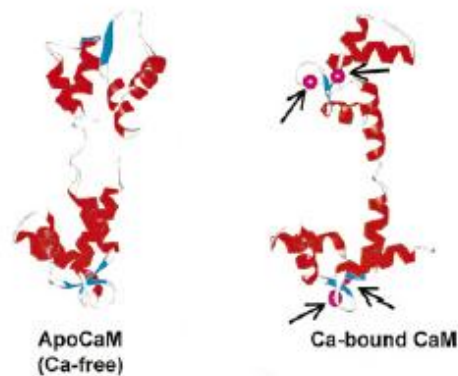
Il a également été constaté une implication de l'homéostasie sodique dans la FFR chez l'humain [71]. Dans l'insuffisance cardiaque l'augmentation du sodium intracellulaire augmente l'entrée de calcium par l'échangeur Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> et maintiendrai ainsi la charge en calcium du réticulum sarcoplasmique. Ceci pourrait pour des fréquences basses participer au maintien de la force contractile. Tandis que pour des fréquences plus élevées les myocytes défailant, avec une [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> élevée, ne pourraient majorer leur charge calcique sarcoplasmique et s'exposeraient a une surcharge calcique cytoplasmique diastolique [72]. L'utilisation du BDF 9148, un activateur de canaux sodium, entraine chez l'humain une récupération d'une FFR positive [73].

La première phase négative de la FFR observée chez la souris, pourrait être liée à un important efflux de calcium par l'échangeur Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>. En effet il a été montré que cette FFR négative pouvait être abolie par l'utilisation de bloqueur de l'échangeur Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> (NCX) [74]. De plus l'augmentation d'activité de NCX obtenue par surexpression de NCX a l'aide d'un transfert de gène chez des souris entraine une FFR négative alors qu'elle est constatée comme plate dans le groupe contrôle [75].



### 3.2.1.5 Rôle de la Calmoduline et de la CaMKII

#### 3.2.1.5.1 La Calmoduline



**Figure 14 : Calmoduline**

Structure tridimensionnelle de la calmoduline sans calcium (apoCaM) et liée à quatre ions calciums (Ca-bound CaM). Les flèches indiquent les sites de fixation du calcium. D'après [76].

La calmoduline (CaM) est une petite protéine ubiquitaire cytoplasmique ( $[CaM] = 2 \mu M$ ) de 16.7 kDa, dont la structure est particulièrement conservée entre les espèces [76]. Elle est constituée de deux domaines globulaires, ou « têtes », séparés par un domaine central en hélice  $\alpha$  [16, 77]. Chaque tête contient 2 sites de fixation du calcium en motifs « *EF-hand* »: sites I et II pour le lobe N-terminal et III et IV pour le lobe C-terminal [78] (figure 14). Les domaines I et II ont une faible affinité pour le calcium (10-5 M) et sont moins affines pour le calcium que les domaines III et IV (10-6 M) [16, 77]. Au repos la CaM n'est pas liée au calcium mais lors de l'augmentation de concentration calcique (lors de la contraction cardiomyocytaire) les sites se lient au calcium et la CaM change de conformation tridimensionnelle, exposant alors des sites hydrophobes qui étaient jusque là masqués et qui permettent la liaison avec différentes protéines [76] (tableau 1). Elle pourra alors exercer une action facilitatrice ou inhibitrice sur sa cible. La calmoduline peut moduler la libération de calcium par le SR en agissant soit directement sur le RyR, soit sur des protéines qui régulent l'activité du RyR comme le DHPR, la protéine kinase  $Ca^{2+}/CaM$  dépendante, la calcineurine, et la protéine phosphatase qu'elle stimule [79].

CaM-dependent proteins	Kd
<b>High K<sub>d</sub></b>	
Calcineurin (phosphatase 2b)	0.1 nM
MLCK	~ 1 nM
NO synthase	< 10 nM
Phosphodiesterase	0.1–1 nM
SL Ca-ATPase	5 nM
<b>Intermediate K<sub>d</sub></b>	
RyR	16–84 nM
CaMKII	20–100 nM, 60 pM after autophosphorylation
CaMKIV	10–100 nM
<b>Low K<sub>d</sub></b>	
Adenylyl cyclase	> 100 nM

**Tableau 1 : cibles protéiques de la calmoduline**

Sont listées ici, par ordre d'affinité croissante, les principales cibles protéiques de la Calmoduline ainsi que leur constante de dissociation (Kd). D'après <sup>[76]</sup>.

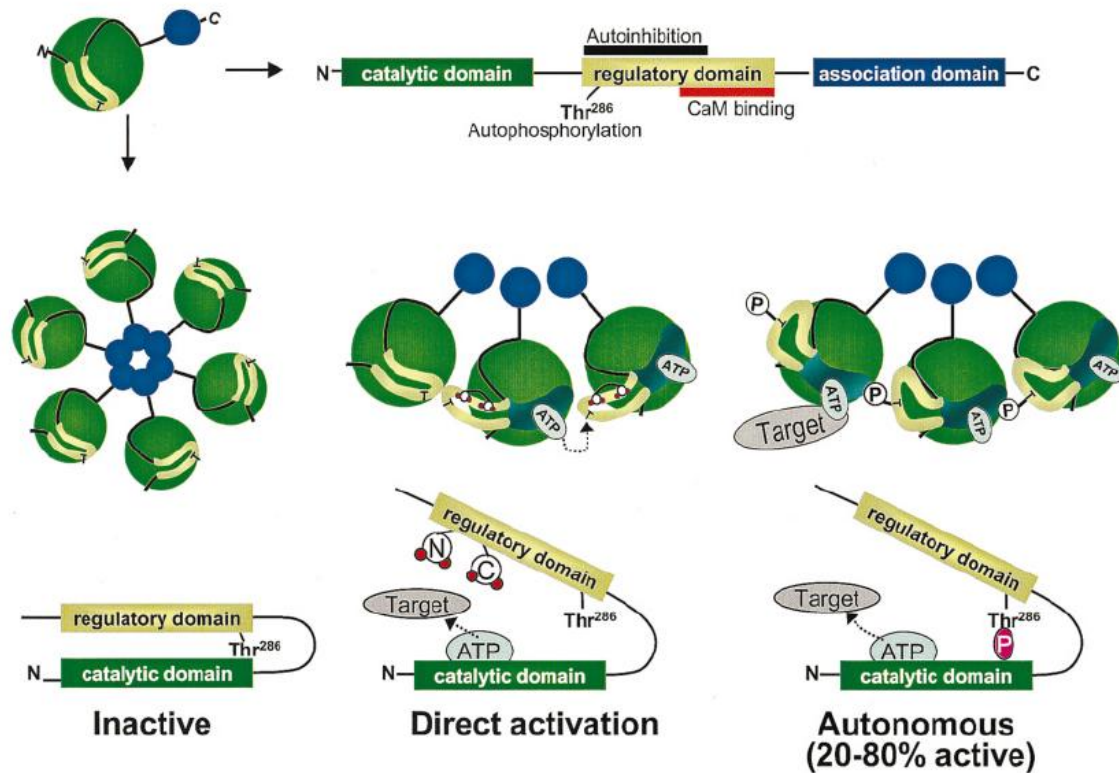
### 3.2.1.5.2 La Kinase Calcium-Calmoduline dépendante

Le tissu nerveux est particulièrement riche en Kinase Calcium-Calmoduline dépendante (CaMKII) et elle est impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation <sup>[80, 81]</sup>. Elle est également présente dans le cœur <sup>[82-85]</sup>. C'est une Serine/Thréonine kinase qui va phosphoryler différentes protéines en réponse au signal calcique <sup>[81, 86]</sup>. En 1998 De Koninck a montré que la CaMKII est capable de decoder la fréquence de pic de concentration calcique en un niveau d'activité enzymatique <sup>[81]</sup>. Son niveau d'activité dépend de la fréquence, de la durée et de l'amplitude du pic de concentration calcique <sup>[81]</sup>.

Il existe trois CaMK (I, II et IV), dans le cœur la CaMKII est largement prédominante <sup>[87]</sup>. Les CaMKII sont des homo- ou des hétéro-multimères de 6 à 12 kinases formant des sous-unités <sup>[80, 88]</sup>. Il existe quatre isoformes de CaMKII :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . Les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  ne sont exprimées que dans le tissu nerveux, alors que les isoformes  $\gamma$  et  $\delta$  sont présentes dans différents tissus dont le cœur <sup>[89]</sup>. L'isoforme  $\delta$  est prédominante dans le myocarde et l'expression de ses différentes variantes peut évoluer avec le développement ou la maladie <sup>[87]</sup>. Bien que ces différentes isoformes

aient des réactions différentes envers le signal calcique <sup>[81]</sup>, l'implication clinique de ces différences est encore très mal connue. Certaines isoformes présentent une séquence de localisation nucléaire de la kinase, dans le cas d'un hétéro-multimère de CaMKII la localisation nucléaire est obtenue en cas d'une majorité d'isoformes contenant cette séquence <sup>[90]</sup>.

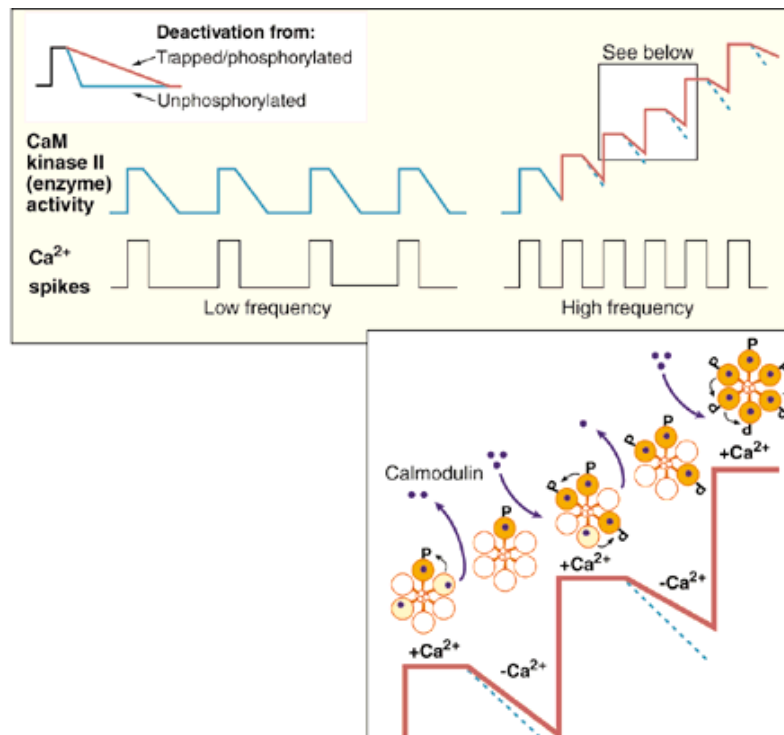
Chaque isoforme comprend un domaine catalytique amino-terminal un domaine régulateur central (comprenant une portion autoinhibitrice et un site de fixation à la CaM) et un domaine carboxy-terminal d'association permettant l'oligomérisation <sup>[80, 89, 91]</sup>. Dans sa conformation tridimensionnelle la zone autoinhibitrice est proche du site actif empêchant ainsi l'accès au substrat. La fixation de la calmoduline entraîne un changement conformationnel permettant la libération du site actif <sup>[92]</sup>. Ce site actif peut alors exercer son rôle de kinase sur différentes protéines cibles dont la CaMKII elle-même et plus précisément en prenant pour cible le segment régulateur du monomère de CaMKII adjacent en le verrouillant dans sa position active en phosphorylant la Thréonine 287, sur l'isoforme  $\delta$ , la Thréonine 286 sur l'isoforme  $\alpha$  <sup>[87]</sup> (figure 15). Cette autophosphorylation augmente l'affinité de la CaMKII pour le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM d'environ 700 fois (de 45nM à 60pM) <sup>[80, 93]</sup>. De plus elle permet le maintien d'une activité kinase même en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, on dit alors que la CaMKII fonctionne de manière autonome <sup>[92, 94-97]</sup>. Ces deux phénomènes permettent le maintien de l'activité de CaMKII même après la diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>[93]</sup> et donc malgré la diminution de concentration du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM <sup>[76, 87]</sup>.



**Figure 15 : CaMKII, conformation, action de la calmoduline et autophosphorylation**

Organisation des différents domaines et des oligomères de CaMKII. Les trois principaux domaines du monomère de CaMKII sont présentés de manière schématique et de manière linéaire (en haut). Au milieu à gauche on trouve la conformation en homo- ou hétéro-multimères (6-12 monomères) en structure en forme de roue (une deuxième roue peut se placer au dessus d'une autre formant une double roue). En bas on peut voir schématisé l'activation de CaMKII par la liaison de Ca-CaM et l'autophosphorylation qui en découle en Thr<sup>286</sup>. La liaison de CaM est suffisante pour activer CaMKII et activer ainsi le site (ATP) actif peut interagir et phosphoryler la protéine cible, mais l'autophosphorylation rend CaMKII actif (20-80%) même après la dissociation de CaMKII. D'après <sup>[76]</sup>.

Ces caractéristiques structurales et fonctionnelles permettent à la CaMKII de moduler son activité en fonction de la concentration calcique du milieu et également en fonction de la fréquence des augmentations calciques comme illustré sur la figure 16.



**Figure 16 : Activité fréquence dépendante de CaMKII**

(En haut) A basse fréquence, il n'y a pas d'augmentation de l'activité de l'enzyme car la kinase se désactive entre les pics calciques (*spikes*). A haute fréquence, la kinase ne peut se désactiver complètement ce qui entraîne une augmentation de l'activité de l'enzyme. (Insert en haut) une sous-unité de CaMKII se désactive lentement si elle est autophosphorylée ou rapidement si elle n'est pas phosphorylée. (En bas) Après une série de pics calciques, la kinase (représentée sous forme d'hexamère) est autophosphorylée (P sur une sous-unité orange foncé). Lorsque le calcicum diminue, CaM (point bleu) se dissocie mais la sous unité reste active. Une nouvelle phosphorylation survient au pic calcique suivant, sur la CaMKII déjà partiellement active. Ceci se poursuit jusqu'à ce que l'enzyme soit pleinement activé. D'après <sup>[98]</sup>.

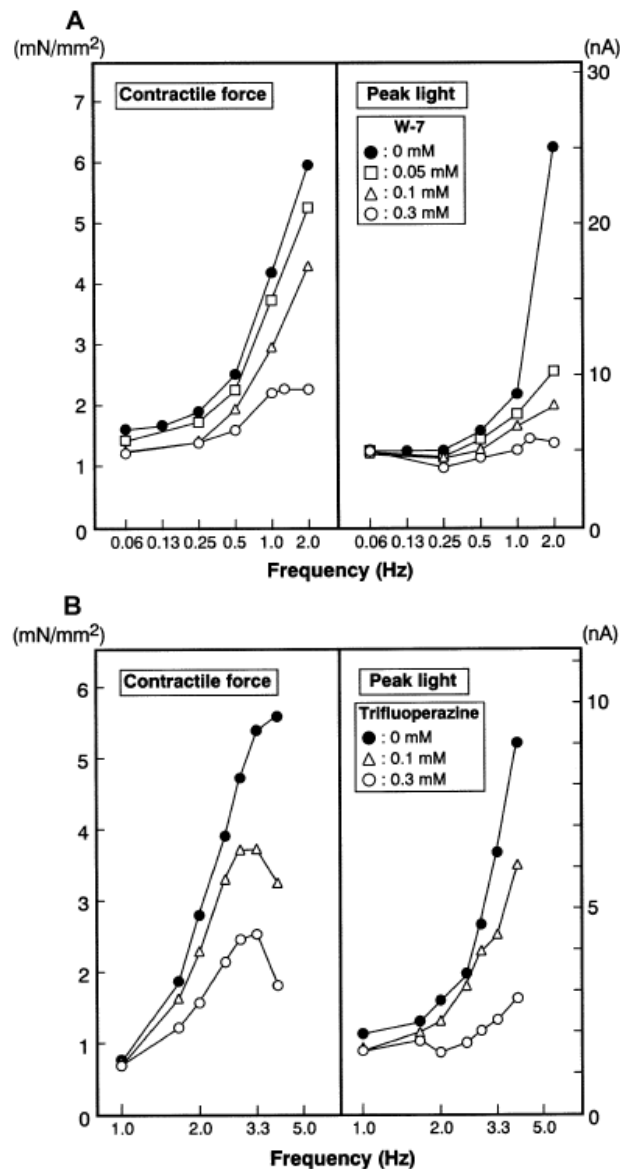
Plusieurs protéines impliquées dans les flux calciques sont des cibles connues de la CaMKII : le canal calcique voltage dépendant de type L <sup>[99]</sup>, le récepteur- canal à la ryanodine <sup>[100, 101]</sup> et le phospholamban <sup>[102]</sup>. La CaMKII étant sensible aux variations de concentration calcique et ayant pour cibles différents effecteurs des flux calciques intracellulaires, elle est régulièrement impliquée dans les mécanismes de régulation de la fonction contractile et la relaxation du cardiomyocyte.

### 3.2.1.5.3 CaM, CaMKII et FFR

La calmoduline et la Kinase Calcium Calmoduline dépendante, jouent un rôle important dans la régulation de la contractilité cardiaque de par leur rôle de

modulation sur l'entrée de calcium, la réabsorption et la libération du calcium par le SR [76].

L'utilisation d'inhibiteurs de la CaM, le W7 [103] et la trifluoperazine [104] ont une action inhibitrice plus importante pour les fréquences élevées, sur la force contractile (figure 17A et 17B à gauche) et sur les transitoires calciques visualisé par l'aequorin (figure 17A et 17B à droite).



**Figure 17 : Inhibition de la relation force fréquence par des inhibiteurs de calmoduline.**

Inhibition fréquence-dépendante des relations force-fréquence (à gauche) et transitoire calcique-fréquence (à droite) par les inhibiteurs de calmodulin, W-7 (A) et trifluoperazine (B) sur des muscles papillaires de lapin chargé avec l'aequorin, un marqueur bioluminescent du calcium. D'après [26].

Les inhibiteurs évoqués précédemment n'ayant pas des effets exclusivement ciblés sur la CaM, les résultats obtenus étaient discutables quand à l'implication de la CaM dans la FFR. Mais d'autres arguments plaident en faveur de l'implication de la CaM. La CaM est un senseur calcique pour la régulation des canaux calciques de type L [105, 106]. De nombreux travaux montrent que la CaMKII augmente les courants calciques par les canaux de type L [99, 105, 107-110]. La CaMKII présente en effet plusieurs sites de phosphorylation sur le canal calcique de type L [111, 112]. L'action de la CaMKII sur le RyR est plus controversée. En effet dans certaines conditions elle réduit la libération de calcium par le SR, réduisant ainsi le transitoire calcique mais augmentant le contenu en calcium du SR [113-115], présentant ainsi des effets divergents sur les canaux de type L et la libération calcique du SR. Une hypothèse pourrait être celle d'une inhibition de la libération calcique comme effet principal entraînant secondairement une augmentation du courant calcique de type L par une levée de l'inhibition exercée par le calcium sur ces canaux [116] et par la phosphorylation des canaux calciques de type L. Mais d'autres travaux montrent quand à eux une augmentation de la libération calcique sarcoplasmique sous l'effet de CaMKII [76, 99, 109, 117, 118]. En contrôlant la charge calcique du SR et les courants calciques de type L, Li et Bers ont montré dans leur travaux une libération de Ca<sup>2+</sup> par le SR augmentée par la CaMKII [117, 119]. L'étude d'un canal isolé sur bicouche lipidique a montré une augmentation de probabilité de l'ouverture du RyR par la phosphorylation du RyR dépendant de la CaMKII [101]. L'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium induite par l'augmentation de fréquence pourrait être à l'origine d'une stimulation de la CaMKII qui augmente la libération de calcium du SR et participe ainsi à la FFR [117].

De plus comme nous l'avons vu précédemment, la CaMKII a pour cible le phospholamban au niveau de sa Thréonine 17 qui une fois phosphorylé lève son inhibition sur SERCA2a et facilite ainsi la recapture calcique par le SR et permet ainsi de disposer d'un pool calcique sarcoplasmique plus important pour générer de plus grands transitoires calciques et augmenter la contraction cardiomyocytaire.

L'implication de la calmoduline dans la sensibilité des myofilaments au calcium a également été évoquée. Sur des préparations de fibres pelées cardiaques de rat

l'augmentation répétée du calcium entraîne en l'absence de CaM une diminution de la sensibilité au calcium alors qu'en présence de CaM elle augmente significativement <sup>[120]</sup>.

### **3.2.1.6 Importance des conditions expérimentales**

Les expérimentations explorant la FFR ont été réalisées dans des conditions très variables d'une étude à l'autre. Or, les conditions expérimentales sont particulièrement importantes en effet la FFR négative constatée chez les rats et les souris n'est en réalité présente que dans des conditions non-physiologiques. En effet pour des conditions expérimentales proche de la physiologie et avec des gammes de fréquences de stimulation telles qu'elles sont retrouvées in-vivo, la FFR de ces petits rongeurs est retrouvée légèrement positive ou presque plate mais pas négative <sup>[38, 62, 121]</sup>.

Il y a deux principales limitations expérimentales retrouvées dans la littérature <sup>[10]</sup> :

- La première est que de nombreuses expérimentations sur des préparations de muscle cardiaque étaient, par le passé, effectuées à température ambiante. Dans ces conditions la contraction se fait beaucoup plus lentement, de même que la relaxation, les fréquences physiologiques étaient donc difficile à atteindre. En augmentant la fréquence la fusion diastolique (c'est-à-dire une relaxation incomplète avant la contraction suivante) survient pour des fréquences plus basses et entraîne une diminution de la force développée et ce à des fréquences plus basses que les fréquences physiologiques. Ainsi avec l'augmentation de température la fréquence pour laquelle la force développée est maximale se décale vers les fréquences plus élevées. Alors qu'à température ambiante la force maximale est développée vers 2Hz chez le rat, elle est observée vers 4 à 6Hz à 30°C et vers 8Hz à la température corporelle <sup>[10, 122]</sup>.
- La seconde est liée à la limitation de la disponibilité de l'oxygène pour des préparations de muscle cardiaque de trop grande dimension. A température



ambiante et avec des fréquences basses Schoutten et Ter Keurs constataient que les préparations de fibres myocardiques de plus de 250 $\mu$ m d'épaisseur souffraient d'une hypoxie dans leur partie centrale <sup>[36]</sup>. Endoh arrivait à des constatations similaires sur des préparations de muscle papillaire de lapin <sup>[26]</sup>. Une publication récente de Raman met en avant la rapide chute de performance contractile lorsque l'on augmente le diamètre des préparation au-delà de 150 $\mu$ m <sup>[123]</sup>. Il est donc nécessaire de prendre des précautions concernant les résultats des études effectuées sur des muscles papillaires murins qui font de plus de 250 $\mu$ m voir jusqu'à 600 $\mu$ m et qui donc s'exposent à une ischémie au sein de la préparation musculaire <sup>[10]</sup>.

### **3.2.1.7 Conclusion sur la FFR**

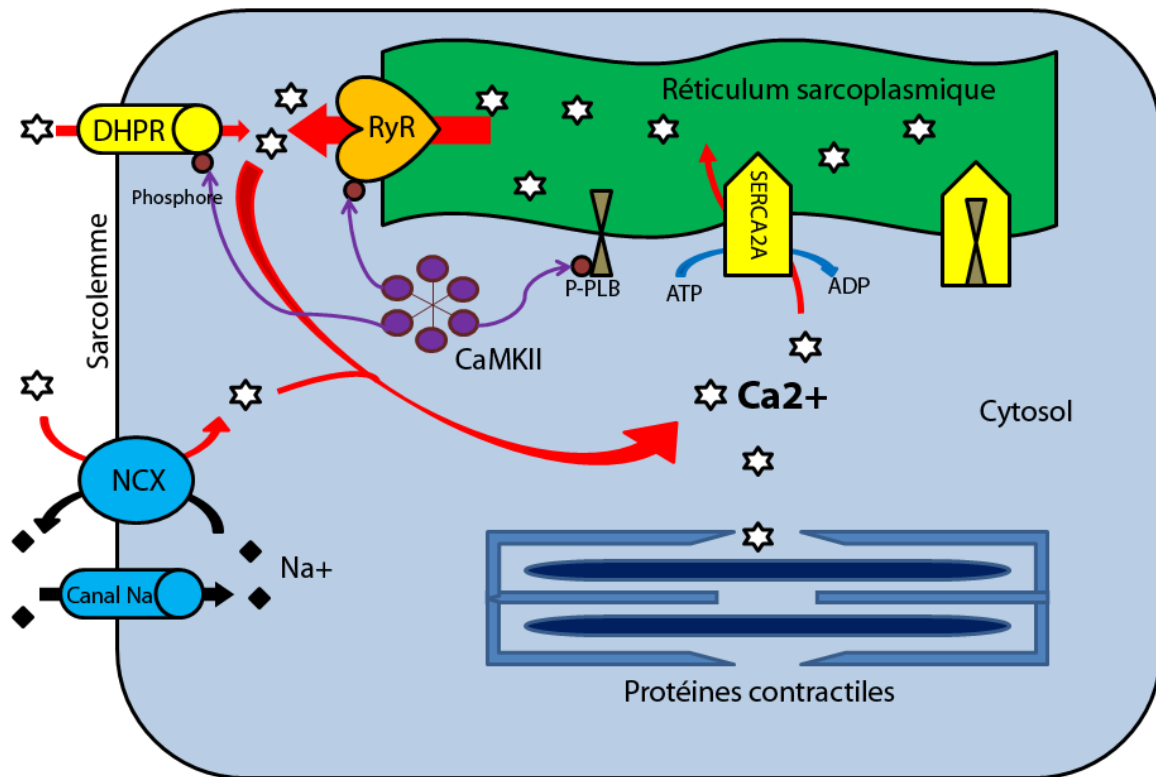
La relation force fréquence est un phénomène complexe dont les mécanismes ne sont pas parfaitement élucidés. Divers mécanismes intracellulaires participent à la modulation de la FFR.

Nous pouvons proposer un modèle de voie intracellulaire à l'origine de la FFR.

Lors de l'augmentation de fréquence on observe une augmentation des courants calciques par les canaux de type L possiblement liée à la phosphorylation du canal par CaMKII. Une entrée de calcium par une action reverse de l'échangeur Na-Ca sarcolemmique (NCX) survient afin de faire sortir les ions sodium accumulés avec la répétition des dépolarisations. Une augmentation du contenu en calcium du SR par augmentation de l'activité de SERCA2A par la levée de l'inhibition exercée par PLB qui a été phosphorylé par CaMKII. De plus l'augmentation du contenu calcique en calcium est favorisé part par l'augmentation du pool calcique cellulaire secondaire a l'entrée de calcium par NCX. La libération calcique par le SR est augmentée d'une part suite à l'augmentation du contenu calcique du SR et d'autre part secondairement à la phosphorylation du RyR par CaMKII.

CaMKII dont l'activité est modulée par la fréquence des variations de calcium cytosolique pourrait donc avoir un rôle clef dans la relation force fréquence.

La figure 18 illustre les principaux acteurs impliqués dans FFR dans le cardiomyocyte.



**Figure 18 : Mécanismes intra-cardiomyocytaires de la relation force fréquence**

Schéma représentant les principales voies de signalisation évoquées comme pouvant participer à la relation force-fréquence (pour détail voir texte). Les flux calciques sont représentés en rouge. Le calcium est représenté par une étoile blanche, le sodium par un losange noir, le phosphore par un rond marron.

## 4 LA RELATION RELAXATION-FREQUENCE

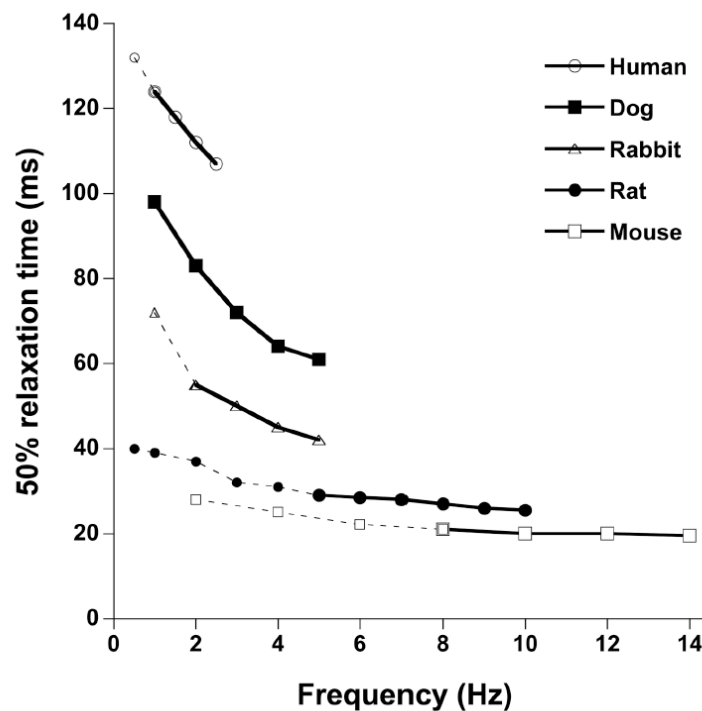
On définit comme relaxation la phase du cycle cardiaque entre le pic de force contractile développée par le myocarde et l'arrivée à un stade de remplissage passif. Lors de la tachycardie, la rapidité de cette relaxation va influencer la vitesse du remplissage et la durée pendant laquelle le ventricule va se remplir. Elle influera donc indirectement sur la précharge ventriculaire, et donc, conformément à la relation de Frank et Starling, elle participe à l'adaptation de la force contractile et du débit cardiaque.

### 4.1 Présentation clinique et fonctionnelle

Non seulement le cœur se contracte plus fort lors de la tachycardie mais il se contracte et se relâche également plus vite. L'accélération de la cinétique de relaxation ventriculaire est cruciale à l'adaptation à la tachycardie puisque cette dernière réduit la durée du cycle cardiaque et le temps que le cœur a pour se remplir est donc plus court. La nécessité d'une accélération du remplissage ventriculaire au cours de la tachycardie est donc évidente sans quoi l'augmentation de force contractile ne serait d'aucune utilité puisque le volume à éjecter se retrouverait amputé par la diminution du temps diastolique. De plus le flux coronaire se faisant principalement pendant le temps diastolique la préservation de ce dernier est important pour la bonne perfusion du muscle cardiaque. Ainsi l'accélération de la relaxation myocardique avec l'augmentation de fréquence permet de préserver tant le remplissage ventriculaire que la perfusion coronaire.

L'accélération fréquence-dépendante de la relaxation myocardique (FDAR) est présente dans toutes les espèces<sup>[10]</sup>. Elle est monophasique, à savoir que dans

toutes les espèces et quelle que soit la fréquence de base, l'augmentation de la fréquence cardiaque induit une accélération de la relaxation (figure 19).



**Figure 19 : Accélération fréquence dépendante de la relaxation**

Relation relaxation fréquence observée pour différentes espèces. On remarque que toutes les espèces présente à des degrés divers une accélération fréquence dépendante de la relaxation. D'après <sup>[10]</sup>.

Expérimentalement, sur des modèles de cœur isolés perfusés, la relaxation peut être évaluée par la pente maximale de diminution de pression ( $-dP/dt$ ), le temps de demi-relaxation correspondant au temps entre le pic de contraction et le milieu de la pente de diminution de pression. La modélisation mathématique de la courbe de décroissance de pression ventriculaire dans des modèles expérimentaux animaux dans les années 1970 a amené la notion de constante de temps de relaxation ( $\tau$ ).

$$P = P_0 \exp(-t/\tau)$$

La formulation habituellement retenue <sup>[124]</sup> est celle proposée par Weiss où  $\tau$  est une constante liant le temps à la pression ventriculaire dans sa phase de relaxation isovolumétrique selon une relation exponentielle <sup>[125]</sup>;  $t$  est le temps,  $P$  est la

pression développée par le ventricule et  $P_0$  la pression au temps zéro (le début de la relaxation isovolumétrique) <sup>[124]</sup>.

En mesurant la force développée sur des modèles de fibre musculaire isolée ou en mesurant le raccourcissement d'une fibre musculaire ou d'un cardiomyocyte isolé on peut explorer la relaxation en recueillant des paramètres similaires permettant de calculer la constante de relaxation ( $\tau$ ).

Expérimentalement cette propriété peut-être observée aussi bien au niveau d'un cœur entier isolé perfusé qu'au niveau d'un cardiomyocyte isolé, témoignant ainsi qu'il s'agit d'une propriété intrinsèque du myocarde et pas seulement d'un effet lié à la géométrie et la cinétique du muscle myocardique. Bien que ces dernières participent à l'efficacité de la relaxation musculaire et à son remplissage <sup>[126]</sup>. Il a également été montré que les indices de relaxation obtenus expérimentalement ex-vivo sont évaluables in vivo par l'intermédiaire d'exploration échocardiographique par l'intermédiaire de la mesure du temps de relaxation isovolumétrique, de l'indice de  $Te_i$ , de l'onde protodiastolique recueillie en doppler tissulaire à l'anneau mitral ( $Ea$ ) et la vitesse de propagation de l'onde de flux mitral de remplissage précoce <sup>[127]</sup>.

## **4.2 Mécanismes impliqués dans la relation relaxation-fréquence**

Le principal déterminant de la relaxation est la diminution de concentration du calcium intracytoplasmique  $[Ca]_i$ . La myosine se retrouvant ainsi sans calcium ne va plus se lier à l'actine et le sarcomère va alors reprendre sa position de repos qui dépend de la tension exercée sur le cardiomyocyte, la précharge, principalement dépendante du remplissage ventriculaire. La rapidité avec laquelle le cardiomyocyte va se relâcher dépend essentiellement de la recapture calcique par le réticulum sarcoplasmique, celle-ci pouvant être modulé au cours de la tachycardie. D'autres phénomènes interviennent dans la rapidité de la relaxation comme le niveau d'affinité des myofibrilles au calcium.

### 4.2.1 Elimination du calcium cytoplasmique

Le calcium ayant vu sa concentration intracytoplasmique augmenter par dix fois (de 100nM à 1µM) en environ 100ms<sup>[5]</sup> suite au CICR lors de la contraction, va devoir être éliminé du cytosol. Il va principalement être réabsorbé par le réticulum sarcoplasmique par l'intermédiaire de la SERCA2a <sup>[23, 24]</sup>. Une partie du calcium cytoplasmique va être éliminé hors de la cellule par l'échangeur Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>.

Le blocage de la recapture calcique par le SR bloque complètement le FDAR montrant bien que c'est un élément fondamental de ce phénomène <sup>[51, 63, 128]</sup>.

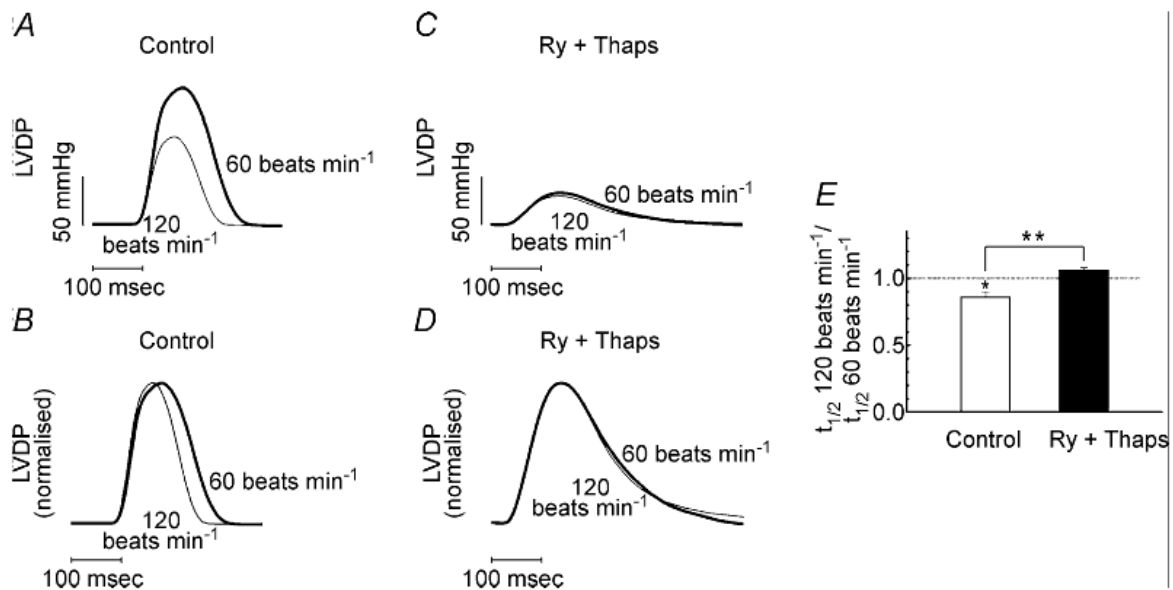
#### 4.2.1.1 Rôle de SERCA2a

La Calcium ATPase sarcoplasmique est l'enzyme principale de la réabsorption du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. Dans le cardiomyocyte on retrouve son isoforme SERCA2a. Elle permet le transport de 2 ions Ca<sup>2+</sup> par molécule d'ATP hydrolysée<sup>[129]</sup>. Elle peut être inhibée par la thapsigargine.

Il a été montré qu'au cours de l'insuffisance cardiaque la diminution de l'activité de SERCA2 contribue à une moindre diminution du calcium intracytoplasmique et à une persistance d'une force résiduelle diastolique, de plus ce phénomène est majoré par l'augmentation de fréquence <sup>[52, 130, 131]</sup>.

La relation relaxation fréquence (FDAR) est dépendante du fonctionnement du SR <sup>[132]</sup>. En effet le rôle de SERCA dans FDAR a été mis en avant par plusieurs études utilisant le blocage pharmacologique de SERCA par de la thapsigargine et entraînant une abolition de FDAR <sup>[133, 134]</sup>. La figure 20 illustre l'abolition de FDAR par le blocage de la fonction sarcoplasmique en utilisant de la ryanodine et de la thapsigargine. En l'absence de traitement l'augmentation de fréquence entraine dans ces conditions expérimentales une FFR négative (A) et une accélération de la relaxation plus facilement visualisable lorsque l'on normalise l'intensité de la contraction (C) ou que l'on constate que le temps de demi-relaxation à fréquence élevée est à 86% de celui à la fréquence de base. En présence des inhibiteurs la FFR disparaît de même que

FDAR (B et D) avec un  $t_{1/2}$  presque inchangé quelle que soit la fréquence de stimulation.



**Figure 20 : Nécessité du bon fonctionnement du reticulum sarcoplasmique pour FDAR**

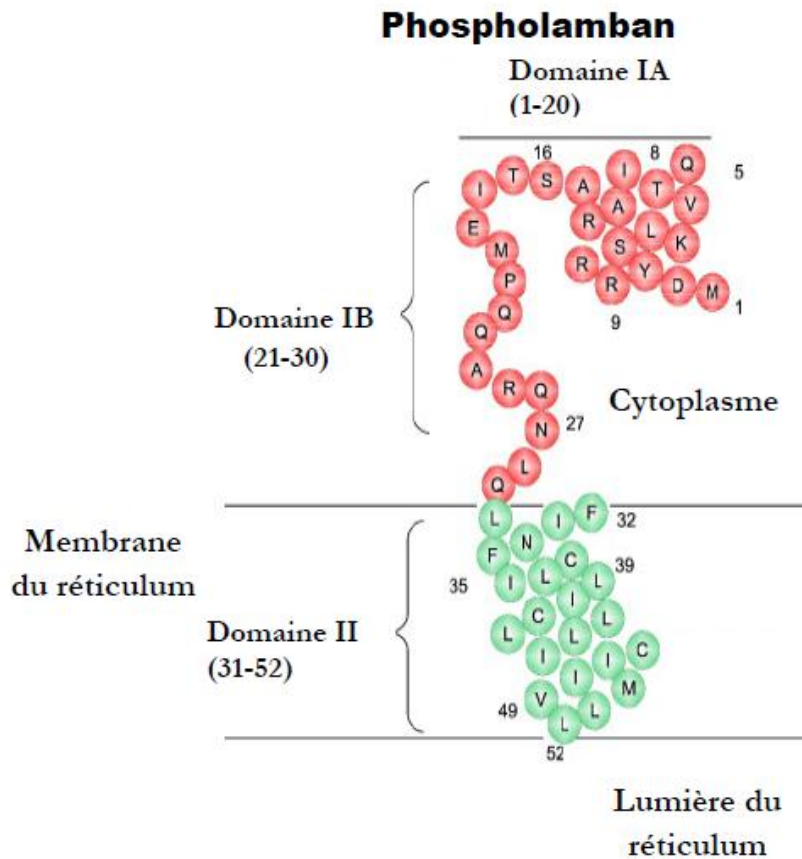
A, enregistrement de la pression développée par le ventricule gauche (LVDP) sur cœur isolé de rat. L'augmentation de la fréquence entraîne une diminution de la LVDP (FFR négative). B, enregistrements normalisés de LVDP montrant que cette FFR négative est associée à une accélération de la relaxation (FDAR). C et D, l'inhibition de la fonction du SR par un mélange de ryanodine et thapsigargin diminue la force contractile et entraîne une abolition de FFR et de FDAR. E, ratio de temps de demi-relaxation entre la haute et la basse fréquence. Les cœurs contrôles ont un ratio inférieur à 1 témoignant de l'effet de la fréquence sur la relaxation. Les cœurs traités par ryanodine et thapsigargin ne présentent pas cet effet. Résultats en moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs ratio de 1 ; \*\*  $p < 0,05$  vs contrôle.

#### 4.2.1.2 Rôle du Phospholamban

##### 4.2.1.2.1 Le Phospholamban

Le phospholamban est un petit peptide de 52 acides aminés pour un poids moléculaire de 6kD. Il comprend un domaine cytoplasmique IA de 20 acides aminés dont la conformation est une hélice  $\alpha$ , un domaine IB également cytoplasmique jusqu'au 30<sup>ème</sup> acide aminé et enfin un domaine II qui est hydrophobe, organisé en hélice  $\alpha$  et qui se situe dans la partie transmembranaire de la molécule [135-137] (Figure 21). Le phospholamban se présente soit sous forme de monomère qui a une forte action inhibitrice sur SERCA, soit sous forme de pentamère dont l'activité inhibitrice est moindre [138]. Cette forme pentamérique est considérée comme un pool

inactif de PLB. Le PLB est fortement exprimé sur la membrane du SR du muscle cardiaque et du muscle strié lent mais il est absent du muscle strié rapide.



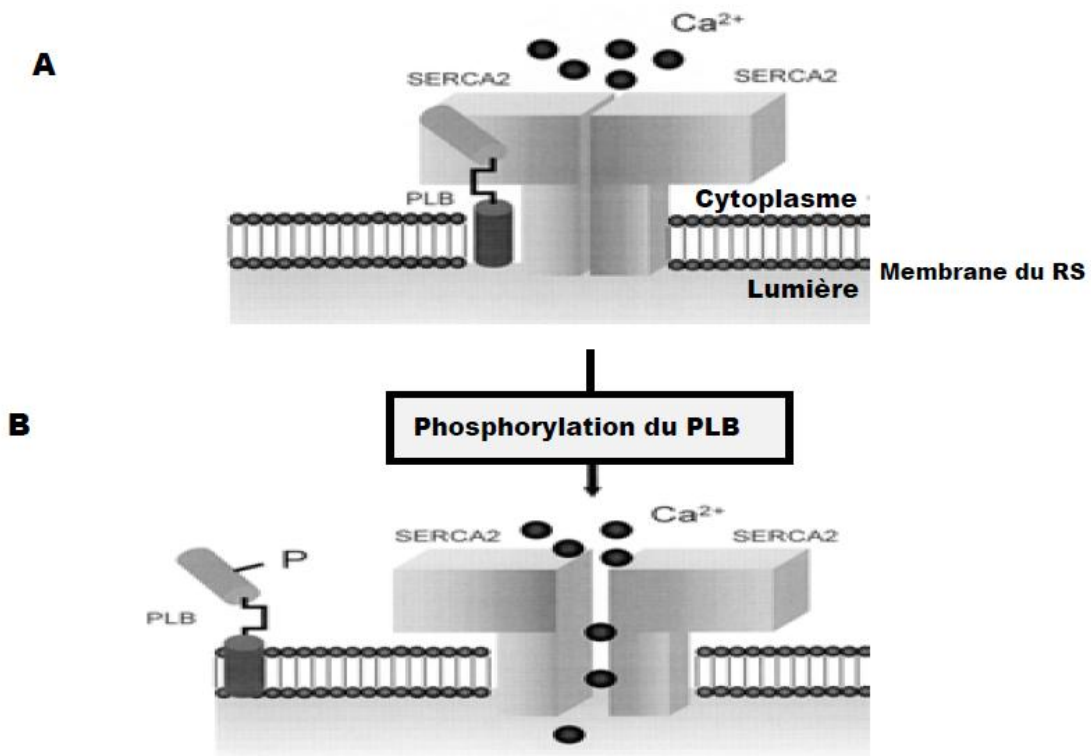
**Figure 21 : Représentation schématique de séquences protéiques du phospholamban**

Les accolades représentent les différents domaines de la protéine. Le domaine I est hydrophile et se trouve sur le versant cytosolique, le domaine II est hydrophobe et est enchassé dans la bicouche lipidique de la membrane du réticulum.

Le PLB fait partie de la membrane du SR et il est colocalisé avec SERCA. Il exerce une action inhibitrice sur SERCA2a et cette inhibition est levée si PLB est phosphorylé ou pour des concentrations élevées de calcium <sup>[139-142]</sup> (Figure 22). La phosphorylation de PLB peut se faire en deux sites du domaine IB : sur la Serine 16 par l'intermédiaire de la PKA et sur la Thréonine 17 par l'intermédiaire de la CaMKII <sup>[142, 143]</sup>. Cette phosphorylation va permettre une augmentation d'affinité de SERCA pour le Ca<sup>2+</sup> mais sans augmenter la V<sub>max</sub> de transfert calcique <sup>[144]</sup>. La



déphosphorylation du PLB se fait principalement par l'action de PP1 (70%) et de manière moins importante par PP2A et PP2C (20%) [145].



**Figure 22 : Mécanisme d'action du phospholamban**

A, L'association du PLB avec SERCA2 inhibe le transport de calcium dans le réticulum sarcoplasmique. B, La phosphorylation du PLB permet la dissociation de SERCA2 et lève l'inhibition exercée par le PLB, pour activer le transport de calcium par la pompe SERCA2.

L'équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation du PLB permet donc une régulation de l'activité de SERCA2a. Il a donc un rôle régulateur dans les flux calciques sarcoplasmiques. Sa phosphorylation a un rôle facilitateur sur la réabsorption de calcium par le SR et donc facilite la relaxation. De plus en permettant une augmentation du pool calcique sarcoplasmique il peut favoriser l'augmentation d'amplitude du transitoire calcique et donc l'augmentation de force contractile [146-148].

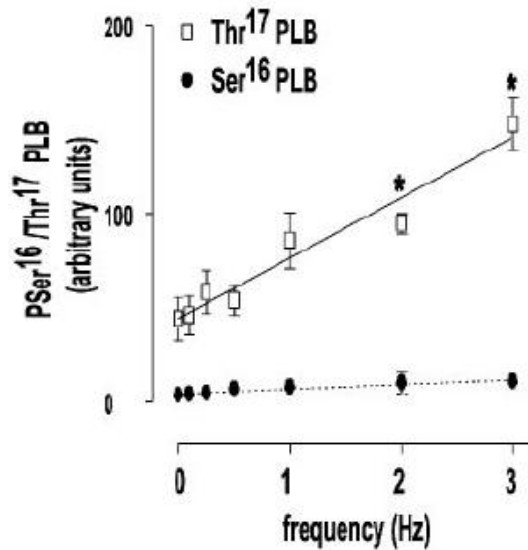
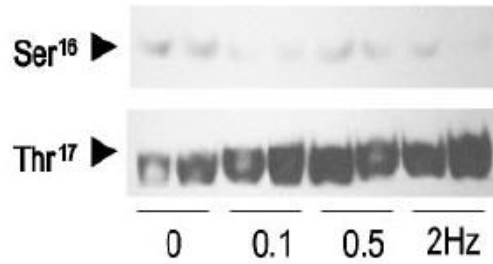
#### 4.2.1.2.2 Phospholamban et FDAR

L'implication du Phospholamban et de son niveau de phosphorylation est sujette à controverse. Bien que l'action de la CaMKII sur le PLB tende à faire penser que

celui-ci puisse être impliqué dans le FDAR avec plusieurs publications allant dans ce sens <sup>[30, 132, 149, 150]</sup>, mais d'autres publications tendent à exclure la possibilité d'une régulation de FDAR par PLB <sup>[133, 151]</sup>

La CaMKII exerce une action facilitatrice sur SERCA2a par l'intermédiaire d'une levée d'inhibition exercée par PLB. Elle agit par phosphorylation du PLB sur son résidu thréonine-17 (Thr-17) qui entraîne alors un découplage de PLB et SERCA2a qui va augmenter l'activité de SERCA2a. l'implication de ce mécanisme dans le FDAR a été proposé par Schoutten en 1990 <sup>[132]</sup>. Hagemann a montré que la phosphorylation de PLB sur la Thr-17 par CaMKII augmente lorsque la fréquence augmente (Figure 23) en comparaison avec la phosphorylation sur la Serine 16 qui elle est le fait de la PKA dont l'activité est augmentée par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques. Et dans le même temps il constate une accélération de la relaxation avec l'augmentation de fréquence <sup>[149]</sup>. Valverde ne constate cette augmentation de phosphorylation en Thr-17 avec l'augmentation fréquence de stimulation que sur des préparations de myocytes de chats et pas sur les préparation de cœur isolé de rat ou de muscle papillaire de chat qu'il a utilisé dans le même travail <sup>[133]</sup>. Bluhm a lui constaté une diminution de FDAR chez des souris Knock-Out pour le PLB mais il est intéressant de noter qu'il persiste un FDAR mais nettement moins important <sup>[30]</sup>.

D'autres publications tendent à écarter l'implication de PLB dans la régulation de FDAR. Ce phénomène apparait en effet plus rapidement que n'apparait la phosphorylation de PLB sur sa Thr-17 <sup>[133]</sup>. Il persiste une accélération fréquence dépendante de la relaxation chez des souris qui présentent une mutation du site de phosphorylation de PLB par la CaMKII <sup>[152]</sup> et chez des souris knock-out pour le phospholamban <sup>[24, 30, 151]</sup> bien qu'il persiste une action des inhibiteurs de CaMKII sur FDAR dans certains de ces travaux.



**Figure 23 : Phosphorylation fréquence dépendante du phospholamban**

Des cardiomyocytes isolés ont été stimulés en l'absence de stimulation b-adrénergique de 0,1 à 3 Hz pendant 5 minutes. On a mesuré la phosphorylation en Ser16 et Thr17 du phospholamban. En haut, exemple de western-blot. En bas moyenne des résultats (n=5-10 pour chaque donnée, \*p<0.01). D'après [149].

#### 4.2.1.3 Calcium-Calmodulin Kinase II

La CaMKII a été proposée comme un modulateur important du FDAR car son action est dépendante de la concentration en calcium et même de la fréquence de l'augmentation de concentration et qu'elle exerce un effet sur le phospholamban qu'elle phosphoryle levant ainsi l'inhibition sur SERCA2a et facilitant la recapture calcique et donc la relaxation. Mais les résultats sont parfois contradictoire quand à l'implication de la CaMK dans le FDAR.

Dans un modèle de myocytes ventriculaires comparant la relaxation et la recapture calcique entre des myocytes stimulés régulièrement ou des myocytes stimulés après

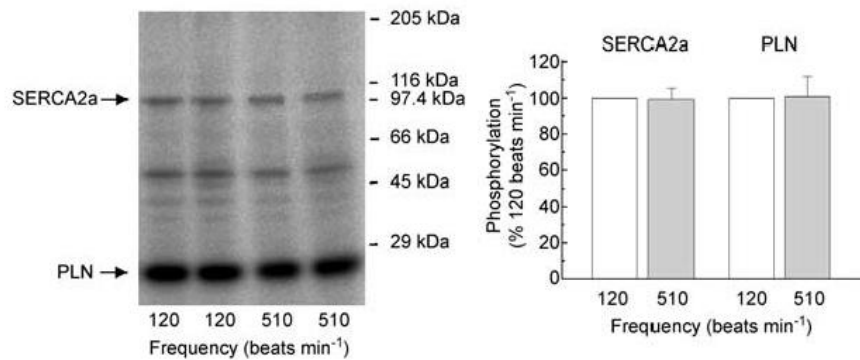
une période de repos, on constate dans le groupe « post-repos » un ralentissement de la relaxation et de la recapture calcique, constaté par l'allongement du temps de demi-relaxation et par l'augmentation de la constante de temps de diminution de la concentration calcique. Dans ce même travail, Bassani a montré que l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de CaMKII le KN-62 entraîne une abolition de cette différence, suggérant l'importance de CaMKII dans la modulation de la vitesse de relaxation et de recapture du calcium <sup>[128]</sup>.

De même Desantiago, dans un travail sur des modèles de fibres musculaires de souris et de cardiomyocyte de souris et de rat a montré que l'inhibition de CaMKII par deux inhibiteurs différents le KN-93 et l'*autocamide-2 related inhibitory peptide* (AIP) entraînent chacun et dans l'ensemble des modèles étudiés une forte inhibition du FDAR (de même pour la différence entre la stimulation de base et en « post-repos ») <sup>[151]</sup>.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent FDAR pourrait passer par l'action de CaMKII sur PLB en augmentant la phosphorylation de PLB sur la Thr17 lors de l'augmentation de fréquence <sup>[149]</sup>.

D'autres travaux tendent plutôt à écarter l'hypothèse de l'implication de CaMKII dans le FDAR. Plusieurs travaux retrouvent des résultats contradictoire avec les précédents, ils ne retrouvent pas de modification du raccourcissement de la contraction ou du transitoire calcique lors de l'utilisation, sur des fibres myocardiques isolées, de différents inhibiteurs spécifiques de CamKII (KN-62, KN-93) ou par un inhibiteur de kinase non spécifique (K-252a) <sup>[62, 133, 134, 153]</sup>. De plus Valverde ne retrouve pas l'augmentation de phosphorylation de PLB avec l'augmentation de fréquence <sup>[133]</sup> qui avait été constaté par Hagemann <sup>[149]</sup>. Il est tout de même nécessaire de noter que les modèles utilisés étaient différents : cœur isolé perfusé et muscle papillaire pour Valverde et cardiomyocytes isolés pour Hagemann et que les fréquences de stimulation explorées sont de 2 à 8,5 Hz par Valverde alors qu'elles sont de 0,1 à 3 Hz pour Hagemann. Ces différences ne remettent pas totalement en cause les résultats observés mais pourrait éventuellement les expliquer.

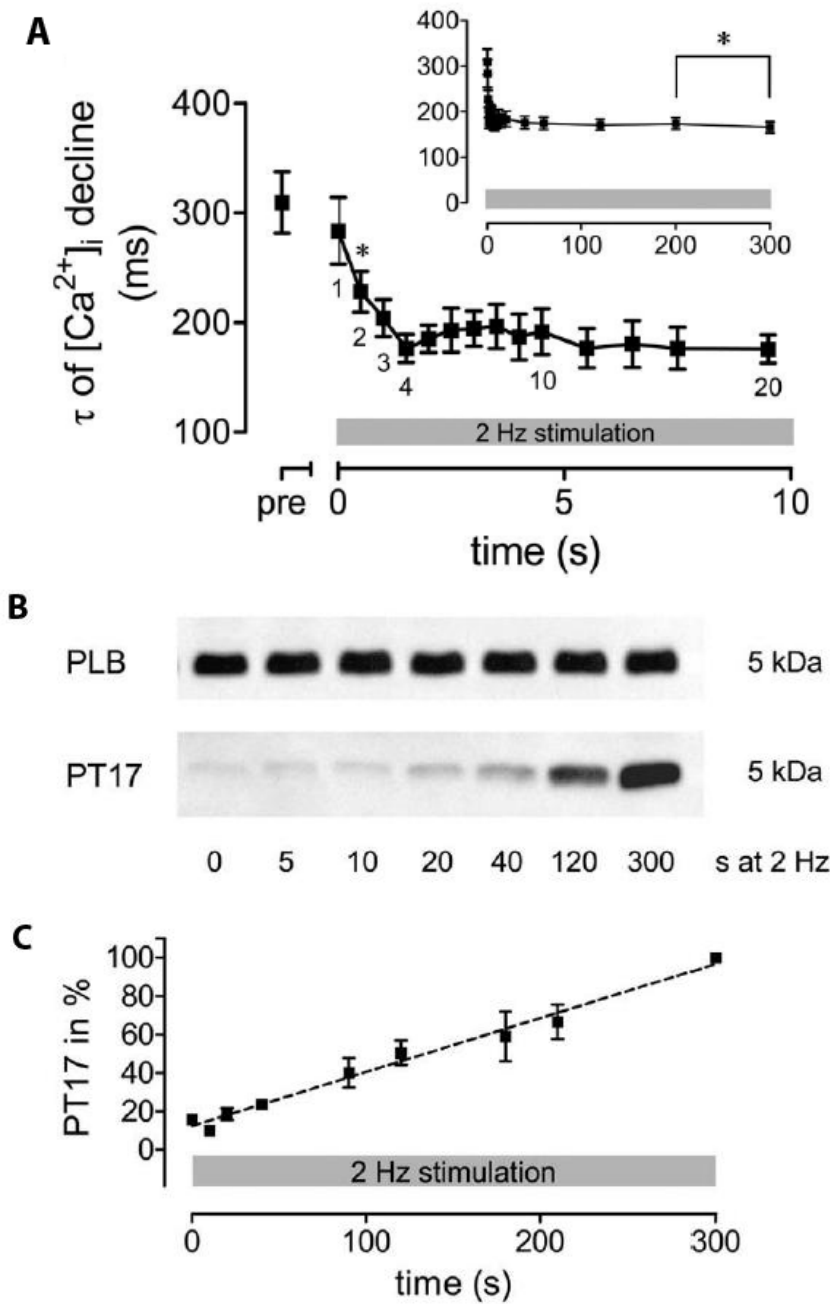
Une autre possibilité pourrait être une action directe de CaMKII sur SERCA2a en phosphorylant cette dernière afin d'augmenter son activité. Le travail de Valverde à exploré cette hypothèse et ne retrouve pas de modification de phosphorylation de SERCA2a entre 120 batt/min (2 Hz) et 510 batt/min (8,5 Hz) <sup>[133]</sup> (figure 24).



**Figure 24 : Effet de la fréquence de stimulation sur la phosphorylation par CaMKII des membranes de SR**

Phosphorylation par la CaMKII endogène et de l'ATP marqué, des protéines de membranes de SR isolées de cœurs de rats stimulés à 120 ou 510 bpm. A gauche autoradiogramme, A droite résultats regroupés en moyenne $\pm$  SEM des expérimentations (n=9). On ne remarque pas de changement de phosphorylation de SERCA2A et de PLB par la fréquence. D'après <sup>[133]</sup>.

D'autres éléments plaident en faveur de l'implication d'autres voies que CaMKII dans le FDAR. En effet Huke a mis en avant l'incompatibilité temporelle entre la rapidité de survenue du FDAR et le temps nécessaire à la phosphorylation de Thr17 sur le PLB <sup>[154]</sup>. La figure 25 issue de ce travail montre (A) que la diminution de la constante de temps de la recapture de calcium diminue rapidement pour atteindre son plateau au bout d'environ 4 battements à 2 Hz (soit 2 secondes) alors que (B et C) l'augmentation de la phosphorylation sur Thr17 du PLB augmente graduellement jusqu'à 300s. Ce travail montre donc que bien qu'il y ai une phosphorylation de certaines protéines impliquées dans la recapture calcique, il n'y aurait pas de parallélisme entre l'ampleur de la phosphorylation de Thr17 par CaMKII et le FDAR, ce qui implique que ce ne soit pas les mécanisme de premier plan impliqués dans FDAR.



**Figure 25 : Dissociation temporelle de la diminution de tau et de la phosphorylation de PLB sur Thr17**

A, Mesure de la décroissance de la concentration calcique cytosolique. La diminution de  $\tau$  se fait dès les premières contractions suivant l'augmentation de fréquence (passage de 0,1 à 2 Hz) puis atteint un plateau en 5s. Une légère diminution de  $\tau$  est observée après plus de 3 minutes de stimulation à 2Hz. B et C augmentation de la phosphorylation du PLB sur la thréonine 17 (PT17) ; cette phosphorylation est croissante après stimulation de la cellule à 2 Hz et n'atteint pas de plateau avant 5 minutes. Adapté d'après [154].

#### **4.2.1.4 Phosphatases**

Les protéines-phosphatases sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires <sup>[155]</sup>, elles ont un haut degré de conservation entre les différents mammifères. On distingue principalement deux familles PP1 et PP2 de part leur capacité à être inhibées par certains inhibiteurs protéiques. Les PP2 sont divisées en PP2A qui n'a pas besoin de ligand cationique pour son activité et PP2B (la calcineurine) et PP2C qui requièrent un ligand cationique, le calcium avec la calmoduline pour PP2B et le magnésium pour PP2C <sup>[156]</sup>. Elles effectuent leurs activités sur les résidus Serine ou Thréonine phosphorylés. D'autres sous types de protéine-phosphatases ont été isolées plus récemment (PP4,...,PP7).

Agissant à de nombreux niveaux dans la régulation de l'activité contractile du cardiomyocyte l'implication directe de l'activité des protéines phosphatases dans la régulation de la relaxation myocardique n'a que très peu été exploré. Il est intéressant de noter que son implication a déjà été évoquée dans l'accélération de la relaxation cardiomyocytaire dans un travail comparant des cardiomyocytes de rats nouveaux nés à ceux de rats adultes et constatant une activité de PP1 et PP2a diminuée ainsi qu'une accélération de la recapture du calcium et de la relaxation chez les rats adultes, mais ce travail n'établi pas directement le lien de causalité entre les deux phénomènes <sup>[157]</sup>.

#### **4.2.1.5 Rôle de l'Echangeur Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>**

L'échangeur Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> participe à l'élimination du calcium après la contraction cardiomyocytaire. L'augmentation de la force persistant en diastole et de l'augmentation de la concentration diastolique en calcium cytoplasmique a été constaté dans l'insuffisance cardiaque <sup>[130]</sup>. Cette augmentation de force diastolique peut-être liée à une altération de la recapture de Ca<sup>2+</sup> par SERCA mais la diminution de l'activité de NCX peut également participer à ce phénomène. En effet Schillinger retrouve une augmentation de la force diastolique lors de l'augmentation de

fréquence et observe que plus la quantité de NCX est élevée moins il y a d'augmentation de force diastolique <sup>[158]</sup>. De même Hassefuss observe sur des biopsies de myocarde d'insuffisance cardiaques sévères une majoration de la force diastolique avec l'augmentation de fréquence d'autant plus importante que le tissu était pour en NCX <sup>[159]</sup>. Ces arguments plaident en faveur d'une implication de l'élimination de Ca<sup>2+</sup> par NCX lors de l'augmentation de fréquence, mais il est possible que ce mécanisme ne soit mis en jeu que lors de l'insuffisance cardiaque qui entraîne déjà une altération de l'élimination du calcium cytoplasmique par une altération de la fonction de SERCA <sup>[52, 159]</sup>.

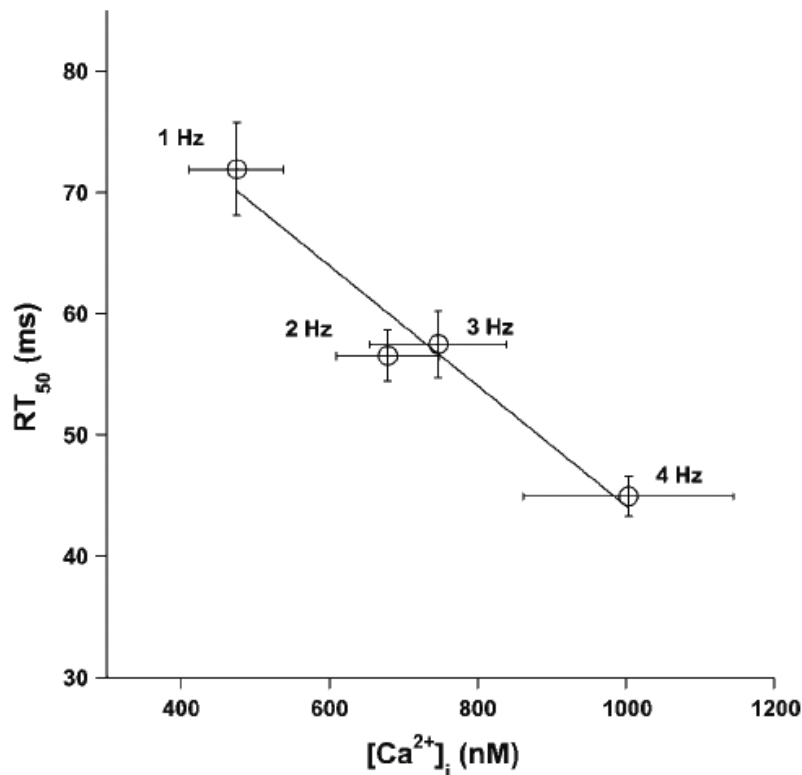
#### **4.2.2 Sensibilité des myofibrilles au calcium**

L'implication dans le FDAR d'un mécanisme indépendant de CaMKII est évoqué par plusieurs publications <sup>[62, 133, 134, 153, 154]</sup>. Les publications impliquant CaMKII utilisent principalement des modèles de fibres isolées sans contrainte d'étirement appliquée sur les fibres. Dans ces conditions la longueur des sarcomère au repos est réduite (1,6 à 1,9  $\mu\text{m}$ ) alors qu'au repos elle est dans les conditions physiologiques de 2,0 à 2,3  $\mu\text{m}$  <sup>[160]</sup>. Avec ces longueurs de sarcomères réduite et en l'absence de force appliquée sur la fibre musculaire, il est possible que dans ces conditions le déterminant principal de la relaxation soit lié à la capacité de recapture du calcium cytoplasmique. Pour ces courtes longueurs de sarcomère la sensibilité des myofibrilles au calcium est très réduite <sup>[161]</sup> et la contraction est nettement plus rapide dans ce fibres sans contrainte de repos <sup>[162, 163]</sup>. Dans ces conditions la rapidité de diminution du calcium cytoplasmique pourrait être le facteur prépondérant de la modulation de la relaxation. En effet sur des myocytes isolés, sans contrainte de repos et a des fréquences de contraction lentes, l'inhibition de l'action de CaMKII sur le SR entraîne une inhibition de FDAR <sup>[151, 164]</sup>. Mais dans des conditions plus proches de la physiologie, il est possible que la modulation de la contraction soit principalement dépendante d'autres mécanismes dépendant des propriétés des myofilaments <sup>[121, 165]</sup>.

Dans un modèle de fibres myocardique de lapin Varian a retrouvé un FFR et un FDAR de même qu'une diminution de la sensibilité des myofibrilles au calcium <sup>[166]</sup>.



La figure 26 issue de ce travail montre la relation entre le temps de demi-relaxation (RT50) et un index de sensibilité au calcium (EC50) qui correspond a la concentration calcique nécessaire pour atteindre 50% de la force contractile maximale. On constate qu'avec l'augmentation de la fréquence de stimulation on peut observer un FDAR (diminution de RT50 avec la fréquence) et une augmentation de l'EC50 qui témoigne de la nécessité d'une plus grande concentration en calcium pour obtenir 50% de la contraction maximale et donc d'une diminution de la sensibilité des myofibrilles au calcium.



**Figure 26 : Sensibilité des myofibrilles au calcium**

Relations entre l'EC50 (concentration en calcium pour obtenir 50% de la contraction maximale) en abscisse et le temps de demi relaxation (RT50) en ordonnée pour différentes fréquences de stimulation. On constate une accélération de la relaxation avec une diminution de la sensibilité des myofibrilles lorsque l'on augmente la fréquence de stimulation. D'après <sup>[166]</sup>

Dans cette même publication Varian constate avec l'augmentation de fréquence, une augmentation de phosphorylation de certaines protéines de l'appareil contractile : la Troponine I (TnI) et la chaîne légère de myosine (MLC2). Cette phosphorylation de TnI est connue comme étant liées a la désensibilisation des myofibrilles au

calcium [11, 167, 168]. Cette désensibilisation associée à la phosphorylation de cette protéine de l'appareil contractile est considérée comme prenant part dans l'accélération de la relaxation secondaire à la stimulation beta-adrénergique [11, 169-171].

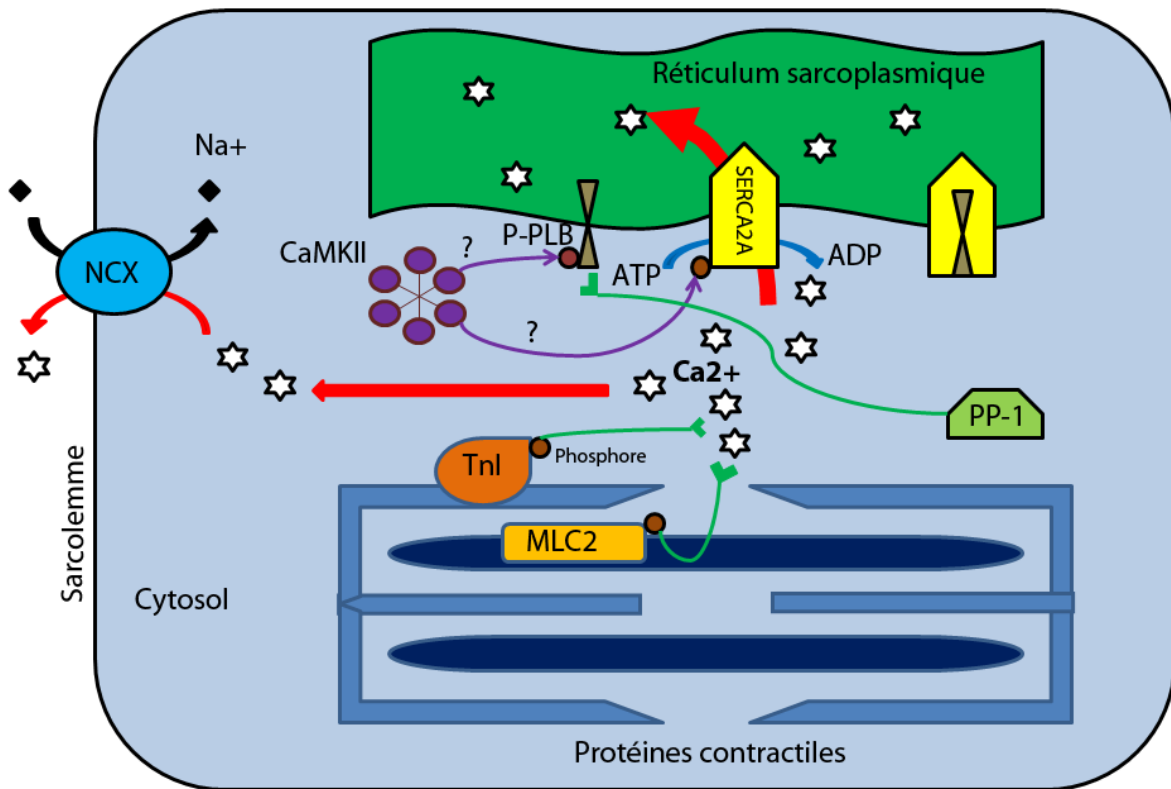
Une publication de Silver en 1986 avait également mis en avant l'augmentation de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine lors de l'augmentation de fréquence<sup>[172]</sup>. Mais bien que Dias constate également une augmentation de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine lors de l'augmentation de fréquence, il ne retrouve pas d'altération de FDAR lorsqu'il stimule des myocytes issus de souris transgénique qui ne peuvent phosphoryler leur chaîne légère de myosine<sup>[173]</sup>. Cette phosphorylation aurait plutôt un effet de sensibilisation des myofibrilles au calcium [11, 174]. Elle est particulièrement observée lors de l'augmentation de l'AMPc en réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique. Le complexe Ca<sup>2+</sup>-Calmoduline est impliqué dans l'activation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) et entraîne ainsi la phosphorylation de MLC2, comme le montre la publication de Suematsu<sup>[120]</sup>. Dans ce même travail l'utilisation d'acide okadaïque (un inhibiteur de phosphatase agissant principalement sur PP1 et PP2A) entraîne une augmentation de la phosphorylation de MLC2 (dont la phosphorylation est dépendante de la MLCP une phosphatase de la famille PP1) et de manière plus marginale de Troponine I.

### 4.3 Conclusion sur FDAR

Les mécanismes de l'accélération fréquence dépendante de la relaxation sont encore très mal connus. De multiples publications sont contradictoires.

Nous avons vu que FDAR est dépendant de l'élimination diastolique du calcium intracytosolique. La principale voie d'élimination du calcium cytosolique est la recapture par le SR par l'intermédiaire de SERCA2A. l'activité de SERCA2A est augmentée lorsque PLB est phosphorylé et cette phosphorylation peut-se faire par l'intermédiaire de CaMKII dont l'activité est dépendante de la fréquence des pics de concentration calcique. CaMKII pourrait également augmenter l'activité de SERCA2A

par une phosphorylation directe de SERCA par CaMKII. Cependant l'implication de CaMKII et de PLB dans FDAR est controversée. La phosphorylation de PLB est également régulée par l'activité phosphatase en particulier PP1. Une diminution de l'activité phosphatase pourrait augmenter la relaxation. Un autre acteur de l'élimination du calcium cytosolique est NCX qui peut éliminer le calcium en le faisant sortir de la cellule contre des ions sodiums, NCX est impliqué dans la relaxation mais son rôle dans FDAR reste à déterminer. Enfin un autre mécanisme permettant d'améliorer la relaxation est la diminution de la sensibilité des myofibrilles au calcium et Tnl et MLC2 sont des protéines de l'appareil contractile dont la phosphorylation augmente avec la fréquence de stimulation et leur phosphorylation peut être à l'origine de la diminution de sensibilité des myofibrilles au calcium.



**Figure 27 : Mécanismes intra-cardiomyocytaires de la relation relaxation fréquence**

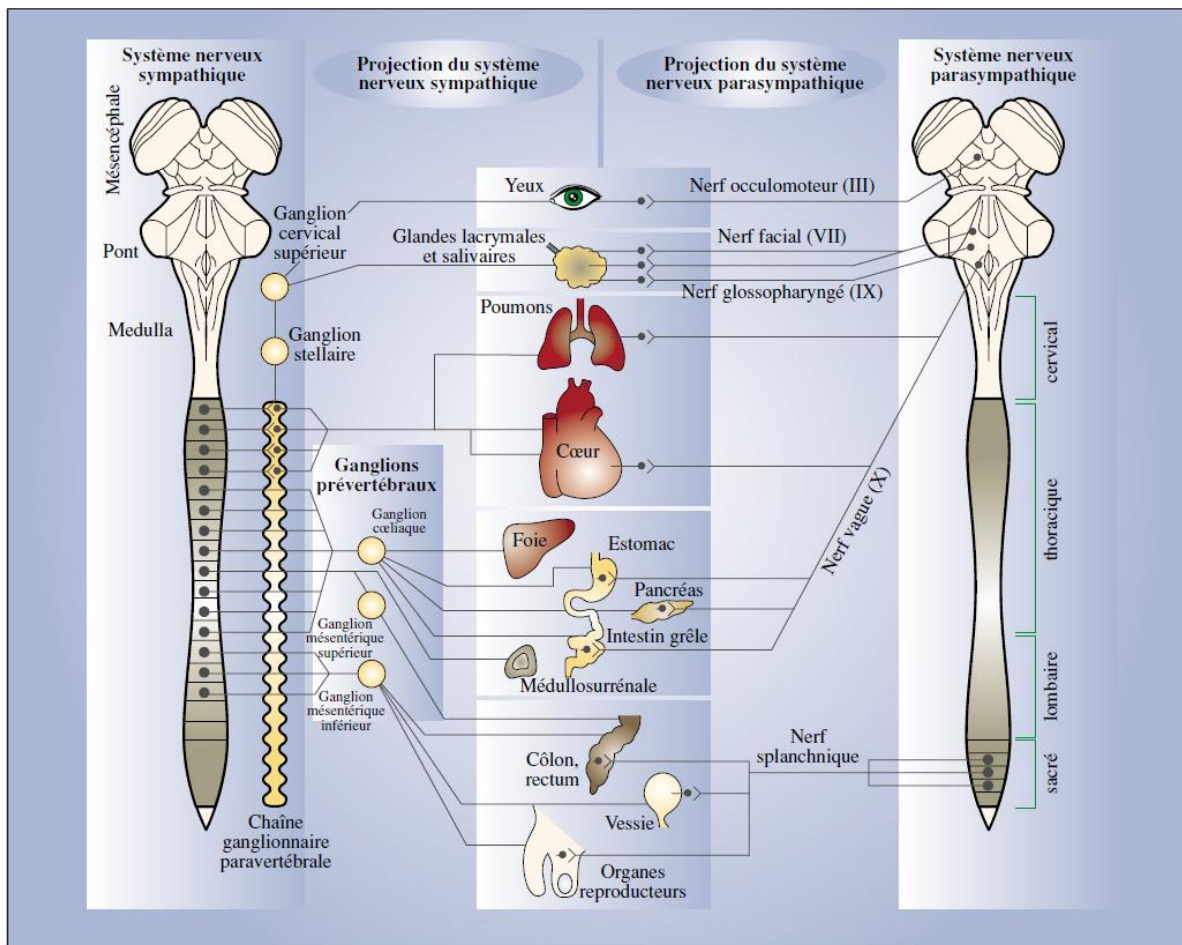
Schéma représentant les principales voies de signalisation évoquées comme pouvant participer à la relation relaxation-fréquence (pour détail voir texte). Les flux calciques sont représentés en rouge. Le calcium est représenté par une étoile blanche, le sodium par un losange noir, le phosphore par un rond marron.

# 5 REGULATION SYMPATHIQUE ET PARASYMPATHIQUE DE LA FONCTION CARDIAQUE

## 5.1 Organisation anatomique du système nerveux autonome

La connaissance du système nerveux neurovégétatif a grandement évolué depuis les travaux de Langley qui décrivait à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle un système nerveux autonome divisé en deux principales composantes : le système sympathique (ou orthosympathique ou adrénérergique) et parasympathique (ou cholinergique) [175, 176]. Ces deux systèmes assurent des fonctions liées à l'homéostasie du milieu intérieur. Ils ont des fonctions à la fois opposées et complémentaires. Chacun a son organisation anatomique, ses centres régulateurs et ses neurotransmetteurs propres. Ils agissent par interaction réciproques sur de nombreuses fonctions et en particulier sur la régulation de la fonction circulatoire (figure 28).

Le système nerveux autonome (SNA) présente la particularité d'avoir une organisation à deux neurones. Un neurone préganglionnaire dont le corps cellulaire est situé dans le système nerveux central : au niveau médullaire entre la première vertèbre dorsale et la troisième lombaire pour les neurones sympathiques ; au niveau du tronc cérébral et de la moelle de la deuxième à la quatrième racine sacrée. Un neurone postganglionnaire prenant naissance dans la chaîne ganglionnaire paravertébrale et les ganglions prévertébraux pour le système nerveux sympathique (SNS) et a proximité de l'organe innervé pour le système nerveux parasympathique (SNP) [5]. La régulation de la fonction cardiaque se fera par l'intermédiaire des quatre premiers ganglions paravertébraux pour le SNS et par la dixième paire crânienne, ou nerf vague, pour le SNP.



**Figure 28 : Contingents sympathique et parasympathique du système nerveux autonome**

Les neurones sympathiques préganglionnaires sont situés entre les premiers segments thoraciques et le deuxième segment lombaire médullaires. Les voies parasympathiques sont issues du tronc cérébral ou des racines sacrées médullaires. D'après Constant dans <sup>[177]</sup>.

## 5.2 Neurotransmission du système nerveux autonome

La neurotransmission consiste à convertir le signal nerveux en un signal biochimique par l'intermédiaire de neurotransmetteurs qui vont agir sur des récepteurs spécifiques. Le neurotransmetteur de tous les neurones préganglionnaires du SNA sont cholinergiques (ils libèrent de l'acétylcholine au niveau de leur synapse) de même que les neurones postganglionnaires du SNP, les neurones postganglionnaires du SNS libèrent principalement de la noradrénaline. La médullosurrénale agit comme un neurone postganglionnaire et libère dans la circulation de

l'adrénaline principalement et également de la noradrénaline et de la dopamine qui sont des précurseurs de l'adrénaline.

### **5.2.1 Récepteurs catécholaminergiques du myocarde**

Les récepteurs catécholaminergiques ou adrénérgiques (AR) appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Alquist a proposé une classification en 1948 <sup>[178]</sup> qui persiste actuellement même si elle s'est grandement étoffée <sup>[179]</sup>. Elle sépare les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénérgiques, eux même divisés en différents sous-types.

Classiquement l'AR principal au niveau du myocarde est le récepteur  $\beta$ -1 mais d'autres types de récepteurs sont également présents.

#### **5.2.1.1 Récepteurs $\alpha$ -adrénérgiques myocardiques**

Les récepteurs  $\alpha$ -adrénérgiques se répartissent en deux types,  $\alpha$ 1 ou  $\alpha$ 2, chacun étant divisé en trois sous-types.

Les  $\alpha$ 1, classiquement plus associé à la régulation de la fonction vasomotrice, sont également présents au niveau myocardique. Ils ont un effet inotrope positif lorsqu'ils sont stimulés <sup>[180]</sup>. Cet effet inotrope positif est triphasique : un effet inotrope positif initial, modéré et transitoire, suivi d'un effet inotrope négatif transitoire puis d'un effet inotrope positif soutenu <sup>[181]</sup>. Cette particularité pourrait être liée a certains effets antagonistes des sous-types de récepteurs  $\alpha$ 1A et  $\alpha$ 1B sur la contractilité et les transitoires calciques. Les récepteurs  $\alpha$ 1A sont couplés a des protéines Gq/11 qui vont stimuler la phospholipase C et entrainer une formation de phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate (IP3) et de diacylglycérol. L'IP3 se lie alors à son récepteur sur le SR et entraine une sortie de calcium hors du réticulum. Cela a pour effet une augmentation des transitoires calciques et donc de la contractilité. Les récepteurs  $\alpha$ 1B sont couplés a une autre protéine G et vont entrainer une diminution du

transitoire calcique et une augmentation de la sensibilité des myofibrilles au calcium. Ces effets contrasté de la stimulation  $\alpha$ 1-adrénergiques sont de plus modulés par la concentration extracellulaire en calcium, en effet l'action inotrope positive de la stimulation  $\alpha$ 1-adrénergique observée à 1mM est abolie lors d'une augmentation de la concentration calcique à 5mM.

Les récepteurs  $\alpha$ 2-adrénergiques sont classiquement retrouvés au niveau présynaptique jouant un rôle de modulation de la libération de la noradrénaline dans la synapse. On les retrouve également au niveau post synaptique dans le myocardiue humain, mais a des niveaux d'expression faible ce qui rend difficile l'interprétation de leur implication physiologique. Ils sont couplés a des protéines Gi/O. Leurs effets cellulaires sont une inhibition de l'adenylate cyclase, une activation des canaux potassiques rectifiant entrants et une inhibition des canaux calciques voltage dépendant, une activation des phospholipases, une stimulation de la libération intracellulaire de calcium et une stimulation des *mitogen activated protein kinase* (MAPK) <sup>[181]</sup>.

### **5.2.1.2 Récepteurs $\beta$ -adrénergiques myocardiques**

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques se répartissent en trois types,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 ou  $\beta$ 3, dont les effets et la localisation au niveau des tissus diffèrent.

Les récepteurs  $\beta$ 1 sont prédominants au niveau cardiaque ils représentent 70 à 80% des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans les ventricules humains, les 20 à 30% restant sont des récepteurs  $\beta$ 2 (pour les  $\beta$ 3 aucune donnée n'est à ce jour disponible). La proportion de récepteur  $\beta$ 2 est plus importante dans les cardiomyocytes de rats (30 à 40%)<sup>[181]</sup>. Les récepteurs  $\beta$ 3 n'ont pas a ce jour été retrouvés dans le myocarde de rat ou de souris<sup>[182]</sup>.

#### 5.2.1.2.1 Effets sur la fonction contractile cardiaque

L'effet inotrope positif est obtenu principalement par l'activation des Les récepteurs  $\beta_1$  myocardique mais également  $\beta_2$  myocardiques dans une moindre mesure <sup>[183]</sup>. Leur stimulation entraîne une augmentation du courant calcique de type L, une augmentation du transitoire calcique et donc de l'amplitude de contraction. Cet effet est lié au couplage des récepteurs a une protéine Gs stimulant l'adénylate cyclase et entraînant une production d'AMPc. L'AMPc va activer la Protéine Kinase A (PKA) qui va phosphoryler différentes protéines dont le DHPR et le RyR dont l'activité va être facilitée entraînant ainsi l'augmentation du courant calcique de type L et la libération du calcium sarcoplasmique <sup>[11, 181]</sup>. L'ensemble de cette séquence prend environ 15 secondes après une injection d'adrénaline <sup>[11]</sup>. La stimulation  $\beta_1$  entraîne une accélération de la diminution du transitoire calcique et donc de la relaxation myocardique, on parle d'effet lusitrope positif. La stimulation  $\beta_2$  n'entraîne pas d'effet lusitrope. Cette différence pourrait être liée a la phosphorylation PKA dépendante du Phospholamban par la stimulation  $\beta_1$ , la stimulation  $\beta_2$  ayant des effets négligeables, de plus la stimulation  $\beta_1$ -adrénergique, mais pas  $\beta_2$ , diminue l'affinité des myofibrilles au calcium par le biais de la phosphorylation de la troponine I<sup>[11, 181]</sup>. Ces différences pourraient être expliquées par une localisation particulière de chaque type de récepteur. Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont concentrés dans les cavéoles et leur stimulation n'augmente que très faiblement les niveaux d'AMPc intracellulaires <sup>[184]</sup>. Cette compartimentation est due a l'expression de phosphodiesterases qui régulent le catabolisme de l'AMPc <sup>[185]</sup>. Cette localisation permet une augmentation très localisée d'AMPc au niveau des canaux calciques de type L<sup>[186]</sup>. Une autre différence entre les deux type de récepteurs est liée a la capacité des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique à se coupler à une protéine Gi inhibitrice. Ce couplage ne peut être obtenu que lorsque le récepteur  $\beta_2$  est phosphorylé par la PKA suggérant que cette commutation de couplage aux protéines G se produit en cas de stimulation prolongée par un agoniste <sup>[181, 187]</sup>. Cette protéine Gi va entraîner une inhibition de la voie AMPc-PKA et donc inhiber les effets inotropes et lusitropes positifs. Enfin une stimulation prolongée du récepteur  $\beta_1$  peut entraîner une



augmentation de contractilité par une voie indépendante de PKA qui implique CaMKII <sup>[187, 188]</sup>.

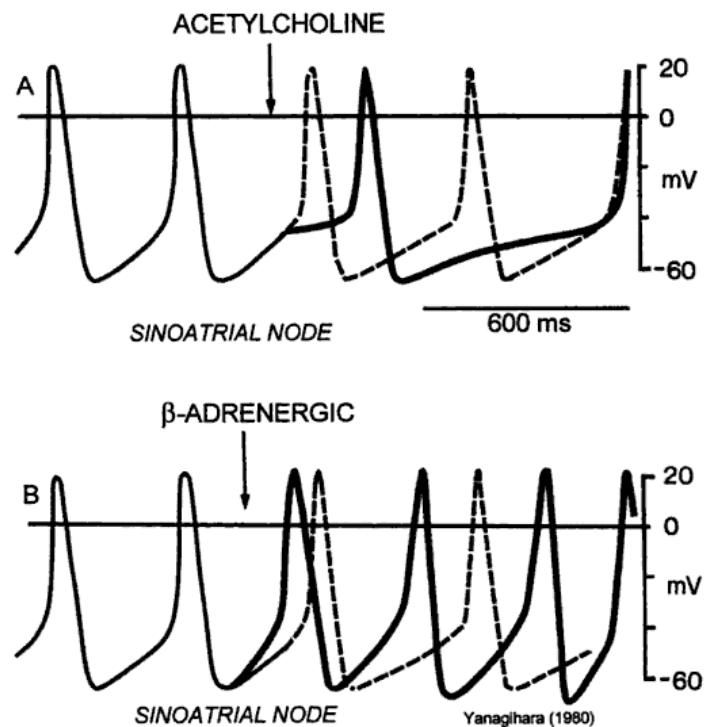
Le récepteur  $\beta$ 3-adrénergique, de découverte plus récente et nettement minoritaire, a des effets très différents. Sa stimulation entraîne un effet inotrope négatif. Sa stimulation active une protéine Gi/0 puis une NO Synthase de type endothélial dont l'activation est responsable d'une augmentation de production de GMPc par la Guanylate cyclase <sup>[189]</sup>. Ces récepteurs  $\beta$ 3 sont activés pour des concentrations plus élevées de catécholamines que les récepteurs  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2.

Ces effets divergeant entre  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 d'une part et  $\beta$ 3 d'autre part permettent une régulation de la fonction cardiaque. Ainsi les récepteurs  $\beta$ 3 peuvent jouer un rôle modérateur sur l'inotropisme lors d'une stimulation adrénergique intense.

#### **5.2.1.2.2 Effets sur l'activité électrique cardiaque**

C'est au niveau du nœud sinusal, où l'on trouve les cellules « pacemaker », que se crée l'impulsion électrique cardiaque. Ces cellules présentent des canaux ioniques spécifiques présentant la particularité d'entraîner une dépolarisation spontanée de la cellule. Cette dépolarisation se fait par la génération du courant calcique dépolarisant lent (ICaL) et du courant pacemaker (If). La stimulation  $\beta$ -adrénergique entraîne une phosphorylation de ces canaux et une accélération de la dépolarisation et donc de la fréquence du potentiel d'action aboutissant à l'accélération du rythme cardiaque <sup>[181, 190, 191]</sup> (figure 29). Cette accélération de la fréquence cardiaque est appelée effet chronotrope positif. Le courant If est considéré comme un élément déterminant de la génération de la dépolarisation, il est véhiculé par un canal activé par l'hyperpolarisation sensible aux nucléotides cycliques et non sélectif aux cations (HCN), c'est un courant sodique et potassique. La stimulation  $\beta$ -adrénergique entraîne une augmentation du courant If, principalement par l'intermédiaire des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques. Cette spécificité peut être expliquée par la colocalisation dans les cavéoles des récepteurs  $\beta$ 2 et des HCN, ces derniers étant

sensibles à l'AMPc ils sont donc très proche du récepteur  $\beta_2$  qui couplé à la protéine Gs va activer l'adénylate cyclase et produire de l'AMPc <sup>[192]</sup>.



**Figure 29 : Effet de l'acétyl-choline et de la stimulation beta-adrénergique sur le potentiel d'action du nœud sinusal et la fréquence cardiaque**

L'adjonction d'acétylcholine entraîne un ralentissement de la dépolarisation spontanée qui entraîne une diminution de la fréquence, l'adjonction de  $\beta$ -adrénergique entraîne une accélération de la dépolarisation spontanée ce qui augmente la fréquence. D'après <sup>[11]</sup> et <sup>[193]</sup>.

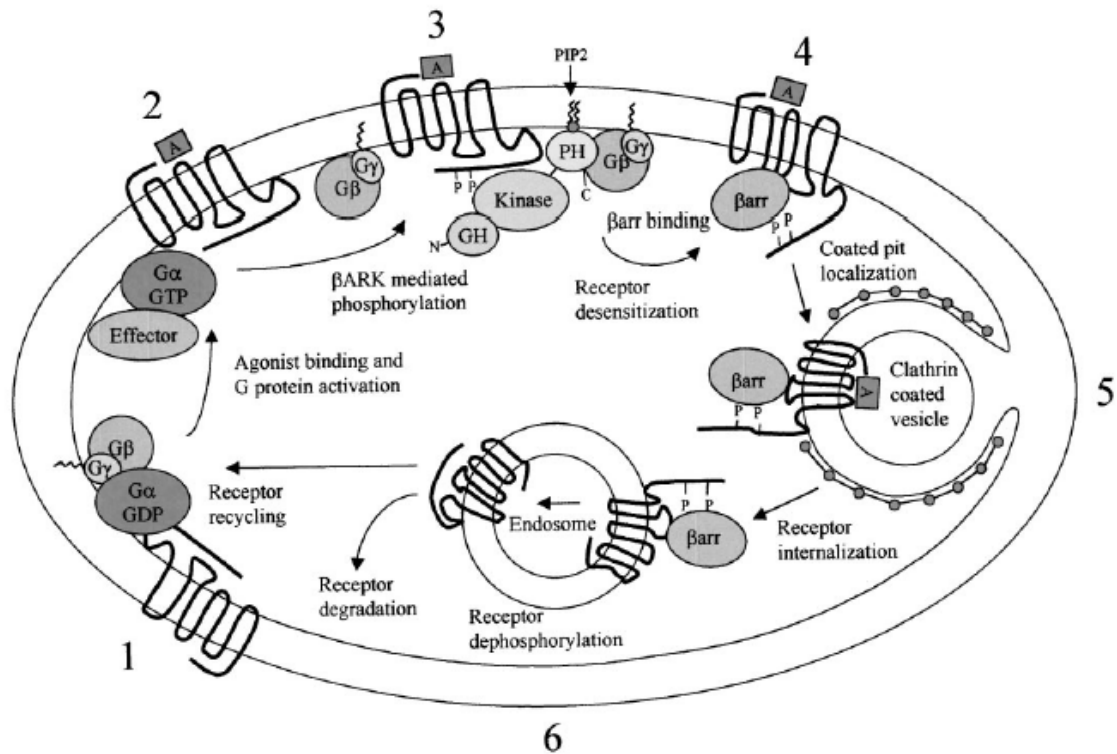
La stimulation  $\beta$ -adrénergique a un effet d'accélération de la conduction du potentiel d'action le long du tissu conducteur du myocarde matérialisé par le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His et les fibres de Purkinje. Ce réseau permet la propagation coordonnée de la dépolarisation dans l'ensemble du myocarde. La stimulation  $\beta_1$  entraîne cette accélération par la stimulation du canal calcique lent au niveau des cellules du nœud auriculo-ventriculaire <sup>[11]</sup>.

### 5.2.1.2.3 Régulation et internalisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont sujets à des mécanismes faisant varier leur activité ou leur nombre en fonction de l'intensité et de la durée de la stimulation qu'ils subissent. Cette particularité conduit à une régulation de la transmission du signal.

Une régulation à court terme prend place par l'intermédiaire d'un découplage du récepteur de la protéine G sous l'influence d'une phosphorylation par la Kinase des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ ARK) et par PKA qui agissent sur le récepteur lorsqu'il est couplé à son agoniste (figure 30). Il s'exerce ainsi un autocontrôle-négatif. La resensibilisation peut être obtenue par déphosphorylation du récepteur par une phosphatase. Cette régulation est donc utile lors de l'augmentation soudaine et brève de la stimulation adrénergique lors d'un effort physique intense par exemple.

Lors d'un excès prolongé de stimulation  $\beta$ -adrénergique survient un autre phénomène de désensibilisation de la cellule à la stimulation  $\beta$  appelé internalisation des récepteurs. Le récepteur  $\beta$  découplé de la protéine G va se lier à la  $\beta$ -arrestin qui va entraîner son internalisation par endocytose. Il va alors se former un endosome comprenant des récepteurs sur sa paroi. Les récepteurs peuvent par la suite soit être déphosphorylés et recyclés vers la membrane plasmique, soit dégradés par voie lysosomale (figure 30).



**Figure 30 : Mécanismes d'activation, de désensibilisation et d'internalisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques**

En 1) Récepteur inactif formant un complexe avec le trimère de sous-unités de protéine G. GDP est lié à  $G\alpha$ . 2) Après la fixation au ligand (A), la sous-unité  $G\alpha$  échange le GDP pour un GTP ce qui entraîne un changement de conformation de  $G\alpha$  et la dissociation du dimère  $G\beta\gamma$ .  $G\alpha$  libre peut se lier à la protéine effectrice telle que l'adénylate-cyclase.  $G\beta\gamma$  peut également avoir des actions effectrices indépendantes. 3)  $G\beta\gamma$  se fixe à la portion C-terminale de la kinase du récepteur  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ Ark) par l'intermédiaire du domaine d'homologie de la pleckstrin (PH) de cette molécule. Le domaine PH lie également des lipides membranaires (PIP2). Le domaine Ser/Thr kinase de  $\beta$ Ark phosphoryle le récepteur  $\beta$ -adrénergique. 4)  $\beta$ -arrestine ( $\beta$ arr) reconnaît les sites phosphorylés du récepteur et se lie à celui-ci ce qui bloque toute nouvelle activation de  $G\alpha$ . 5)  $\beta$ arr permet l'internalisation du récepteur dans des puits couverts de clathrine qui forment par endocytose des vésicules couvertes. 6) Le contenu des vésicules couvertes est transporté vers le compartiment endosomal où le récepteur est la cible de protéines phosphatases qui vont retirer le phosphate permettant la dissociation de  $\beta$ arr. L'agoniste est retiré et le récepteur est soit dégradé soit retourné vers la membrane pour réaliser un autre cycle. D'après <sup>[194]</sup>.

### 5.3 Régulation parasympathique

Le neurotransmetteur du système parasympathique est l'acétylcholine (ACh). Deux types de récepteurs à l'ACh sont retrouvés dans le SNA : les récepteurs nicotiques et les récepteurs muscariniques. Les récepteurs nicotiques ne sont présents que dans le système nerveux, on ne retrouve au niveau des organes cibles que des récepteurs muscariniques.

Les récepteurs muscariniques sont de cinq types (M1 – M5) et c'est classiquement le type M2 qui est considéré comme la forme cardiaque du récepteur. Or des données récentes évoquent la possibilité de l'expression des autres types dans le myocarde et de leur éventuelle implication dans la régulation de la fonction cardiaque en particulier en situation pathologique [183, 195-197]. Le récepteur de type M2 reste prédominant, il représente 75% des récepteurs muscariniques de la membrane plasmique [196] et il est indispensable à la régulation de la fréquence cardiaque [196, 198]. L'implication fonctionnelle des autres types de récepteurs muscariniques est encore mal connue.

L'action de la stimulation du récepteur M2 au niveau ventriculaire et atrial se fait par l'intermédiaire d'une protéine Gi/0 qui va inhiber l'action de l'adénylate cyclase et donc empêcher la production d'AMPc. Le récepteur M2 n'entraînera donc pas par cette voie de modification de la fréquence et de la contractilité *per se* mais plutôt une inhibition de l'accélération induite par la stimulation adrénergique [183]. Au niveau atrial il est décrit un effet direct de l'activation du récepteur M2, celui-ci va stimuler une protéine G qui va entraîner une ouverture d'un canal potassique générant le courant IK.ACh qui va hyperpolariser la cellule [199]. De plus le récepteur M2 a un effet inhibiteur sur le courant If même pour de faible concentration d'ACh [192, 200]. Cela va ralentir la fréquence cardiaque, raccourcir la durée du potentiel d'action, diminuer le courant calcique de type L et réduire la force de contraction [183]. Cette inhibition permanente du courant If pourrait expliquer l'effet tachycardisant des inhibiteurs muscariniques (tel que l'atropine) qui lèverait l'inhibition du courant If par le tonus vagal « basal » [192].

## **5.4 Différences entre effet adrénergique et effet fréquence**

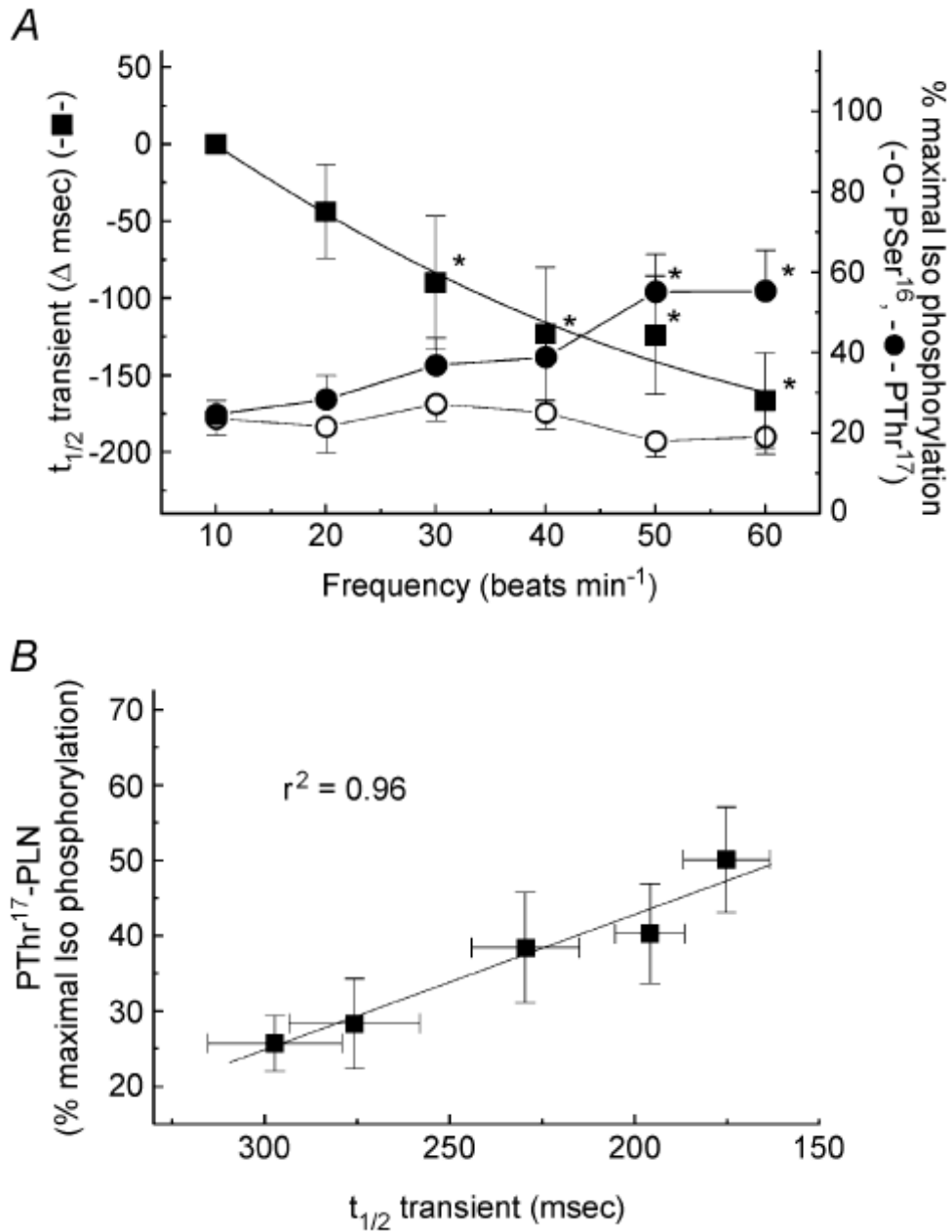
Les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la contractilité par la stimulation adrénergique sont difficile à totalement isoler de l'effet de la fréquence sur la contractilité puisque la stimulation adrénergique a également un effet tachycardisant.

Cependant quelques travaux se sont attaché a montrer la différence entre la stimulation par les voies métaboliques passant par la stimulation adrénergique et l'effet fréquence lui-même.

Kassiri a utilisé en 2000 des inhibiteurs de différentes kinases dont H-89 (uninhibiteur spécifique de PKA) retrouve toujours une FFR malgré l'inhibition de cette kinase impliquée dans la transmission du signal adrénergique <sup>[153]</sup>.

Sous l'action de la PKA le phospholamban est phosphorylé au niveau de sa Ser-16 tandis que sous l'action de CaMKII il est phosphorylé en Thr-17. Valverde a retrouvé sur des préparations de myocytes de chat que l'augmentation de fréquence de contraction sans stimulation adrénergique entraine une augmentation de phosphorylation de PLB en Thr-17 et pas en Ser-16 ainsi qu'une accélération de la relaxation (figure 31). Par-contre il ne retrouve pas cet effet sur des myocytes de rat. Enfin, il retrouve une augmentation de ces deux phosphorylations lors de la stimulation adrénergique par l'isoproterenol <sup>[133]</sup>.

Hagemann avait également retrouvé cette phosphorylation en Thr-17 du PLB lors de l'augmentation de fréquence comme illustré sur la figure 23 (partie Phospholamban et FDAR) <sup>[149]</sup>.



**Figure 31 : Relation entre relaxation et phosphorylation en Ser16 et Thr17 de phospholamban**

(A), préparations de cardiomyocytes de chat stimulés pendant 3 min a des frequences croissants. Les temps de demi-relaxation ( $t_{1/2}$ ) des transitoires calciques sont associés a une augmentation de la phosphorylation en Thr17 de PLB indépendante de la phosphorylation de Ser16. (B), Corrélation entre la phosphorylation en Thr17 de PLB et  $t_{1/2}$ .  $t_{1/2}$  est exprimé en variation par rapport à celui mesuré à 10 battement/min. D'après <sup>[133]</sup>.

## **6 DĒFAILLANCE MYOCARDIQUE SEPTIQUE**

On peut considérer le cœur comme une pompe faisant circuler le sang du réseau veineux vers le réseau artériel. Sa performance est liée à la pré-charge, la post-charge, la fréquence cardiaque et la contractilité. La pré-charge, le volume de fin de diastole entraîne un certain degré d'étirement des fibres myocardiques et donc des sarcomères. La post-charge correspond aux forces s'opposant à l'éjection ventriculaire et va être à l'origine de la tension pariétale qui dépend du volume de la chambre ventriculaire et de l'épaisseur pariétale. La contractilité myocardique qui dépend de l'interaction du calcium avec les protéines de l'appareil contractile, n'est pas évaluable in-vivo de manière totalement indépendante de la pré-charge et de la post-charge. Cette contractilité peut par-contre être évaluée expérimentalement de manière indépendante. Le choc septique est caractérisé par une baisse des résistances vasculaires systémiques par vasodilatation périphérique qui entraîne ainsi une hypovolémie relative. On observe également une tachycardie habituellement attribuée à une adaptation réflexe à l'hypovolémie et à une augmentation du tonus adrénergique. Enfin chez certains patients a été décrit une altération de la performance contractile myocardique.

### **6.1 Caractérisation de la dysfonction myocardique septique**

Les modifications de la performance myocardique participent à la défaillance cardiovasculaire du choc septique mais leur nature et leur importance reste encore sujette à discussion. La description classique du choc septique décrit deux phases d'évolution hémodynamique, d'abord une phase dite « hyperkinétique » définie par une tachycardie, une diminution des résistances vasculaires périphériques et une augmentation du débit cardiaque, puis une phase « hypokinétique » caractérisée par l'apparition d'une majoration de l'hypotension et d'une diminution du débit cardiaque



[201, 202]. Cette approche séquentielle est actuellement remise en cause. En effet, les patients ne survivant pas au choc septique conservent habituellement un profil hyperkinétique jusqu'à leur décès. De plus, l'association du choc hyperkinétique avec la conservation de la fonction contractile myocardique est discutée en raison de travaux faisant état d'une diminution du travail ventriculaire gauche chez des patients présentant un tableau hyperkinétique [203, 204].

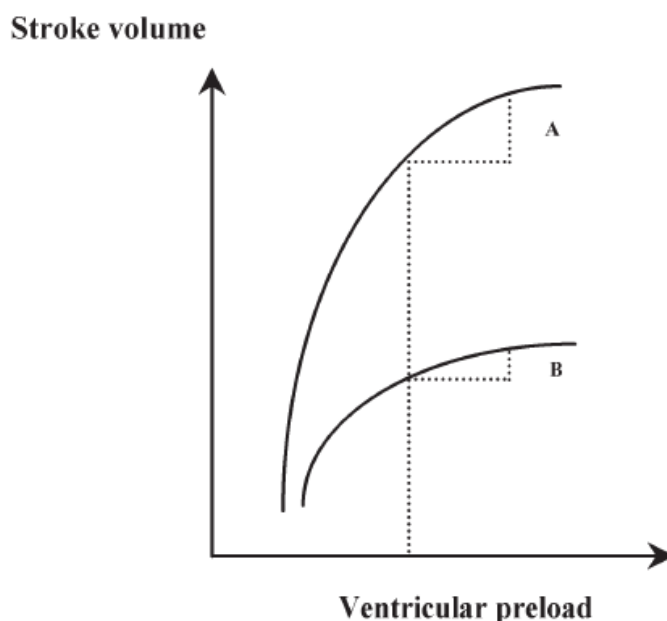
L'altération de la fonction myocardique est présente chez 50-60% des patients présentant un choc septique, chez un tiers des patients elle n'apparaît qu'après 24 ou 48h après le début de l'état de choc [205, 206]. Différentes techniques ont été utilisées en pratique clinique pour identifier les patients présentant cette défaillance myocardique.

### **6.1.1 Mesure du débit cardiaque et de la pression veineuse centrale**

Des travaux des années 1960 caractérisaient la dysfonction myocardique comme la présence d'un débit cardiaque diminué avec une pression veineuse centrale (PVC) normale. La PVC était utilisée comme reflet indirect du volume télédiastolique ventriculaire gauche et donc de la précharge. Chez les patients septiques, la diminution du débit cardiaque était considérée comme la phase tardive et hypokinétique du choc septique [201]. Un débit cardiaque élevé caractérisait la phase hyperkinétique du choc septique et était habituellement considérée comme de bon pronostic [201, 207]. Dans ces travaux cliniques, la diminution du débit cardiaque était assimilée à une altération de la fonction contractile myocardique. Or, la PVC est un mauvais reflet de la précharge ventriculaire gauche. Ceci a d'ailleurs été confirmé au cours du choc septique par Packman et al. où la pression veineuse centrale (PVC) est différente de la précharge ventriculaire gauche et prédit pas le volume télédiastolique du ventricule gauche [208]. Dans ces travaux, la PVC sous-estimait la précharge ventriculaire gauche et la diminution constatée du débit cardiaque n'était en réalité que le reflet d'une hypovolémie insuffisamment compensée. Ainsi, ces résultats sont incapables d'évaluer les modifications de la fonction contractile ventriculaire au cours du choc septique.

### 6.1.2 Apports du cathétérisme artériel pulmonaire

Avec le développement du cathétérisme artériel pulmonaire, il a été possible d'évaluer de façon plus précise les conditions de précharge ventriculaire, notamment par la mesure de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion. La pression artérielle pulmonaire d'occlusion semble être un bon reflet de la précharge ventriculaire gauche <sup>[208]</sup>. Cela a permis d'évaluer les modifications de performance systolique ventriculaire gauche grâce à l'utilisation de la relation « pression artérielle pulmonaire d'occlusion - volume d'éjection systolique ». La construction de cette relation permet d'approcher la relation « précharge ventriculaire gauche – performance systolique ». Ces relations permettent de définir les principes de précharge dépendance (lorsqu'une faible augmentation de précharge entraîne une importante augmentation du volume d'éjection) ou de précharge indépendance (lorsque l'augmentation de précharge n'entraîne qu'une faible augmentation du volume d'éjection) (figure 32).



**Figure 32 : Relation de Frank-Starling et précharge dépendance**

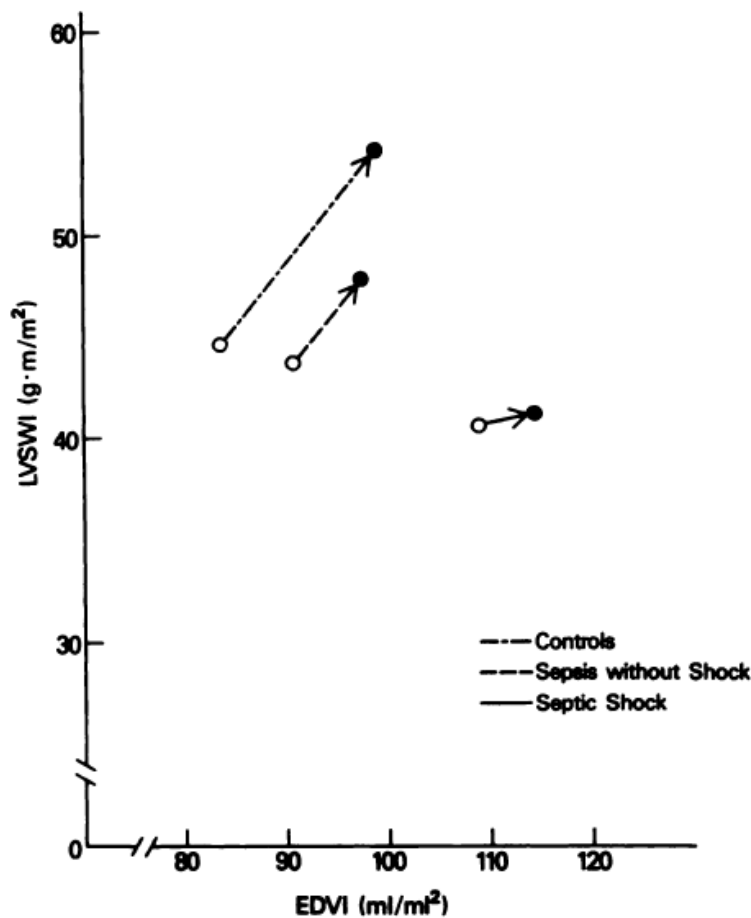
Représentation schématique de la relation des relations de Frank-Starling entre la précharge ventriculaire (*Ventricular preload*, en abscisse) et le volume d'éjection (*Stroke volume*, en ordonnée) pour un cœur normal (A) et un cœur défaillant (B). Une même valeur de précharge peut correspondre à une précharge-dépendance pour un cœur normal ou une précharge-indépendance pour un cœur défaillant. D'après <sup>[209]</sup>.

### 6.1.3 Application des techniques de scintigraphie ventriculaire

L'utilisation de techniques de scintigraphie, d'angiographie et de ventriculographie a permis de différencier les anomalies de compliance ventriculaire et de contractilité myocardique. Ces techniques permettent en effet d'apprécier de façon séparée les différentes composantes intervenant dans la fonction contractile myocardique. En 1984, Parker a montré que les patients survivants au choc septique présentaient une diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) et une dilatation ventriculaire gauche évaluée par l'index de volume télé-diastolique du ventricule gauche <sup>[205]</sup>. Des mesures répétées au cours du temps chez les mêmes patients montraient que ces modifications hémodynamiques persistent 7 à 10 jours. Chez les patients septiques non survivants, aucune modification de la fraction d'éjection du ventricule gauche et du volume ventriculaire gauche n'était retrouvée. Cependant, dans ce travail, la fraction d'éjection ventriculaire était utilisée comme reflet de la contractilité ventriculaire qui est pourtant un paramètre particulièrement dépendant des conditions de précharge et de postcharge ventriculaire. De même, la technique de scintigraphie ventriculaire au technétium, utilisé dans ce travail, surestime de façon systématique le calcul du volume ventriculaire gauche <sup>[210]</sup>.

Par la suite, les limitations méthodologiques du travail initial de Parker et al., ont été partiellement évitées par cette équipe. En 1988, Ognibene a utilisé une approche dynamique afin de s'affranchir de la dépendance des paramètres de charge pour évaluer la contractilité ventriculaire <sup>[211]</sup>. Il a effectué un calcul du travail ventriculaire gauche et effectué simultanément une scintigraphie au Technétium pour évaluer la fraction d'éjection et le volume télédiastolique ventriculaire gauche. Les mesures ont été répétées au cours d'une épreuve de remplissage vasculaire permettant de construire la relation entre le travail ventriculaire gauche et le volume télédiastolique du ventricule gauche (figure 33). En utilisant cette construction, on pouvait ainsi observer des relations différentes entre les patients en choc septique, les patients septiques sans choc, et les patients contrôles. Les différentes relations « travail ventriculaire gauche - volume télédiastolique du ventricule gauche » traduisaient pour Ognibene et al. des différences de contractilité myocardique indépendantes des conditions de charge ventriculaire. Les résultats obtenus retrouvaient une diminution

de la réponse au remplissage dans les groupes septiques sans choc et en choc septique et une diminution de la contractilité dans le groupe en choc septique.



**Figure 33 : Relation de Frank-Starling pour les patients septiques avec ou sans choc**

Les relations de Frank-Starling sont tracées avant et après une épreuve de remplissage pour trois groupes de patients (contrôles, septiques sans choc et choc septique). L'index de surface diastolique du ventricule gauche (EDVI) est exprimé en ml/m<sup>2</sup> (abscisse) et l'index de travail systolique du ventricule gauche (LVSWI) est exprimé en g·m/m<sup>2</sup> (ordonnée). Les points représentent les moyennes de chaque groupe. D'après [211].

#### 6.1.4 Intérêt de l'échocardiographie

La même année que les travaux scintigraphiques de Parker [205], l'équipe de Jardin retrouve également une dysfonction myocardique lors du choc septique mais en utilisant une technique non invasive d'échocardiographie au lit du malade [212]. Depuis une vingtaine d'années, le développement des techniques échocardiographiques, et en particulier de l'échocardiographie trans-oesophagienne,

a donné un nouvel élan à l'évaluation de la fonction cardiaque au lit du malade. Elle a comme avantage d'être peu ou pas invasive (si elle est effectuée par voie trans-thoracique). L'échocardiographie permet d'obtenir des données sur la contractilité, la relaxation, la compliance, les conditions de précharge et de postcharge ventriculaire et l'interdépendance des ventricules droit et gauche. L'échocardiographie présente un intérêt tout particulier dans l'évaluation de la fonction diastolique qui était très mal évaluée par les techniques disponibles précédemment.

En 1999, Jardin et al <sup>[213]</sup>, utilisant une approche échocardiographique, retrouve une diminution de fraction d'éjection ventriculaire gauche plus marquée chez les patients survivants comme Parker l'avait constaté antérieurement. Ce travail retrouve également une augmentation du volume ventriculaire gauche chez les patients survivants. Cependant la dilatation ventriculaire constatée est beaucoup moins importante que celle retrouvée par l'équipe de Parker.

Cette approche échocardiographique a permis par ailleurs de mieux caractériser les modifications de la fonction diastolique chez les patients septiques. Ainsi, Poeleart et al <sup>[8]</sup> a montré un ralentissement du remplissage ventriculaire gauche et un trouble de la relaxation ventriculaire chez les patients septiques. Jardin et al a montré une persistance d'un défaut de précharge ventriculaire gauche dans le choc septique malgré un remplissage préalable et une fonction ventriculaire droite « optimisée » <sup>[213]</sup>.

L'équipe de Jardin a particulièrement travaillé sur l'utilisation de l'échocardiographie dans l'évaluation hémodynamique dans les états de choc et en particulier dans le choc septique <sup>[214]</sup>. Ils ont insisté sur les possibilités apportées par l'échocardiographie pour diagnostiquer la défaillance ventriculaire gauche mais également la défaillance cardiaque droite qui est également retrouvée dans le choc septique <sup>[215-217]</sup>. Elle peut être liée à une dépression intrinsèque mais également retrouvée dans un contexte de cœur pulmonaire aigu caractérisé par une augmentation importante de la post-charge ventriculaire droite <sup>[218, 219]</sup>.

### **6.1.5 Marqueur biologique de la dysfonction myocardique septique**

Parallèlement à la caractérisation des modifications de contractilité ventriculaire au cours du sepsis, une recherche sur la détection d'un marqueur biologique témoignant de l'intensité de la dysfonction myocardique a été menée.

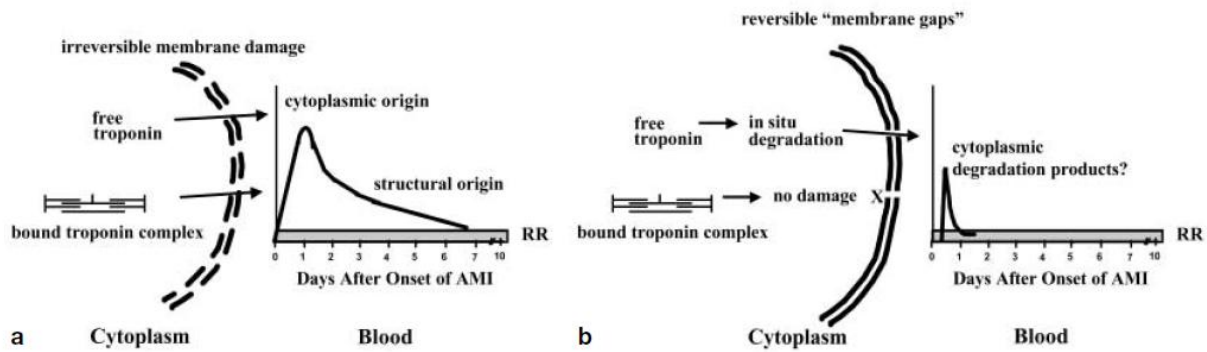
Dans le domaine de la pathologie ischémique myocardique, les années 1990 ont vu le développement de nouveaux marqueurs de souffrance tissulaire myocardique, les troponines I et T cardiaques circulantes. La détection des troponines I et T cardiaques sériques a une bonne sensibilité et spécificité de souffrance myocardique lors de l'infarctus du myocarde <sup>[220]</sup>. Au cours du sepsis, il a été également retrouvé une association entre des taux élevés de troponine I et T et l'importance de la défaillance cardiaque.

Par exemple, Fernandes et al. a montré une relation statistiquement significative entre la baisse de la fraction d'éjection ventriculaire gauche, évaluée par échocardiographie, et l'augmentation de troponine I sérique chez les patients en choc septique <sup>[221]</sup>. De même, Turner et al a montré la même relation entre les taux élevés de troponine I cardiaque circulante et les besoins en drogues vasoactives <sup>[222]</sup>. Ces deux études présentent malheureusement de faibles effectifs (11 et 15 patients respectivement) et ne permettent pas de généraliser ces données à la population de patients présentant un choc septique.

En 2000, une étude réalisée par Thiru chez 101 enfants atteints de choc septique secondaire au méningocoque retrouvait une corrélation entre les taux élevés de troponine I cardiaque circulante, la gravité des patients, leurs besoins en catécholamines et la diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche <sup>[223]</sup>. Bien que présentant un effectif important, cette étude est réalisée sur une population d'enfants méningococcémiques où les phénomènes de myocardites et de dissémination de micro-embols par voie systémique sont fréquents. Ces deux phénomènes peuvent, indépendamment du sepsis, participer à l'élévation de la troponine I cardiaque circulante par des lésions myocardiques directes <sup>[224-226]</sup>.

Il est à noter que d'autres travaux ont retrouvé, comme pour la troponine I, une augmentation de la troponine T cardiaque circulante chez des patients présentant une défaillance cardiaque septique <sup>[227, 228]</sup>.

La signification de l'augmentation des troponines circulantes au cours du sepsis n'est pas univoque. La présence de troponine cardiaque circulante est habituellement considérée comme un marqueur de lésion cellulaire myocardique irréversible<sup>[220]</sup>. Or la présence d'une ischémie myocardique au cours du choc septique n'est pas certaine en effet des travaux ont montré que la perfusion coronaire n'est pas diminuée mais plutôt augmentée dans ce contexte <sup>[229, 230]</sup>. Cependant, il est constaté une anomalie d'extraction des substrats énergétiques par hypoxie myocardique chez 15% des patients <sup>[229]</sup>. D'autre part, Fernandes a montré des anomalies histologiques myocardiques sur des séries d'autopsies chez patients décédés de choc septique <sup>[231]</sup>. Ces anomalies suggèrent la possibilité d'une ischémie myocardique dans ce contexte. Une autre éventualité est celle proposée par Wu qui évoque la possibilité que l'augmentation des troponines circulantes au cours du sepsis soit plutôt liée à la libération d'un stock de troponine cytoplasmique qu'à une nécrose cellulaire irréversible <sup>[232]</sup>. Des études cliniques au cours de l'angor instable et expérimentales d'ischémie myocardique brève et réversible ont montré une augmentation transitoire (quelques heures) des troponines <sup>[233, 234]</sup>. Ces études suggèrent un mécanisme d'augmentation de troponine circulante différent de la nécrose myocardique où l'on observe habituellement une augmentation prolongée (plusieurs jours) des troponines <sup>[235]</sup>. Wu propose ainsi une hypothèse selon laquelle les cardiomyocytes soumis à une « agression réversible » pourraient transitoirement « laisser échapper » la troponine libre intra-cytoplasmique sans libération de la troponine intégrée à l'appareil contractile cardiomyocytaire (figure 34).



**Figure 34 : Hypothèse d'une lésion myocardique réversible selon Wu.**

a. Libération de troponines du myocyte vers la circulation lors de lésions irréversibles. Les altérations de la membrane cellulaire entraînent une libération initiale de la troponine cytoplasmique suivi par un relargage progressif de la troponine liée aux complexes de myofibrilles. b. Hypothèse pour la libération de troponines lors de l'ischémie réversible. Le déficit en oxygène pourrait être à l'origine d'une dégradation de la troponine libre en fragments de plus faible poids moléculaire. Les médiateurs induisant la dysfonction myocardique pourrait être à l'origine d'une augmentation de la perméabilité membranaire permettant une fuite de la troponine dégradée sans nécrose cellulaire. AMI : Ischémie aiguë myocardique. D'après <sup>[232]</sup>.

On retrouve une grande variabilité des valeurs seuils retrouvées dans les différentes études pour diagnostiquer la défaillance myocardique au cours du choc septique, l'application de ce paramètre est donc d'application difficile à l'heure actuelle, mais il semble néanmoins utilisable pour ses valeurs les plus élevées <sup>[236]</sup> (tableau 2).

Authors	Year	Troponins	Cut-off (µg/l)	Range (µg/l)
Spies <i>et al.</i> [5]	1998	cTnT	0.2	0.04-3.3
Fernandes <i>et al.</i> [34]	1999	cTnl	0.6	
Turner <i>et al.</i> [39]	1999	cTnl	0.4	2.4 (median)
Arlati <i>et al.</i> [32]	2000	cTnl	0.5	0.5-11.2
Ver Elst <i>et al.</i> [37]	2000	cTnl	0.4	0.8-6.8
		cTnT	0.1	0.2-1.5
Ammann <i>et al.</i> [31]	2001	cTnl	0.1	0.2-15.4
Ammann <i>et al.</i> [19]	2003	cTnl	0.1	
		cTnT	0.1	
Mehta <i>et al.</i> [36]	2004	cTnl	1.0	1-10.8

cTn, cardiac troponin.

**Tableau 2 : Publications sur l'augmentation de troponine dans la dysfonction myocardique septique**

Résumé des principales études avec le type de troponine recherché, la valeur seuil et la fourchette de résultat retrouvé. La diversité des techniques de mesure rend la comparaison des valeurs difficile. D'après <sup>[236]</sup>.



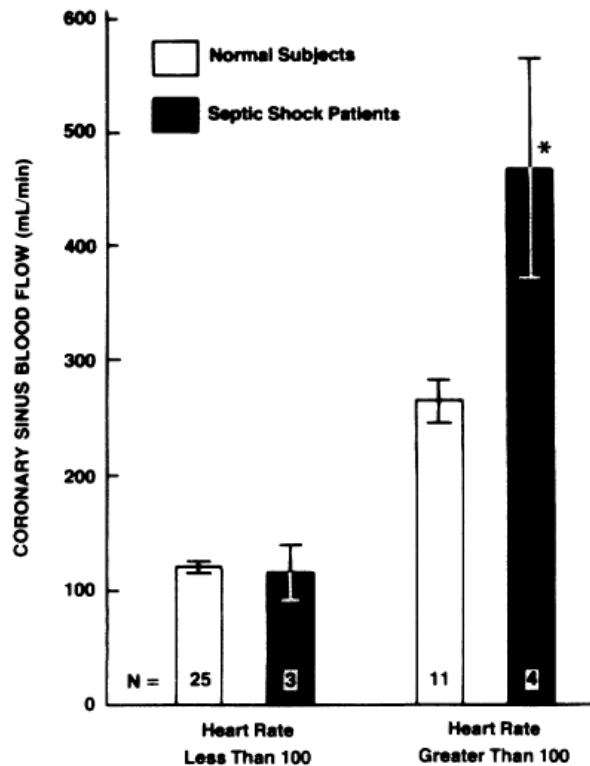
Ainsi, troponines I et T cardiaques circulantes pourraient donc être considérées comme des marqueurs biologiques de la dysfonction myocardique septique, mais il n'existe pour le moment pas de relation claire entre le taux de ces marqueurs et l'importance de la dysfonction myocardique <sup>[236, 237]</sup>.

## **6.2 Phénomènes induisant la défaillance myocardique septique**

### **6.2.1 La théorie ischémique**

L'hypothèse retenue lors des premières descriptions de la défaillance myocardique septique dans les années 1960 était celle d'une diminution globale de la perfusion myocardique entraînant des lésions ischémiques et la défaillance myocardique. Or des études ont montré que le débit coronaire est maintenu au cours du choc septique <sup>[229, 230]</sup>(ref). Elles ont non seulement constaté un débit coronaire normal ou élevé mais il n'était pas non plus retrouvé d'augmentation de production de lactate, un marqueur du métabolisme anaérobie induit par l'hypoxie cellulaire <sup>[229, 230]</sup> (figure 35).

Cependant il existe chez certains patients des signes évoquant un certain degré d'ischémie myocardique mais elle n'est pas indispensable à l'apparition de la défaillance myocardique. En effet dans la publication de Dhainaut mentionnée ci-dessus, 6 des 40 patients en choc septique étudiés présentaient une hypoxie myocardique avec une augmentation du lactate dans le sinus veineux coronaire, une très faible augmentation voire une diminution des débits coronaires et de la consommation en oxygène du myocarde à l'inverse de ce qui était observé chez les autres patients <sup>[229]</sup>. De plus Fernandes a constaté des modifications histologiques myocardiques chez des patients décédés de choc septique. Il a retrouvé des lésions compatibles avec une ischémie myocardique à type de myocardite interstitielle (27%), d'œdème interstitiel (28%) et de nécrose de fibres musculaires (7%).



**Figure 35 : Débit coronaire chez les patients septique**

Le débit coronaire est mesuré chez les patients contrôles et en choc septique ; On remarque qu'il est inchangé chez les patients présentant une fréquence cardiaque inférieure à 100. Pour les patients tachycardes (fréquence supérieure à 100) le débit coronaire est augmenté chez les patients septiques. D'après <sup>[230]</sup>.

Dans les modèles expérimentaux de choc septique il n'est habituellement pas retrouvé d'ischémie myocardique <sup>[238]</sup>. De même, la conservation du métabolisme de l'oxygène et des molécules à liaisons phosphates riches en énergie du myocarde au cours du choc septique expérimental est incompatible avec la présence d'une ischémie myocardique <sup>[239]</sup>. Cependant, malgré l'absence de diminution du débit régional coronaire au cours du sepsis constaté dans ces travaux, il existe des arguments compatibles avec des phénomènes ischémiques localisés <sup>[240, 241]</sup>.

Les vaisseaux coronaires jouent un rôle majeur dans l'apport en oxygène et nutriments au myocarde. Afin de maintenir une perfusion adéquate, le diamètre de ces vaisseaux s'ajuste en réponse à différents facteurs (pression partielle en oxygène, demande énergétique du myocarde) : c'est l'autorégulation coronarienne. Il a été constaté dans un modèle canin de choc endotoxinique des anomalies de

distribution du flux coronaire <sup>[242]</sup>. Lors du choc septique, du NO (anciennement appelé l'« *endothelium-derived relaxing factor* » EDRF) est synthétisé en grande quantité au niveau endothélial. Celui-ci diffuse vers les cellules musculaires lisses et active la guanylate cyclase en se fixant au groupement prosthétique hémique de celle-ci. L'augmentation consécutive du taux de GMPc induit un relâchement des cellules musculaires lisses et donc une vasodilatation. Une production excessive de NO diminue l'autorégulation myogénique coronarienne <sup>[240, 243, 244]</sup>. En effet, l'équipe d'Avontuur <sup>[240]</sup> rapporte que l'inhibition de la voie L-arginine/NO/GMPc prévient la dysfonction de l'autorégulation coronarienne induite par l'injection d'endotoxine chez le rat. Dans le choc septique, la circulation coronarienne est ainsi souvent caractérisée par un flux sanguin inapproprié à la demande énergétique du myocarde. Ceci pourrait participer à la dysfonction cardiaque septique.

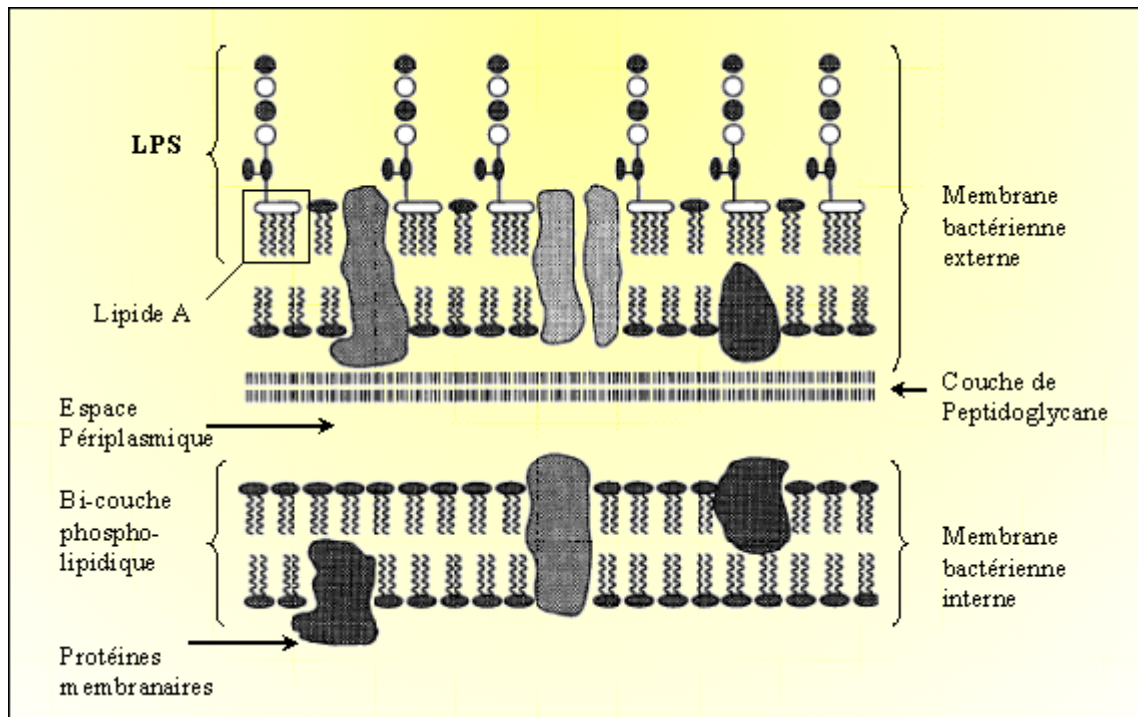
La dysfonction myocardique septique n'est pas la conséquence exclusive d'une ischémie myocardique bien que ce phénomène, favorisé par les troubles microcirculatoires du choc septique, puisse coexister et probablement aggraver la fonction cardiaque.

### **6.2.2 L'endotoxine bactérienne**

Les infections à l'origine du choc septique sont principalement causées par des bactéries. Les infections fongiques, virales et parasitaires ne représentent qu'une dizaine de pourcent des choc septiques <sup>[3, 245]</sup>. De nombreux composants bactériens sont connus pour leur pouvoir immunogène. Il s'agit par exemple des peptidoglycanes, des porines, des lipopeptides, des lipoprotéines, des pili, de la flagelline, de l'ADN riche en motifs cytosine-phosphate-guanine (CpG) non méthylées, ou des toxines bactériennes (endo ou exotoxines)<sup>[246]</sup>. Un des composés bactériens le plus étudié et le plus immunogène est l'endotoxine des bactéries à Gram négatif.

L'endotoxine est un lipopolysaccharide (LPS) présent au niveau de la paroi des bactéries Gram négatif. C'est un des éléments composant la membrane externe de la bactérie, il est composé d'un polysaccharide et d'un lipide A, site actif de

l'endotoxine, qui est ancré dans la face externe de la bicouche lipidique de la membrane bactérienne externe (figure 36).



**Figure 36 : Structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives.**

La partie lipide A du lipopolysaccharide (LPS) est ancrée dans la membrane externe de la bactérie tandis que la chaîne de polysaccharides est orientée directement vers l'extérieur. D'après <sup>[247]</sup>.

Le lipopolysaccharide, en plus de son effet propre direct, a de multiples effets indirects parmi lesquels : la libération de cytokines pro-inflammatoires tel que  $TNF-\alpha$  et  $IL-1\beta$ , la production d'espèces réactives de l'oxygène, de monoxyde d'azote et de peroxy-nitrite qui semblent avoir un rôle dans l'apparition des altérations cardiovasculaires du sepsis.

Le LPS est libéré de la paroi externe des bactéries Gram-négatives lors de leur multiplication ou lorsqu'elles sont endommagées par le complément ou des antibiotiques <sup>[246, 247]</sup>. Il se lie à une protéine plasmatique, la LBP (*LPS Binding Protein*), glycoprotéine synthétisée par le foie à la phase aiguë de l'inflammation. Le rôle de la LBP est de faciliter le transfert du LPS vers le CD14. Le CD14 est une glycoprotéine présente à la surface des cellules de la lignée myélo-monocytaire, mais qui existe également sous forme soluble, ce qui permet aux cellules qui ne l'expriment pas constitutivement à leur surface (cellules endothéliales...) d'être

stimulées par le LPS. Toutefois, *in vitro*, le LPS n'est capable d'activer les cellules endothéliales qu'à très fortes doses et donc sans pertinence physiologique. Le CD14 fait partie de la famille des protéines à ancre GPI (*Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein*). Comme toutes les protéines de cette famille, le CD14 est une protéine de la membrane externe qui ne possède pas de queue cytoplasmique. Le CD14 a également été impliqué dans les voies de signalisation d'autres composants d'agents pathogènes <sup>[246]</sup>.

Après avoir fixé le complexe LPS-LBP, le CD14 doit interagir avec un autre récepteur membranaire pour activer la voie de signalisation intracellulaire : le récepteur de type Toll 4 (TLR4) <sup>[248-250]</sup>. Après interaction avec le complexe LPS-LBP-CD14, la partie intracytoplasmique du récepteur Toll 4 va recruter la protéine MyD88 qui se distingue par un domaine TIR (*Toll/IL1R homology domain*) carboxy-terminal et un domaine DD (*Death Domain*) amino-terminal, par l'intermédiaire duquel elle se lie en aval à une sérine/thréonine kinase appelée IRAK-1 (*IL1R Associated Kinase-1*). Après stimulation, IRAK-1 est phosphorylée, se décroche de MyD88 et se lie à TRAF 6 (*TNF Receptor Associated Factor*) dans le cytoplasme qui active NIK (*NF-κB-Inducing Kinase*), protéine de la famille des MAP3K (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*). C'est le complexe NIK-IKK $\alpha$ -IKK $\beta$  qui entraîne la phosphorylation de l'inhibiteur I- $\kappa$ B et la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B. Le facteur nucléaire se lie alors sur les promoteurs des gènes des protéines de la réaction inflammatoire et induit la transcription de ceux-ci (figure 37).

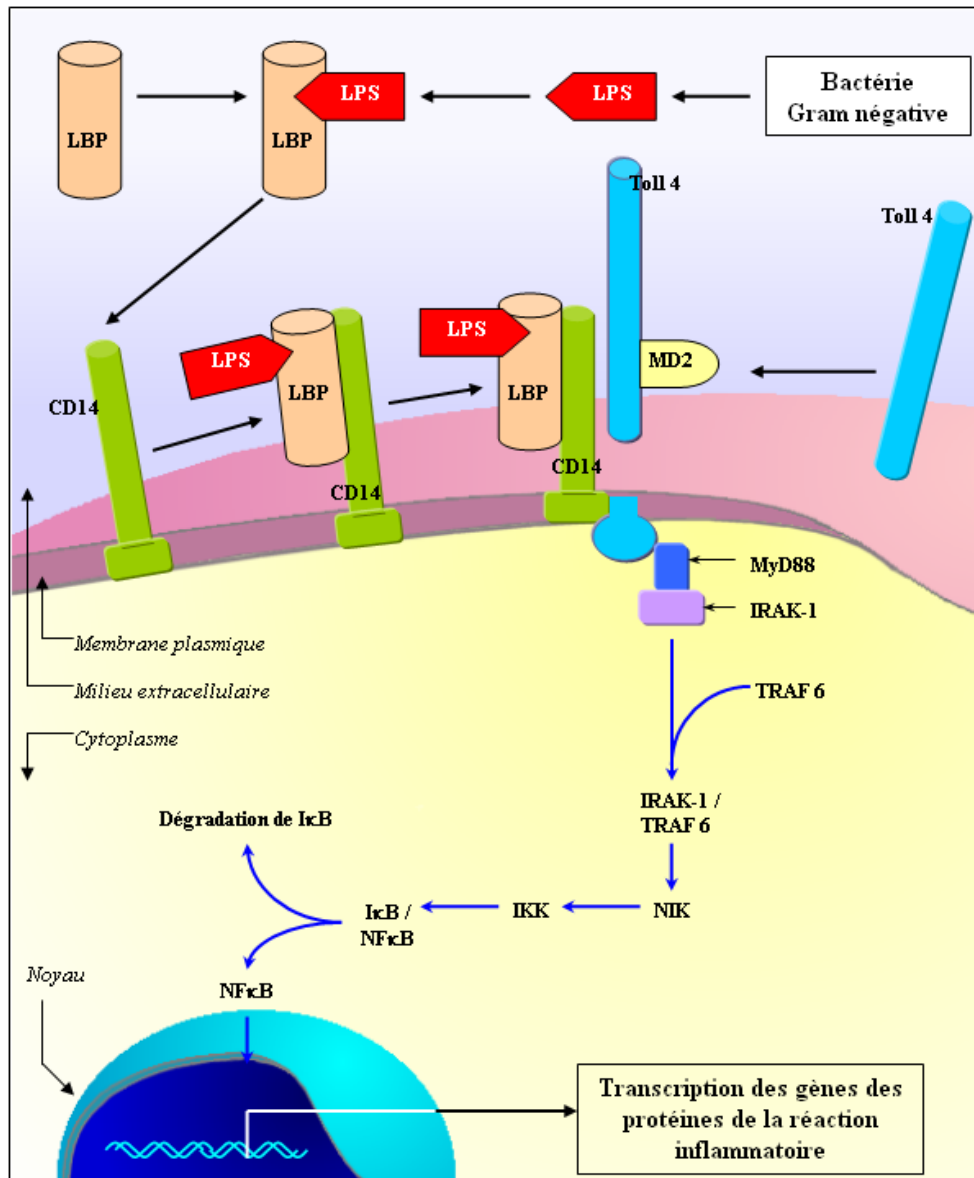
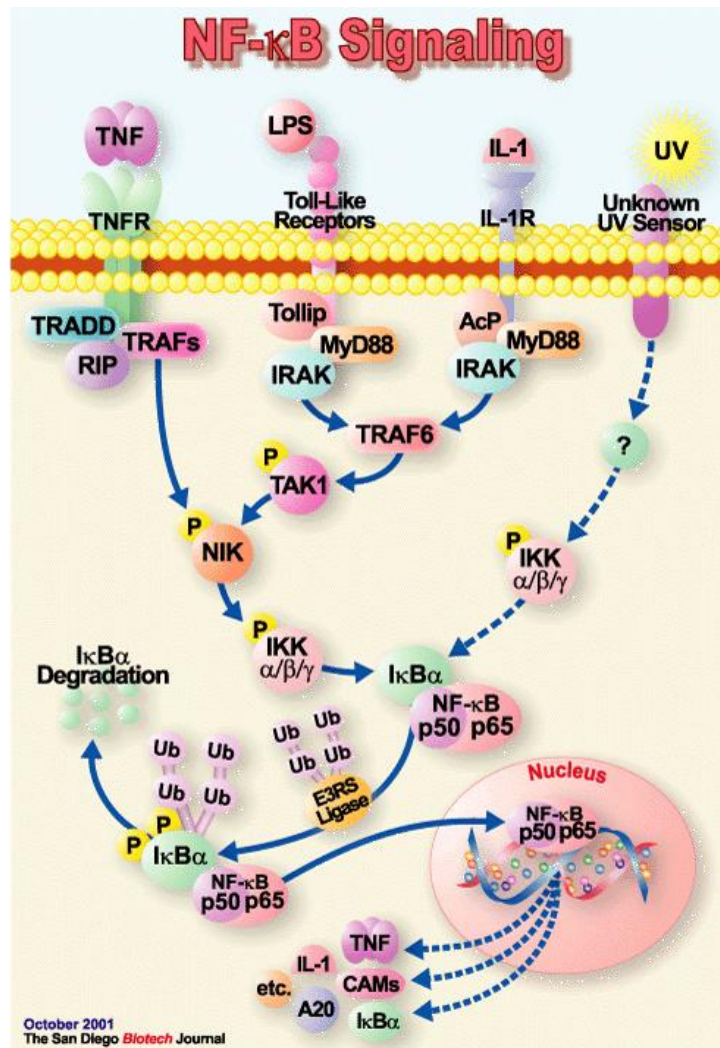


Figure 37 : Transduction intracellulaire du signal induit par le lipopolysaccharide.

Le lipopolysaccharide (LPS) lié à la LBP (*LPS Binding Protein*) se fixe au CD14. L'adaptation du récepteur Toll 4 permet la transduction intracellulaire du signal aboutissant à l'activation du NF-κB.

Chez les mammifères, NF-κB (*Nuclear Factor of immunoglobulin κ light-chain in B cells*) est un facteur transcriptionnel ubiquitaire capable de se fixer sur une séquence d'une dizaine de nucléotides, située au niveau des régions promotrices des gènes codant pour les protéines pro-inflammatoires. NF-κB est un complexe homo- ou hétéro-dimérique composé d'unités appartenant à la famille des protéines Rel, les protéines p50 et p65 <sup>[251]</sup>. Le dimère NF-κB est produit de façon constitutive, mais reste séquestré dans le cytoplasme sous une forme inactive par une liaison non

covalente avec des I- $\kappa$ Bs (inhibiteurs du NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B peut être activé dans les cellules sous l'effet de stimuli variés tels que le LPS, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , des mitogènes, des protéines virales, des endotoxines bactériennes, des radicaux libres, des radiations ionisantes, des rayonnements ultraviolets et certains agents chimiques. Certains stimuli empruntent une voie de signalisation à partir de récepteurs spécifiques, tels que les récepteurs du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  ou des TLR et entraîne une phosphorylation quasi immédiate de I- $\kappa$ B, suivie d'une dégradation complète dans le cytoplasme en moins de 10 minutes. Cette phosphorylation induit un signal pour une poly-ubiquitination précédant la dégradation de I- $\kappa$ B par la voie du protéasome 26S. Ainsi libéré de son inhibiteur naturel, le dimère NF- $\kappa$ B expose sa séquence du signal d'adressage intranucléaire NLS (*Nuclear Localisation Sequence*) lui permettant d'être transféré vers le noyau, où il se fixe sur les séquences  $\kappa$ B du promoteur des gènes cibles pour activer leur transcription. Les promoteurs du facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B sont retrouvés au niveau de nombreuses séquences, codant pour des protéines impliquées dans la cascade immuno-inflammatoire : NO-synthase, des molécules d'adhérence membranaires (VCAM-1, ICAM-1...), des facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF...), des protéines inflammatoires de la phase aiguë (Angiotensinogène, fraction C3 et facteur B du complément...) et de nombreuses cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, INF- $\beta$ ) (figure 38). NF- $\kappa$ B semble ainsi largement impliqué dans la physiopathologie du choc septique. L'implication de la voie du NF- $\kappa$ B dans la défaillance myocardique endotoxinique a été prouvée lors de travaux retrouvant une diminution de la dysfonction myocardique induite par l'endotoxine dans les cardiomyocytes présentant une surexpression de I- $\kappa$ B inhibiteur naturel du NF- $\kappa$ B [252, 253]. L'activité NF- $\kappa$ B est corrélée au score APACHE II pour *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (score de risque de mortalité). Ces données montrent une association entre l'activité NF- $\kappa$ B et la mortalité au cours du sepsis [254].



**Figure 38 : Mode d'action de la voie du NF-κB.**

Sous l'effet de différentes voies de transduction IκB est phosphorylé, lui permettant de libérer NF-κB. NF-κB va alors se transloquer au niveau nucléaire où il va se fixer au promoteur κB et induire la transcription de différents gènes codant pour des protéines de la réaction inflammatoire.

D'autres voies de signalisation existent pour le LPS. L'une d'entre elles passe par l'activation du récepteur TREM qui entrainera également une activation de facteurs transcriptionnels : NF-κB et NFAT (facteur nucléaire des cellules T activées) <sup>[255]</sup>. Par ailleurs, certains canaux potassiques membranaires seraient impliqués dans l'activation par le LPS des monocytes/macrophages et des cellules endothéliales <sup>[256-259]</sup>.



### **6.2.3 Le facteur dépresseur myocardique circulant**

L'hypothèse d'un facteur de dysfonction myocardique circulant dans le sang a été évoquée par Wiggers depuis 1947 <sup>[260]</sup>. L'intérêt pour cette hypothèse n'est revenu qu'en 1985, lorsque Parrillo a démontré l'existence de ce facteur circulant <sup>[261]</sup>. Utilisant un modèle de cardiomyocytes de rats nouveaux nés se contractant spontanément, cet auteur a testé la capacité du sérum de patients en choc septique à induire une diminution de contraction des cardiomyocytes. Il a comparé l'effet de sérums issus de cinq types de patients : sains, cardiopathie stable sans sepsis, patient de réanimation sans sepsis ni défaillance myocardique et patients présentant une défaillance myocardique septique, patients avant l'apparition d'un sepsis ou à la phase de récupération. Comme exposé sur la figure 39, seule l'exposition sérums issus de patients en défaillance myocardique septique entraîne une diminution de la fraction de raccourcissement des cardiomyocytes. Une corrélation significative avait été retrouvée entre la diminution de contraction des cardiomyocytes exposés aux sérums de patients septiques et la diminution de fraction d'éjection isotopique mesurée chez ces mêmes patients. De plus, cette dysfonction était interrompue en lavant le milieu de culture des cardiomyocytes par un milieu sans sérum.

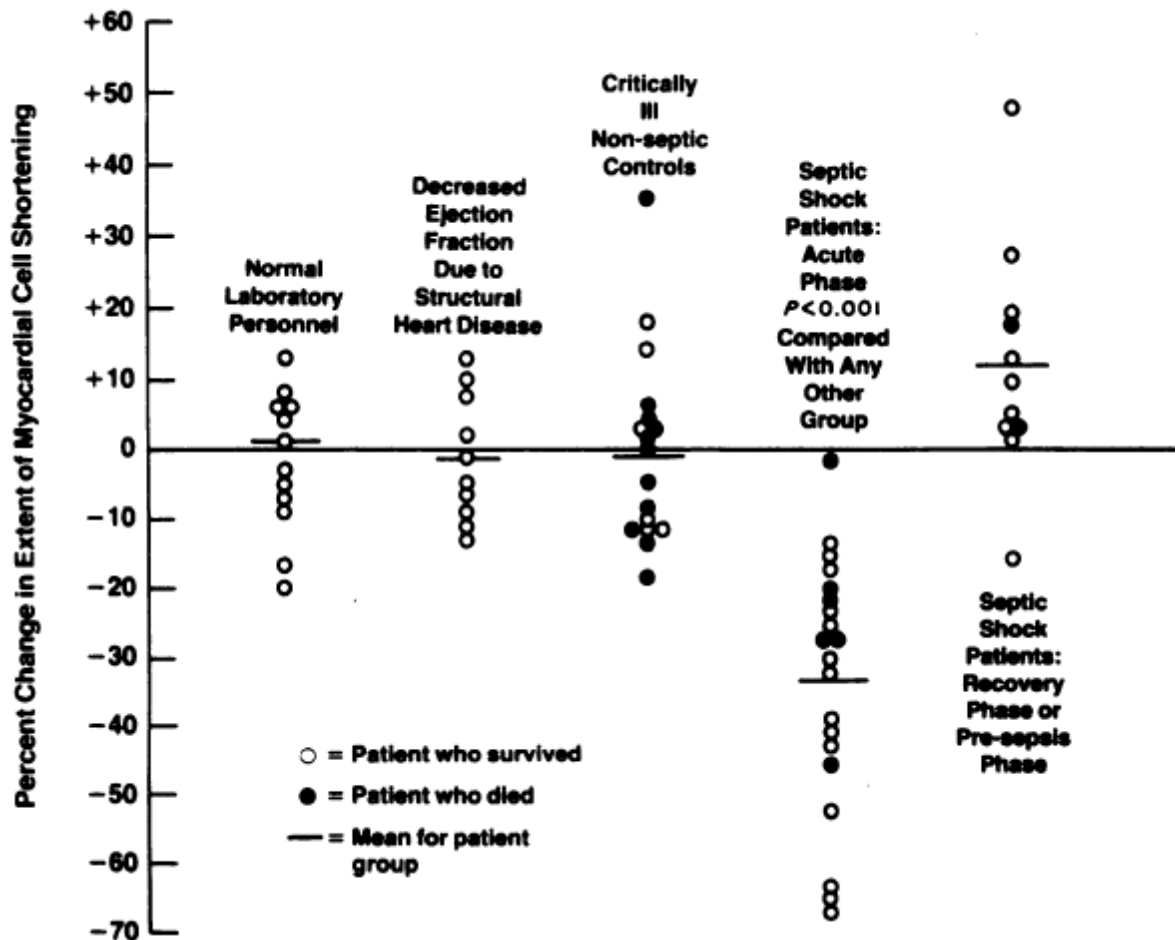


Figure 39 : Effet du sérum de patient en choc septique sur la contractilité de cardiomyocytes

Des cardiomyocytes ont été exposés a des sérums prélevés a différents groupes de patients avec ou sans défaillance cardiaque, avec ou sans sepsis. On remarque que seul le serum du groupe des patients à la phase aigue du choc septique induit une diminution de la fraction de raccourcissement des myocytes. D'après <sup>[261]</sup>.

Reilly, au sein de la même équipe, a confirmé l'association de ce facteur de dysfonction myocardique et de la diminution de fraction d'éjection ventriculaire dans un autre travail quelques années plus tard <sup>[262]</sup>.

Quelques travaux ont essayé de caractériser le « MDF », mais les hypothèses ne sont pas univoques. Sur le plan physico-chimique, des travaux ont retrouvé un caractère liposoluble de cette substance <sup>[263]</sup>, d'autres un caractère hydrosoluble <sup>[261, 264]</sup>. Son poids moléculaire initialement évalué à 2 kDa dans le travail de Parrillo, a été revu a la hausse vers 10-30 kDa suite a des expérimentations de plusieurs

équipes dont celle de Parillo et al [262, 264, 265]. Ce dernier poids de 10-30 kDa serait compatible avec le poids moléculaire de cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 et INF- $\gamma$  qui sont connues pour leurs implications dans les états inflammatoires et qui, pour la plupart, ont des taux sériques élevés lors du choc septique ou endotoxinique. La similitude structurale entre le MDF et une cytokine est évoqué par Kumar qui a montré qu'après immuno-adsorption du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ , le sérum de patients septique perd sa capacité à induire la dysfonction contractile [266]. De plus ce travail met en avant l'effet synergique de ces deux cytokines pour induire la dysfonction myocardique. Ces observations suggèrent que le MDF peut être une combinaison de plusieurs molécules comme certaines cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-2, IL-6 et IFN- $\gamma$ ) qui agissent de concert pour conduire à la dysfonction contractile (tableau x) [267].

---

Composants bactériens (endotoxine)
Cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6)
PAF
Dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines, leucotriènes)
Kinines, bradykinines, VIP
Constituants du système du complément
Facteurs d'origine endothéliale (NO, endothélines)
Dérivés oxygénés réactifs (anions superoxydes, peroxydites)
Autres facteurs circulants ou produits localement

---

TNF : interféron ; IL : interleukine ; PAF : *platelet activating factor* ; NO : monoxyde d'azote.

**Tableau 3 : Médiateurs potentiellement impliqués dans la dysfonction myocardique septique**  
D'après [267].

#### 6.2.4 Les cytokines pro-inflammatoire (second messagers du signal LPS)

Le TNF- $\alpha$  et l'IL1- $\beta$  sont reconnus comme étant les principales cytokines induisant une défaillance cardiaque [266, 268]. Néanmoins, plusieurs autres cytokines peuvent participer à la dysfonction cardiaque [268]. Par exemple, l'injection d'IL-2 recombinante chez l'homme a des effets inotropes négatifs directs [269]. Les effets de l'IL-6 varient

suivant les études. Alors que l'exposition de cardiomyocytes isolés de cœurs de rats par de l'IL-6 seule n'a aucun effet sur la contraction des cellules, cette cytokine potentialise l'effet du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  [270]. Toutefois, cette dernière observation a été remise en cause par Pathan [271]. En effet, l'IL-6 seule exercerait directement et précocément un effet inotrope négatif sur des cardiomyocytes de rats. Enfin, le « *macrophage migration inhibitory factor* » (MIF) semble pouvoir déprimer directement la fonction cardiaque [272]. Ce MIF pourrait en outre réduire la dysfonction cardiaque induite par l'endotoxine en modulant les réponses inflammatoire et apoptotique cardiaques [273].

Ces cytokines déclenchent une réponse contractile biphasique dont les effets sont précoces (<30 minutes) et tardifs (>30 minutes).

#### **6.2.4.1 La réponse précoce**

Les effets précoces des cytokines diffèrent suivant les modèles expérimentaux utilisés. Dans les modèles *in vivo* (dans lesquels les effets observés peuvent être modulés par des facteurs humoraux, nerveux, ...), l'injection de cytokines telles le TNF- $\alpha$  conduisent à une augmentation des indices de contractilité [274]. *In vitro* ou *ex vivo*, les résultats sont beaucoup plus variables. Par exemple, le TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  peuvent aussi bien n'avoir aucun effet [275], augmenter [276, 277] ou diminuer [266] la fraction de raccourcissement des cardiomyocytes *in vitro*.

Plusieurs travaux expliquent la diminution des performances contractiles induites par les cytokines par une diminution des transitoires calciques (Tableau **x**).

Cytokines	Hypothèses avancées pour expliquer la réduction des transitoires calciques	Références
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Inhibition des canaux calciques de type L Mécanisme dépendant des sphingolipides	Krown <i>et al.</i> [278]
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Inhibition des canaux calciques de type L Mécanisme dépendant des sphingolipides	Schreur <i>et al.</i> [279]
<b>IL-2</b>	Modifications de l'activité des Ca <sup>2+</sup> -ATPases sarcolemmiques Baisse de la concentration calcique intra-réticulum	Cao <i>et al.</i> <sup>[280, 281]</sup>
<b>IL-6</b>	Pas d'inhibition des canaux calciques de type L Altération de la fonction du réticulum sarcoplasmique Mécanisme dépendant du NO	Yu <i>et al.</i> <sup>[282, 283]</sup>

**Tableau 4 : Mécanismes à l'origine de la baisse des transitoires calciques induite par certaines cytokines pro-inflammatoires.**

Inversement, l'effet inotrope positif des cytokines retrouvé dans certaines études est associé à une augmentation des transitoires calciques <sup>[277]</sup>. Mais les différences observées semblent être liée au délai entre l'exposition à la cytokine et l'observation de la fonction contractile.

Deux voies majeures sont associées à ces troubles de l'homéostasie calcique : une voie dépendante du NO et une autre associée à l'activation des sphingomyélinases.

#### 6.2.4.1.1 La voie du NO

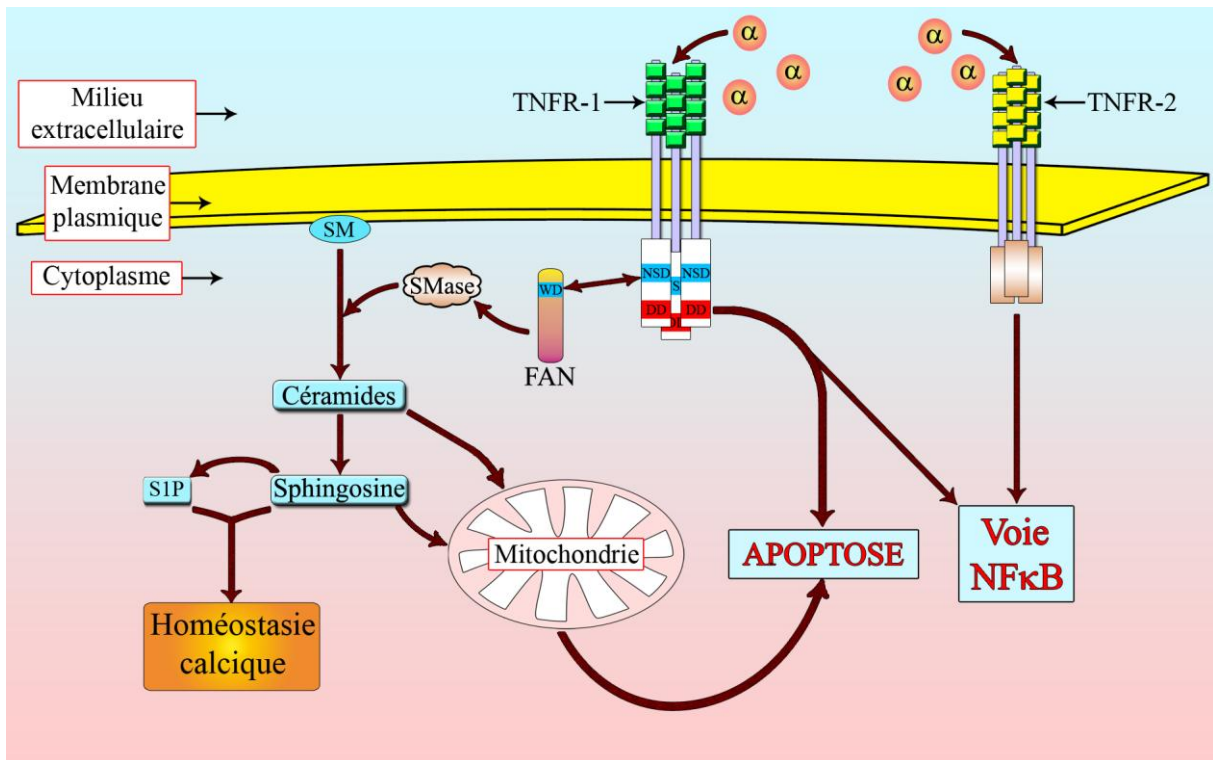
L'équipe de Finkel <sup>[284]</sup> a rapporté que l'effet inotrope négatif précoce du TNF- $\alpha$ , de l'IL-2 et de l'IL-6 passe par le monoxyde d'azote (NO). En effet, l'ajout d'inhibiteurs des NO Synthase (NOS) prévient la dysfonction causée par ces médiateurs. Ces effets rapides s'expliqueraient par une augmentation de l'activité des NOS constitutives (eNOS). Ce mécanisme ne nécessite aucune transcription génique. L'effet réversible de ces cytokines rappelle les caractéristiques du MDF. Depuis, d'autres études ont pu confirmer l'importance du NO dans la dysfonction cardiaque induite par les cytokines <sup>[285, 286]</sup>.

#### 6.2.4.1.2 La voie des sphingomyélinases

Oral *et al.* <sup>[287]</sup> ont montré, sur cardiomyocytes isolés, que l'effet inotrope négatif précoce du TNF- $\alpha$  pouvait s'expliquer par l'activation de la voie des sphingomyélinases acides et neutres. L'activation de cette voie par le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  a été confirmée par d'autres équipes <sup>[279, 288]</sup>.

Après fixation du TNF- $\alpha$  sur le TNFR-1, il y a recrutement, au niveau de ce récepteur, d'une protéine adaptatrice nommée « *factor associated with neutral sphingomyelinase activation* » (FAN). L'interaction entre le domaine WD (domaine riche en tryptophane et aspartate) de FAN et le domaine « *neutral sphingomyelinase activation domain* » (NSD) du récepteur conduit à l'activation de la sphingomyélinase, enzyme capable de dégrader les sphingomyélines de la membrane cellulaire en céramides <sup>[289]</sup>. Ces céramides vont à leur tour être transformés en sphingosines sous l'action d'une céramidase. En outre, la sphingosine peut être phosphorylée par la sphingosine kinase en sphingosine-1-phosphate <sup>[290]</sup> (Figure 40).

Une autre voie mène à une augmentation intracellulaire des céramides. TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont tous deux capables d'activer rapidement les phospholipases A2 <sup>[277, 291, 292]</sup>. Au niveau cellulaire, cela se traduit par une libération accrue d'acide arachidonique. L'acide arachidonique active alors les sphingomyélinases neutres <sup>[293]</sup>.



**Figure 40 : Voies de signalisation du TNF- $\alpha$**

$\alpha$  : TNF- $\alpha$  ; SM : sphingomyéline ; SMase : sphingomyélinase ; S1P : sphingosine-1-phosphate.

Sphingosine-1-phosphate et sphingosine réduisent la contractilité des cardiomyocytes *in vitro* en réduisant les transitoires calciques <sup>[287]</sup>. Cette classe de molécules inhibe non seulement les récepteurs à la ryanodine <sup>[294]</sup> mais aussi les canaux calciques de type L <sup>[279]</sup>. En outre, la dysfonction contractile causée par la sphingosine est réversible ; ceci rappelle de nouveau l'effet du MDF. Les sphingolipides ont également été décrits comme de puissants inducteurs d'apoptose <sup>[295-297]</sup>.

Ainsi, dans les minutes qui suivent l'exposition au TNF- $\alpha$ , les cellules produisent ces métabolites sphingolipidiques, molécules pouvant expliquer en partie l'effet inotrope négatif rapide du TNF- $\alpha$ . De façon intéressante, lors du choc septique humain, plusieurs équipes <sup>[298, 299]</sup> ont mentionné une augmentation des métabolites issus des céramides dans le sérum. L'implication de ces molécules dans la physiopathologie cardiaque septique est donc tout à fait pertinente.

Les cytokines ont généralement une demi-vie courte et sont produites pendant les premières heures de l'infection. Pourtant, la dysfonction myocardique peut évoluer sur plusieurs jours. De plus, la dysfonction cardiaque persiste alors que le cœur est isolé de l'organisme et n'est donc plus soumis aux cytokines <sup>[300]</sup>. Il semble que la dysfonction cardiaque puisse également s'expliquer par des mécanismes plus tardifs nécessitant une synthèse protéique *de novo* ou une activation des voies de transduction du signal.

#### **6.2.4.2 Les effets retardés**

Les effets retardés sont essentiellement liés à une augmentation de production de NO. Le NO peut altérer la fonction cardiaque par plusieurs mécanismes détaillés dans le paragraphe suivant. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et IFN- $\gamma$  sont capables d'induire l'expression de la NOS inductible (iNOS) <sup>[301]</sup>.

Prenons par exemple la signalisation intracellulaire du TNF- $\alpha$ . A la surface des cardiomyocytes sont exposés deux récepteurs au TNF- $\alpha$  : le TNF Receptor-1 (TNFR-1) et le TNF Receptor-2 (TNFR-2). La fixation du TNF- $\alpha$  à ces récepteurs provoque leur homo-trimérisation. Ceci conduit au recrutement des protéines adaptatrices TRAF. Puis, comme pour la signalisation LPS/TLR-4, les protéines TRAF sont à l'origine de la translocation du NF $\kappa$ B. Dans le noyau, NF $\kappa$ B active la transcription de ses gènes cibles tels le gène codant pour le TNF- $\alpha$  ou encore celui codant pour la NOS inductible (iNOS). Ainsi, le TNF- $\alpha$  pourra agir de façon autocrine sur les cardiomyocytes et amplifier le signal initial. Le NO, produit localement par l'iNOS, sera ainsi responsable de certains des effets cardiodépresseurs tardifs.

#### **6.2.5 Le stress radicalaire**

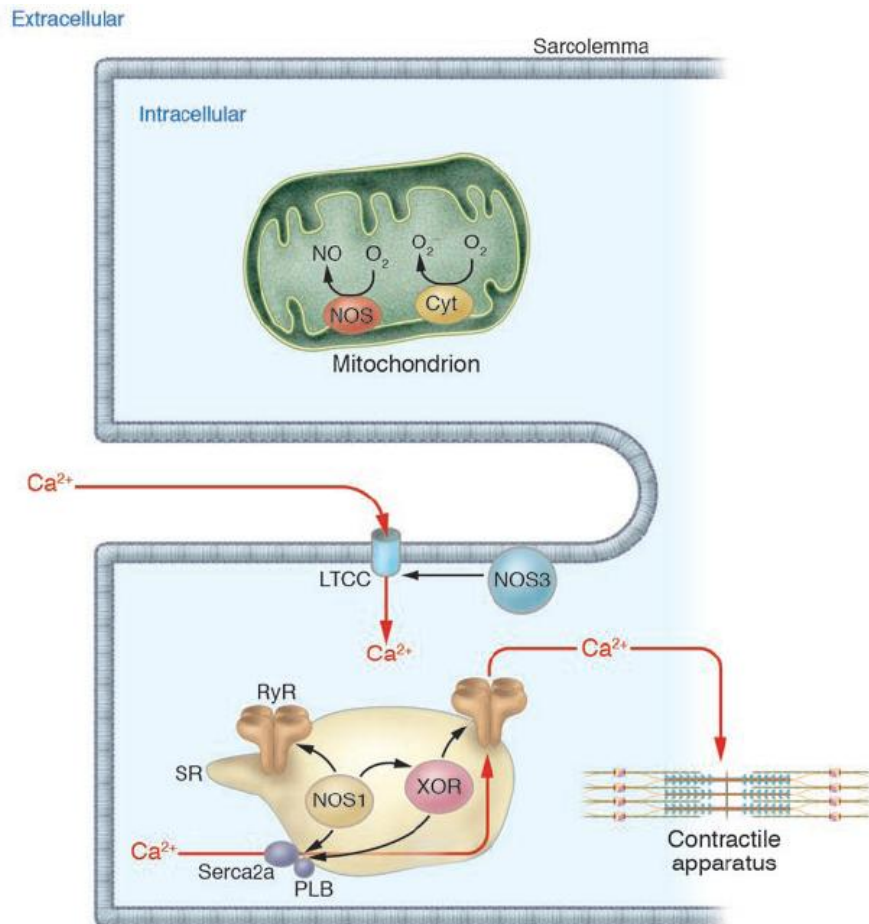
Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) sont à l'origine du stress radicalaire. Ce sont des molécules très instables, hautement réactives, au pouvoir oxydant élevé. Ces composés causent des dommages non spécifiques à



tous les types de biomolécules telles que l'ADN mitochondrial et nucléaire, les protéines, les lipides ou autres hydrates de carbone <sup>[302]</sup>.

#### **6.2.5.1 Les espèces réactives de l'azote**

Les RNS incluent le NO et les S-nitrosothiols (SNOs). Ces derniers se composent d'acides aminés, de peptides ou de protéines modifiés au niveau de leurs résidus cystéine par le NO. Le NO est produit par des enzymes spécialisés : les NO synthases (NOS). Ces enzymes convertissent la L-arginine en L-citrulline et NO. Dans le système cardiovasculaire, deux isoformes jouent un rôle important : la eNOS (NOS endothéliale ou constitutive ou NOS3) et la iNOS (NOS inductible calcium-indépendante ou NOS2). L'expression de cette dernière est sous le contrôle de NFκB. Plus récemment, une isoforme de la NOS neuronale (nNOS ou NOS1) a été détectée au niveau mitochondrial <sup>[303]</sup>. L'hémoglobine est une autre source potentielle de NO. Enfin, la xanthine oxydase des cardiomyocytes est un enzyme capable de transformer les nitrates/nitrites en NO. L'ensemble du NO produit peut réagir avec des molécules soufrées et former des SNOs.



**Figure 41 : Localisation dans le cardiomyocyte de la production de ROS et RNS**

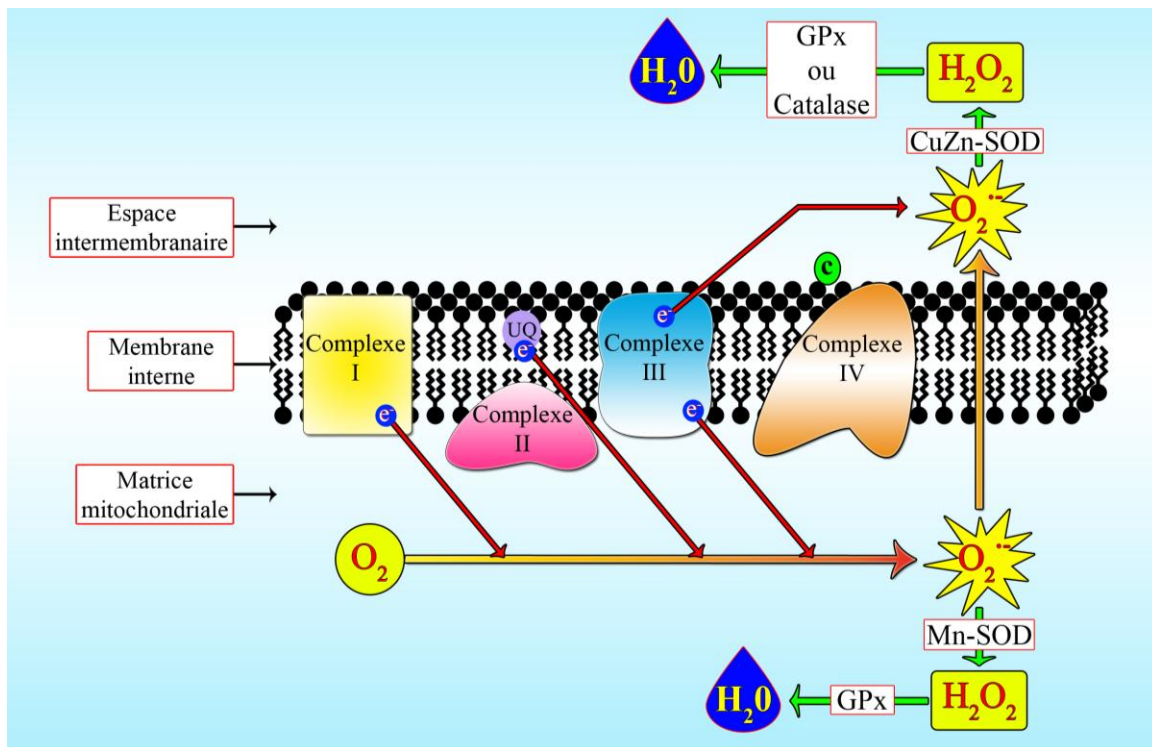
Le NO peut être produit par différentes NO-Synthases dans le cardiomyocyte, elles sont localisées dans des compartiments cellulaires différents. NOS3 est au niveau de cavéoles du sarcolemme et participe à la régulation du canal calcique voltage dépendant (LTCC). NOS1 est au niveau du réticulum sarcoplasmique (SR) et facilite le cycle calcique. XOR (xanthine oxido-réductase est également au niveau du SR. La mitochondrie est également source de NO et d'ion Superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>. D'après <sup>[302]</sup>

### 6.2.5.2 Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène comportent deux sous familles : les radicaux libres (exemple : anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et les espèces non radicalaires (exemples : peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et peroxy-nitrite ONOO<sup>-</sup>). Les sites de production de ROS sont nombreux et varient suivant le type cellulaire. Au niveau cardiaque, les ROS sont produits par la mitochondrie et par des systèmes enzymatiques.

### 6.2.5.2.1 Production mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale peut être responsable d'une partie de la production des ROS <sup>[304]</sup> (Figure 42).



**Figure 42 : Origine mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène et principaux systèmes enzymatiques anti-oxydants**

GPx : glutathion peroxydase ; Mn-SOD : manganèse superoxyde dismutase ; CuZn-SOD : Cuivre-Zinc superoxyde dismutase ; UQ : ubiquinone ; c : cytochrome c ;  $e^-$  : électron.

Entre 1 et 3% de l'oxygène consommé par la mitochondrie génère des radicaux libres. La production de ces ROS a lieu au niveau des complexes I et III ainsi qu'au niveau de l'ubiquinone. Des systèmes enzymatiques endogènes sont prévus pour lutter contre cette production physiologique. L' $O_2^{\bullet-}$  est converti en  $H_2O_2$  par la manganèse superoxyde dismutase (Mn-SOD) du côté matriciel et par la Cuivre-Zinc superoxyde dismutase (CuZn-SOD) dans l'espace intermembranaire. Ce peroxyde d'hydrogène est ensuite neutralisé soit par la glutathion peroxydase (GPx), soit par la catalase.

#### 6.2.5.2.2 Autres systèmes enzymatiques à l'origine des ROS

Récemment, il a été montré que parmi d'autres cytokines pro-inflammatoires, le TNF- $\alpha$  conduisait à une augmentation d' $O_2^{\cdot-}$  *via* la stimulation de systèmes enzymatiques tels que la NADH oxydase ou la xanthine oxydase<sup>[305]</sup>, et ce au niveau cardiaque.

#### 6.2.5.3 Effets cardiaques du stress oxydant

##### 6.2.5.3.1 Effets du NO

Le NO est une molécule peu réactive aux doses physiologiques (1-100 nM). Il exerce un rôle inotrope positif *via* une augmentation de la concentration d'AMPc et du  $Ca^{2+}$  intramyocyttaire<sup>[306]</sup>. Lors du choc septique, il est produit en grande quantité *via* la NOS inductible (iNOS)<sup>[307]</sup>. Pour des concentrations de l'ordre du micromolaire, le NO exerce ses effets délétères soit seul, soit complexé avec d'autres radicaux libres. *In vitro*, le NO, en se fixant à la guanylate cyclase soluble des cardiomyocytes, augmente la concentration intramyocyttaire de GMPc. L'activation de la protéine kinase G pourrait être responsable d'une diminution de la sensibilité des myofilaments au calcium<sup>[306]</sup> ainsi que d'une inhibition des canaux calciques de type L et des récepteurs à la ryanodine<sup>[308]</sup>. Le NO réduirait aussi la réponse des myocytes à la stimulation  $\beta$ -adrénergique<sup>[308]</sup>.

Le NO agit également à un niveau mitochondrial<sup>[309]</sup>. Pour des gammes de concentration de l'ordre du nanomolaire, le NO est capable d'inhiber la cytochrome c oxydase rapidement et réversiblement par des mécanismes de compétition avec l'oxygène. Pour de fortes doses, le NO inhibe de façon irréversible le complexe IV et peut affecter d'autres complexes comme le complexe I de la chaîne respiratoire. Cette inhibition sera à l'origine d'une production importante d'anions superoxyde au niveau de la NADH-UQH<sub>2</sub> réductase<sup>[310]</sup>.

#### 6.2.5.3.2 Effets des ROS

La réaction spontanée entre l' $O_2^-$  et le NO résulte en la formation d'une molécule extrêmement toxique : le peroxynitrite. Les peroxynitrites représentent l'espèce radicalaire la plus toxique <sup>[311]</sup>. Ce sont également de puissants agents cardiodépresseurs <sup>[305, 312]</sup>. Ils causent des dommages à l'ADN mitochondrial et nucléaire <sup>[313, 314]</sup>. Dès lors, ces cassures de l'ADN vont activer des systèmes de réparation comme la poly ADP ribose polymérase (PARP). Cet enzyme utilise le NADH,H<sup>+</sup> comme cofacteur. Ainsi, une forte activité de la PARP peut conduire à une déplétion du stock de cofacteurs réduits. Une carence en coenzymes réduits peut avoir plusieurs conséquences, comme un arrêt de la chaîne respiratoire ou une diminution de la régénération du glutathion réduit, dont le rôle est de lutter contre le stress oxydant. Il se crée alors une boucle d'amplification délétère pour la cellule cardiaque. En outre, les peroxynitrites peuvent agir directement sur la mitochondrie, centrale énergétique de la cellule. Ces derniers peuvent à la fois inhiber les complexes I et II, la cytochrome oxydase, l'ATP synthase, l'aconitase (enzyme intervenant dans le cycle de Krebs et donc à l'origine des cofacteurs réduits), la Mn-SOD et probablement bien d'autres protéines <sup>[315]</sup>. L'inhibition de ces enzymes est irréversible. Par ailleurs, les peroxynitrites favorisent la peroxydation lipidique. Ceci peut conduire à une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne pour les protons et donc à un découplage de la chaîne respiratoire dont la conséquence est une diminution de la production d'ATP. Les peroxynitrites perturbent également l'homéostasie calcique <sup>[316]</sup>. Enfin, ils sont capables d'induire l'apoptose des cellules cardiaques <sup>[317]</sup>.

Cette toxicité multiple des peroxynitrites pourrait ainsi expliquer une partie de la dysfonction cardiaque.

## 6.3 Mécanismes cellulaires intrinsèques aboutissant à la dysfonction myocardique

Secondairement à l'effet de substances circulantes (endotoxine, cytokines, ROS...) différentes altération du fonctionnement cardiomyocytaire vont être à l'origine de la dysfonction myocardique septique.

### 6.3.1 Altération de la signalisation adrénergique au cours du sepsis

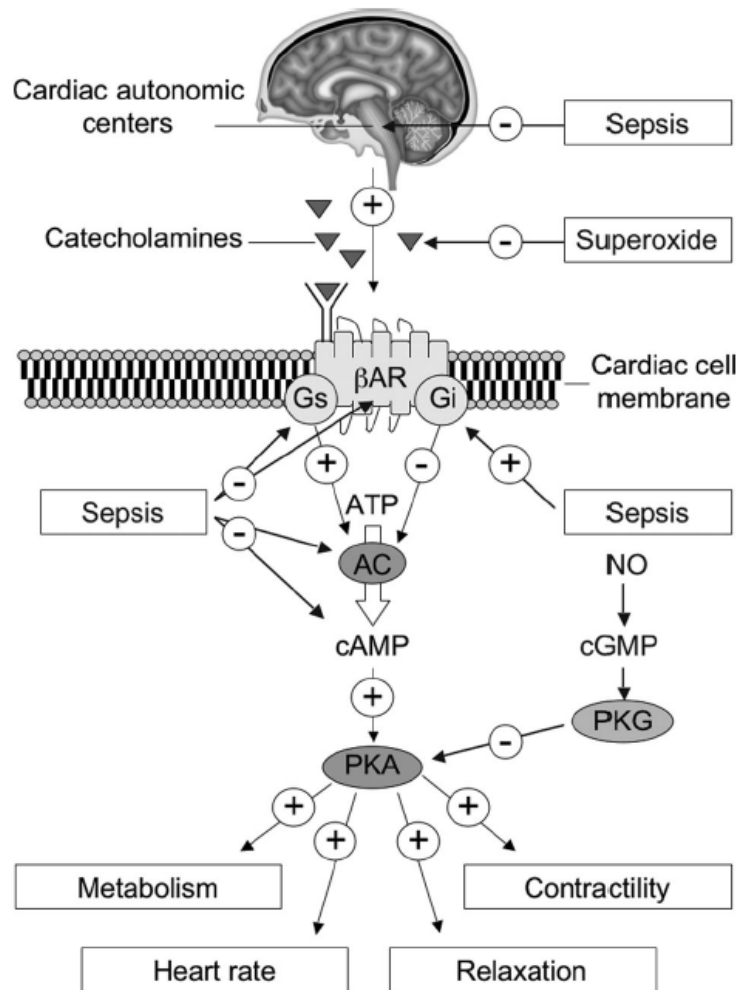
Une dysrégulation autonome survient au cours du choc septique <sup>[318-320]</sup>, elle pourrait être causée par des phénomènes apoptotiques au niveau des centres de régulation cardiovasculaire du SNA. La tachycardie qui caractérise le choc septique présente certains effets délétères tels qu'une augmentation des besoins en oxygène, une diminution du remplissage diastolique du ventricule et éventuellement une cardiopathie induite par la tachycardie <sup>[7]</sup>.

En plus de cette possible régulation inappropriée, des modifications de la transduction du signal adrénergique au cours du sepsis participent à l'altération de la fonction contractile.

La stimulation  $\beta$ -adrénergique aiguë par les catécholamines augmente la contractilité cardiaque et la fréquence cardiaque. Toutefois, une stimulation prolongée et exagérée peut mener à un endommagement du myocarde par une surcharge calcique avec pour conséquence une nécrose cellulaire <sup>[321]</sup>. Plusieurs études ont documenté des niveaux élevés de catécholamines chez les patients <sup>[319, 322, 323]</sup> et des animaux pendant le sepsis <sup>[324, 325]</sup>. Les catécholamines circulantes peuvent être oxydées par les anions superoxydes et ainsi inactivées <sup>[326]</sup>. Dans un modèle de choc septique chez le rat, l'administration d'une variante de superoxyde dismutase (SOD) permet de prévenir l'hyporéactivité aux catécholamines exogènes et l'hypotension observées au cours du sepsis <sup>[326]</sup>. Au niveau du cardiomyocyte, divers mécanismes d'adaptation ont été identifiés pour répondre aux niveaux élevés de catécholamines (figure 43). Chez les rats septiques, la densité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques

myocardiques est diminuée <sup>[327, 328]</sup>. D'autres auteurs ont trouvé que la réponse contractile est affaiblie dans les cardiomyocytes de rats après stimulation par les cytokines, malgré une densité de récepteurs normale <sup>[329]</sup>. Les réponses à l'augmentation des concentrations extracellulaires en calcium sont quand a elles restés normales.

Le mécanisme sous-jacent a été identifié et implique une perturbation du signal de transduction au niveau de la membrane cellulaire <sup>[330]</sup>. Chez les lapins endotoxiniques, les protéines-G stimulatrices sont diminuées <sup>[331]</sup> alors que dans les animaux qui n'ont pas survécus au choc septique <sup>[332]</sup> et les animaux septiques <sup>[333]</sup>, les protéines-G inhibitrices sont augmentées. Ces modifications entraînent une diminution de l'activité de l'adenylate cyclase et la réduction des niveaux de l'AMPc. Il est intéressant de remarquer que chez les patients <sup>[334]</sup> comme chez les souris septiques <sup>[335]</sup> dont la fonction ventriculaire gauche (LV) est réduite, une réduction de la réponse  $\beta$ -adrénergique est associée à des niveaux élevés de NO <sup>[308, 336]</sup> qui peut par la voie de la PKG inhiber la PKA qui appartient a la voie de signalisation adrénergique.



**Figure 43 : Différents effets du sepsis sur la régulation adrénergique de la fonction myocardique**

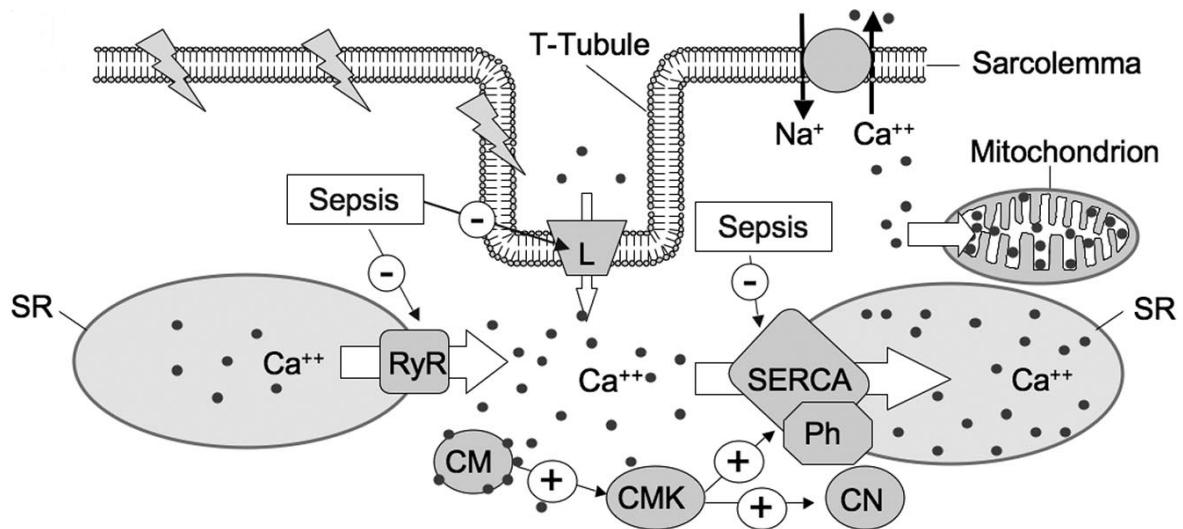
Après stimulation des centres autonomes cardiaques, les catécholamines circulantes stimulent les  $\beta$ -adrénorécepteurs sur les cardiomyocytes. Ces récepteurs sont couplés à l'adénylate-cyclase (AC) qui transforme l'ATP en cAMP. Les protéines G stimulatrice (Gs) et inhibitrice (Gi) modifient la transmission du signal à travers la cellule. cAMP active la protéine kinase A (PKA) qui va phosphoryler des enzymes clés qui vont activer le métabolisme, augmenter la contraction et la relaxation du cardiomyocyte et augmenter la fréquence cardiaque. LE sepsis entraîne a différents niveaux des perturbations dans cette cascade de signalisation, en partie par l'intermédiaire du NO, du cGMP et de la protéine kinase G (PKG). D'après [7].

En résumé, au cours du sepsis, la réponse  $\beta$ -adrénergique est altérée à différents niveaux. En particulier, au niveau du cardiomyocyte, la sévérité de la dysfonction cardiaque septique peut être secondaire à des modifications de la voie de l'adénylate-cyclase [337].



### 6.3.2 Modification des flux calciques

L'endotoxémie expérimentale conduit à un profond dysfonctionnement de la contractilité du myocarde associé à une réduction de la concentration intracellulaire libre du calcium systolique (figure 44).



**Figure 44 : Flux calciques dans le cardiomyocyte et effet du sepsis**

Lors de la dépolarisation le calcium entre par le canal de type L, le calcium entraîne la libération sa propre libération du réticulum sarcoplasmique (SR) par RyR. Le calcium intracytosolique va déterminer la force contractile. Pour permettre la relaxation le calcium cytoplasmique doit être éliminé du cytosol. Il est réabsorbé dans le SR par SERCA dont l'activité est régulée par le phospholamban (Ph). Une partie du calcium est éliminée hors de la cellule par la pompe Sodium-calcium et une partie est réabsorbée par al mitochondrie. Une partie du calcium se lie a la calmoduline (CM) une protéine régulatrice qui va directement diminuer le calcium cytosolique mais également apr son action sur la Calcium-calmoduline kinase (CMK) qui stimule la recapture par SERCA et qui active la calcineurine (CN) dont l'action au niveau de la mitochondrie interagit avec le pore de transition de perméabilité permettant al voie mitochondriale de l'apoptose. Le sepsis entraîne une altération à différents niveaux du cycle calcique du cardiomyocyte. D'après [7].

#### 6.3.2.1 Courant calcique de type L

Cette altération passe en partie par une altération du courant calcique entrant. Zhong *et al.* [338, 339] ont démontré que 4 heures après injection intra péritonéale de lipopolysaccharide chez des cobayes, la durée du potentiel de membrane et le pic du courant calcique de type L ( $I_{Ca}$ ) sont diminués dans les cardiomyocytes ventriculaires. Cette diminution ne semble pas être attribuée à l'altération du courant-voltage dépendant, ni aux cinétiques d'activation et d'inactivation du canal calcique de type L. Par contre elle est réversible par l'isoproterenol, un agoniste  $\beta$ -

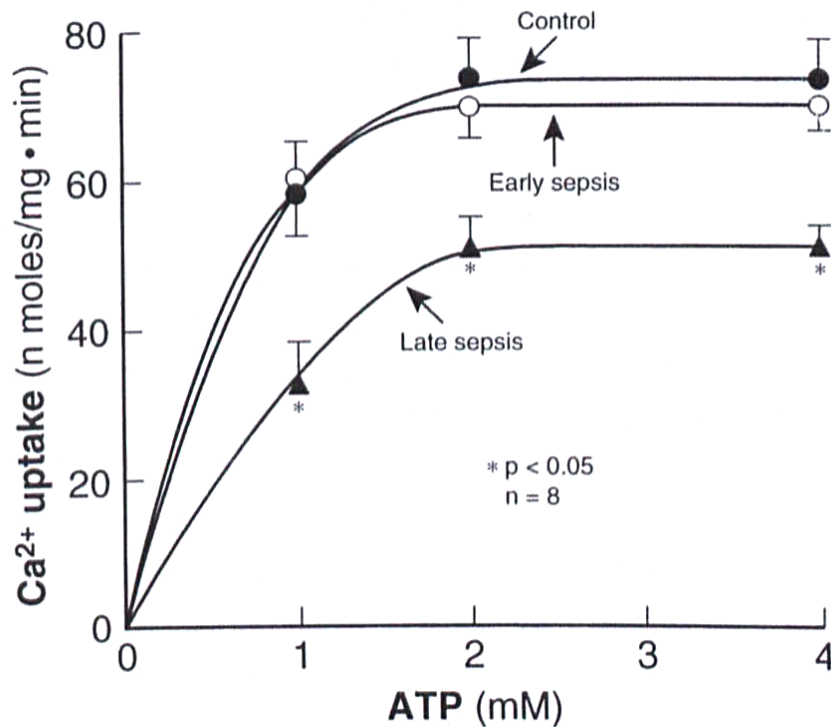
adrénergique qui prévient la réduction du pic du courant  $I_{Ca}$ . Ces données démontrent que l'endotoxémie s'accompagne d'une diminution du courant  $I_{Ca}$  sarcolemmique des cardiomyocytes ventriculaires.

Des anomalies du courant calcique myocardique ont été décrites dans des cardiomyocytes de rongeurs en cultures exposés à l'IL-1  $\beta$  [279, 340] ou à TNF- $\alpha$  [278]. Ce phénomène pourrait passer par la voie des céramides [279]. De même, Lew *et al.* montre que le nombre de canaux calciques myocardiques de type L est diminué au cours de l'endotoxémie [341]. L'endotoxine [337] et les cytokines [340] modifient et suppriment les courants calciques de type L dans les cardiomyocytes isolés de rats, peut-être par des changements de la régulation adrénergique de ce canal [7]. Ceci s'accompagne d'une réduction de la concentration du calcium intracellulaire systolique et d'une diminution de la contraction des cellules. Sur cardiomyocytes isolés, l'endotoxine est également capable de modifier les caractéristiques du potentiel d'action (réduction de sa durée sans modification de l'amplitude ni du potentiel de repos). *In vitro*, le NO, en se fixant à la guanylate cyclase soluble des cardiomyocytes, augmente la concentration intramyocytaire de GMPc et, en activation la protéine kinase G, pourrait être responsable d'une inhibition des canaux calciques de type L et des récepteurs à la ryanodine [308].

### **6.3.2.2 Dysfonction sarcoplasmique**

Au cours du sepsis on constate également une altération du fonctionnement du RyR. Le TNF- $\alpha$  peut inhiber le fonctionnement du RyR par une voie sphingosine dépendante et ainsi empêcher la libération calcique par le SR, comme le montre plusieurs travaux dont certains effectués au sein de notre équipe [287, 342-344]. Des travaux ont également montré une réduction de la densité en RyR sur le SR cardiomyocytes [345, 346]. Cette réduction passerait par un mécanisme dépendant de la phospholipase A2. Or l'activité de cette dernière est augmentée par TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  [277, 291, 292]. De plus le NO entraîne une altération retardée du fonctionnement du RyR par une voie GMPc dépendante et une voie GMPc indépendante [308, 347].

Il a également été constaté une altération de la recapture calcique par le SR au cours de l'endotoxémie. Wu constate une diminution de l'activité de recapture calcique ATP dépendante (rôle exercée par SERCA) à la phase tardive du choc septique dans un modèle de ligature-ponction caecale chez le rat mais pas à la phase précoce hyperdynamique <sup>[115]</sup> (figure 45). Il retrouve la même observation lors d'une autre étude où il met en parallèle l'évolution de la phosphorylation du phospholamban <sup>[348]</sup>. Il constate alors que la phosphorylation du PLB est augmentée à la phase précoce du choc septique alors qu'elle est diminuée à la phase tardive. Cette observation expliquerai ainsi l'évolution de l'activité SERCA qui serait inhibé par la moindre phosphorylation de PLB.

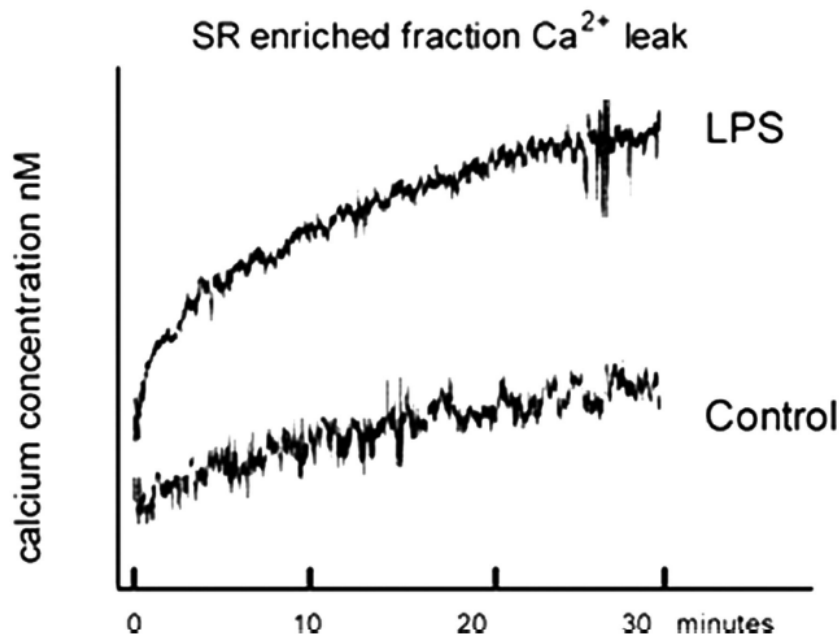


**Figure 45 : Effet du sepsis sur la recapture calcique par SERCA**

Recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique en fonction de concentrations différentes d'ATP. Mesures effectuées sur des préparations de vésicules de réticulum sarcoplasmique isolées à partir de coeurs rats contrôles ou a différents stade du choc septique : précoce (*early sepsis*) et tardif (*late sepsis*). D'après <sup>[115]</sup>.

Enfin des phénomènes de fuite calcique sarcoplasmique ont été décrits dans un modèle de sepsis par ligature-ponction caecale chez le rat <sup>[349]</sup> et confirmé dans notre laboratoire au niveau de vésicules de réticulum sarcoplasmique isolées à partir de rats endotoxémiques <sup>[350]</sup> (Figure 46). Cette fuite est le fait d'une augmentation de

fréquence des étincelles calciques (*calcium sparks*) par ouverture d'un groupe de RyR survenant de manière dispersée dans la cellule. Cette fuite calcique peut participer à la diminution du pool calcique du réticulum sarcoplasmique ainsi qu'à la persistance d'un niveau élevé de concentration calcique cytosolique et va donc entraîner une diminution du transitoire calcique et une altération de la relaxation cardiomyocytaire.



**Figure 46 : Fuite de calcium par le réticulum sarcoplasmique et endotoxine**

Exemples représentatifs de la fuite calcique mesurée sur des vésicules de réticulum sarcoplasmiques obtenue à partir d'un cœur de rat contrôlé ou endotoxémique (LPS). D'après (Hassoun 2008).

### 6.3.2.3 Autres voies

D'autres mécanismes participent à la réduction du potentiel d'action et donc à la libération de calcium systolique. L'endotoxine permet d'ouvrir les canaux potassiques ATP-dépendants, conduisant à un raccourcissement du potentiel d'action et à la réduction de la surcharge en calcium <sup>[351]</sup>. De plus, l'activité de la pompe (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) ATPase est diminuée 4 heures après administration de l'endotoxine <sup>[352]</sup>. Enfin des travaux de Cao ont montré que IL-2, par le biais de l'activation des récepteurs opioïdes kappa, pouvait augmenter l'activité de SERCA mais en diminuant sa

sensibilité au calcium <sup>[280, 281, 353]</sup>. Cela entraîne une activation de SERCA uniquement pour des concentrations très élevées de Calcium et donc une diminution de la recapture calcique cela entraînant une diminution du pool calcique sarcoplasmique et une diminution du transitoire calcique.

### **6.3.3 Altération de l'appareil contractile**

L'appareil contractile est altéré au cours du choc septique par deux mécanismes. D'une part une altération fonctionnelle avec une diminution de la sensibilité des myofibrilles au calcium, d'autre part une altération structurelle liée à une dégradation des protéines contractiles.

#### **6.3.3.1 Désensibilisation des myofibrilles au calcium**

Une altération de la sensibilité des protéines myofibrillaires cardiaques au calcium est trouvée dans des modèles animaux de sepsis <sup>[354, 355]</sup>, entraînant une réduction de la contractilité des muscles papillaires isolés<sup>[356]</sup>. Ceci est confirmé par plusieurs travaux réalisés sur des cardiomyocytes isolés à partir d'animaux septiques.

*In vitro*, sur cardiomyocytes isolés, le TNF- $\alpha$  (à concentration élevée) et l'endotoxine elle-même sont capables de diminuer la réponse des myofilaments au calcium. Les mécanismes exacts ne sont que partiellement connus. Par ailleurs, la réduction de la sensibilité des myofilaments au calcium semble être associée à une augmentation de longueur du cardiomyocyte et à l'augmentation de compliance ventriculaire <sup>[357]</sup>.

Une étude récente a montré que le levosimendan, un médicament qui augmente la sensibilité des myofilaments au calcium, restaure la force contractile cardiaque de lapins endotoxiques <sup>[358]</sup>. Ce résultat a été confirmé chez les patients en état de choc septique <sup>[359]</sup>. Dans un travail de 2007, Barraud et al a confirmé l'altération de la contractilité et les troubles de la relaxation ventriculaire lors du choc septique et avec le traitement par levosimendan il retrouve aussi une amélioration de la force contractile mais également un effet sur la relaxation ventriculaire <sup>[360]</sup>. Il a ainsi été proposé que les altérations des propriétés des myofilaments constituent un des

mécanismes cellulaires à l'origine de la dilatation ventriculaire aiguë fréquemment observée chez les patients en choc septique en réponse au remplissage.

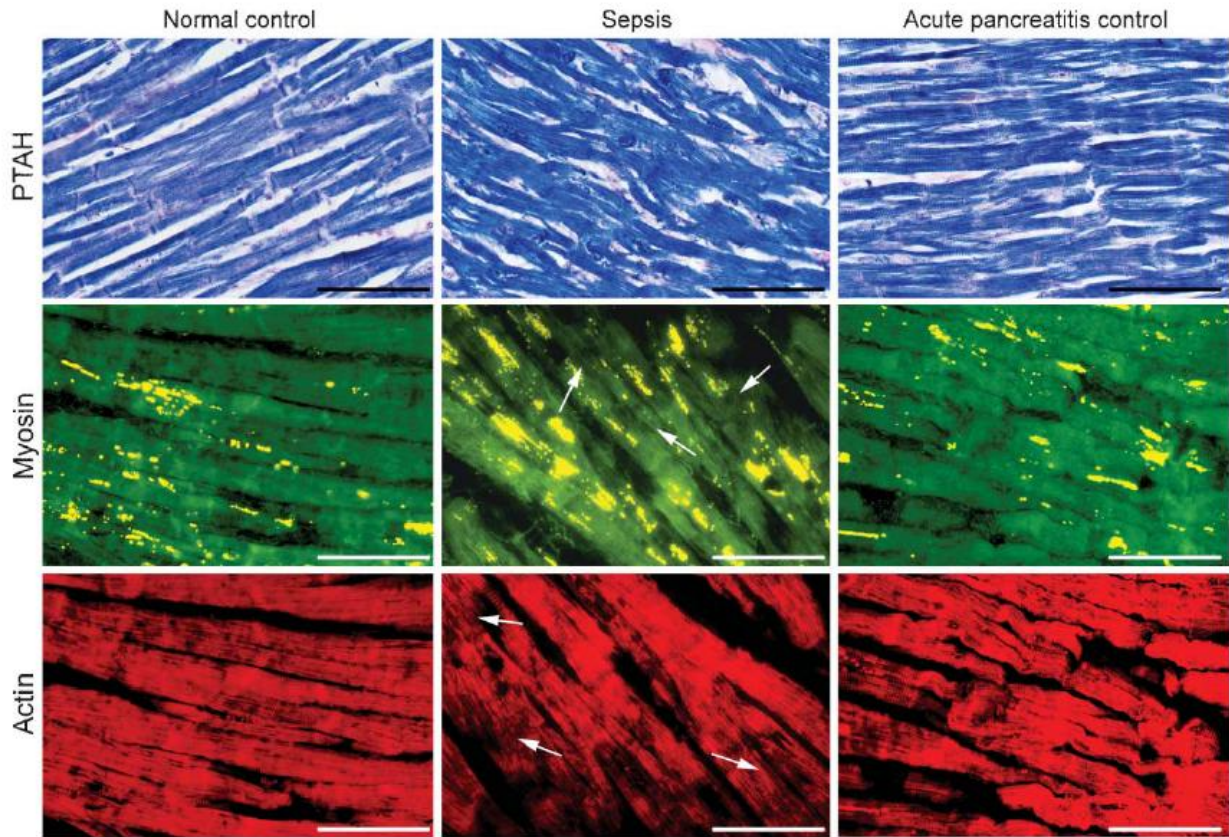
### **6.3.3.2 Lésions de l'appareil contractile**

Quelques travaux ont montré une modification structurale de l'appareil contractile cardiomyocytaire lors du choc septique.

Dans le muscle squelettique, l'activité catabolique est augmentée au cours du sepsis et peut entraîner une dégradation des protéines myofibrillaires.

Chez des rats septiques par péritonite (ligature-ponction caecale), une désintégration de la bande Z et une augmentation de la libération des myofilaments ont été observées. L'utilisation du dantrolène, inhibiteur de la libération du calcium par le SR, permettait de prévenir ces anomalies <sup>[361]</sup>.

Chez les patient décédés d'un choc septique, l'analyse immunohistochimique des cardiomyocytes a suggéré une destruction partielle des myofilaments <sup>[362]</sup> (figure 47). Celle-ci peut être due à l'activité augmentée des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire qui dégradent le cytosquelette et les protéines de l'appareil contractile <sup>[363, 364]</sup>.



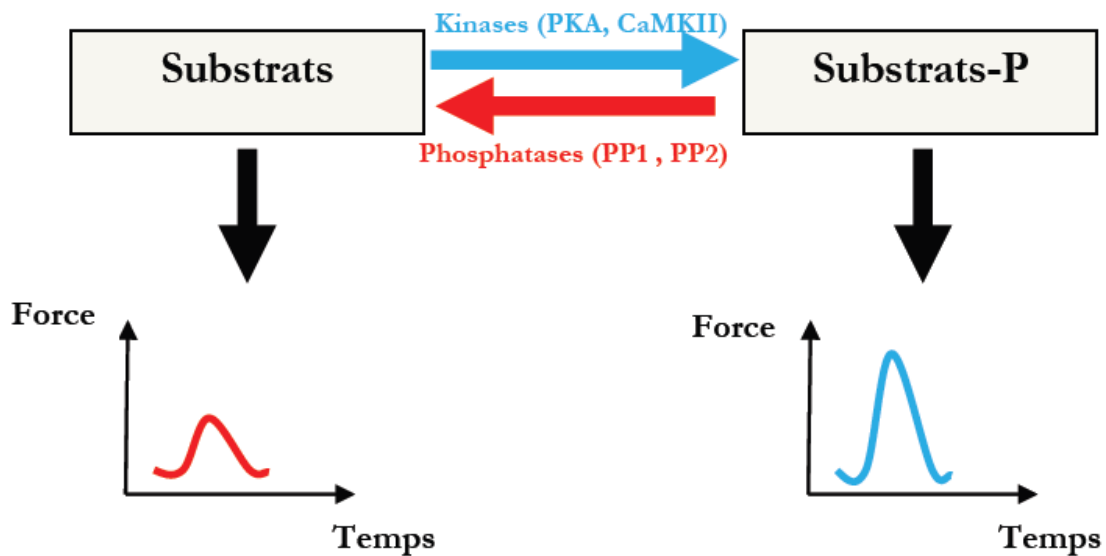
**Figure 47 : Atteinte structurelle du cardiomyocyte lors du sepsis.**

Les trois images du haut représentent des exemples de sections de tissu myocardique colorées au PTAH. Les cardiomyocytes de myocarde de patient contrôle non septique (normal control) et de patient présentant une pancréatite aiguë (pancreatitis control) sont collés régulièrement et montrent une striation visible. Les cardiomyocytes de patient septique ne sont pas striés ou présentent des irrégularités dans la striation. L'immunomarquage de l'actin (trois images du milieu) ou de la myosine (trois images du bas) sont réguliers à travers toute la cellule pour les deux groupes contrôle alors qu'il est perturbé dans le tissu septique avec des interruptions visibles de l'actine et de la myosine (flèches). (la barre blanche correspond à 50µm). D'après [362].

#### 6.3.4 Modifications des phosphorylation / déphosphorylation

La dérégulation de l'homéostasie calcique au cours du sepsis est ainsi, au moins en partie, liée au dysfonctionnement du RS dans sa capacité à capter ou séquestrer le calcium pendant la phase de relaxation cardiaque. Cette séquestration calcique est sous la dépendance du bon fonctionnement du couple SERCA/PLB. La fonctionnalité de ces deux protéines est imposée par les protéines kinases et phosphatases. La diminution de la captation calcique reflète une diminution des taux de l'AMPc

dépendante de la protéine kinase A et de l'augmentation de l'activité phosphatasique (figure 48).



**Figure 48 : Régulation intrinsèque de la force contractile cardiaque par les protéines kinases et phosphatases.**

L'activité kinase de PKA et CamKII tend à améliorer la force contractile, alors que l'activité phosphatase de PP1 et PP2 tend à la réduire. L'équilibre entre l'action des kinases et des phosphatases permet une régulation de la force contractile cardiomyocytaire.

Une phosphatase associée au PLB (PLB-phosphatase) dans le RS cardiaque a été identifiée et semble être similaire à la phosphatase-1. Cette phosphatase diminue la phosphorylation des substrats ( $^{32}\text{P}$ -phosphorylase a et  $^{32}\text{P}$ -RS) au cours de la phase précoce du sepsis. L'activité de la PLB-phosphatase partiellement purifiée est significativement diminuée. Ces résultats ont été confirmés par des études enzymologiques montrant que l'affinité et la vitesse maximale initiale ( $V_{\text{max}}$ ) de la phosphatase chez les rats septiques étaient modifiées <sup>[365]</sup>.

L'altération de la phosphorylation et de la sensibilité calcique des protéines myofibrillaires cardiaques au cours des différentes phases du sepsis induit par CLP ont été étudiées. Les résultats montrent une augmentation de la phosphorylation des protéines TnI et TnC au début du sepsis, ceci est associé à une diminution de la sensibilité des myofilaments au calcium et à une augmentation de la force de contraction ( $+dP/dt_{\text{max}}$ ) et du niveau de l'AMPc. En revanche, dans la phase tardive



du sepsis, la diminution de la phosphorylation du TnI et TnC coïncide avec la réduction de l'activité ATPasique des myofilaments, de la sensibilité des myofilaments au calcium, de la ( $+dP/dt_{max}$ ) et du contenu d'AMPc.

La TnT ne semble pas être affectée par la progression du sepsis. La phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC-2) a été aussi signalée. Elle n'est pas modifiée à la phase initiale du sepsis, mais diminue plus tardivement lors de l'évolution du sepsis. Ces résultats suggèrent que les altérations de phosphorylation de protéines myofibrillaires, telles que TnI, TnC et MLC-2, les changements de la sensibilité au calcium et d'activité ATPase des myofibrilles contribuent à la dysfonction cardiaque septique mais sont variables dans le temps.

### 6.3.5 La dysfonction mitochondriale

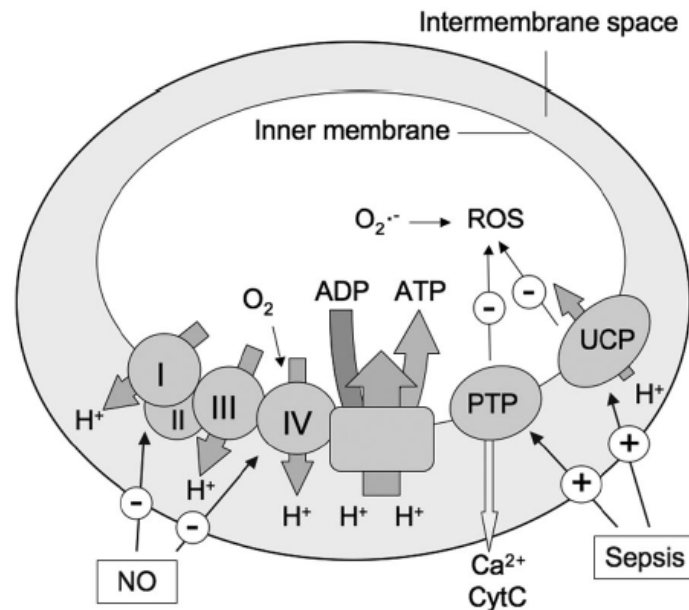
Il y a environ trente ou quarante ans, était déjà évoquée la possibilité d'une défaillance mitochondriale fonctionnelle à l'origine des perturbations énergétiques cellulaires ou tissulaires provoquées par le sepsis <sup>[366-368]</sup>. De ces résultats était venue l'idée que la dysfonction mitochondriale ne résultait pas de modifications primitives préalables aux anomalies d'oxygénation tissulaire. On pensait plutôt, que les perturbations mitochondriales provenaient d'une oxygénation tissulaire insuffisante, comme semblait le prouver l'hyperlactatémie des patients en défaillance circulatoire. Une dette en oxygène était supposée responsable des défaillances d'organes et de la mortalité au cours du sepsis <sup>[369, 370]</sup>. L'hypoxie tissulaire a donc pendant longtemps été considérée comme le probable mécanisme du syndrome de défaillance polyviscérale MODS, « *Multiple Organ Failure Syndrome* ». Ce concept est actuellement défendu par les équipes qui considèrent la défaillance microcirculatoire comme le « moteur » du sepsis <sup>[371]</sup>. Mais, dans les années 95, l'absence de résultats favorables, en terme d'augmentation de survie ou de prévention des défaillances d'organes au cours de deux protocoles cliniques prospectifs, randomisés, d'optimisation de l'oxygénation tissulaire chez les patients septiques <sup>[372-374]</sup>, a fini par remettre en cause cette hypothèse au profit de celle d'un défaut d'utilisation de l'O<sub>2</sub> par les cellules.

Une série de travaux <sup>[375-378]</sup> a pu effectivement montrer que la capacité intrinsèque des cellules à utiliser l'oxygène est compromise par le sepsis quelle que soit la quantité d'O<sub>2</sub> disponible : rassemblés, ces résultats représentent la base théorique du concept de «

*cytopathic hypoxia* » ou hypoxie histotoxique développé par Fink [379]. La consommation d'O<sub>2</sub> est diminuée au cours de la réaction inflammatoire induite par le LPS : le même phénomène est retrouvé *in vitro* lorsqu'on incube des cellules en culture avec un mélange de cytokines pro-inflammatoires. Il existe actuellement de nombreuses preuves de la dysfonction respiratoire mitochondriale au cours du sepsis. La consommation d'O<sub>2</sub> semble limitée par la capacité de transfert électronique. La pO<sub>2</sub> mitochondriale n'est un facteur limitant de la respiration que pour des valeurs extrêmement faibles de celle-ci (inférieures à 5 -7 mmHg) [380]. L'hypothèse d'une atteinte primitive de la fonction mitochondriale, c'est-à-dire non réversible par l'augmentation de la pO<sub>2</sub> mitochondriale, a été renforcée par l'échec clinique des protocoles d'optimisation de l'oxygénation tissulaire chez les patients septiques.

De nombreuses études démontrent l'importance de la dysfonction mitochondriale dans le sepsis [381, 382] (figure 49). Elle a été reliée à la fois à la sévérité et au pronostic [383]. On retrouve des altérations ultrastructurales mitochondriales chez les animaux [239, 384-387] et les patients [388, 389]. Une diminution de la consommation en oxygène suggérant une altération de la respiration mitochondriale est décrite chez l'animal à la phase tardive du sepsis [386]. Une diminution d'activité des complexes de la chaîne enzymatique de transport électronique mitochondriale a également été constatée dans les cœurs d'animaux septiques [385, 390-393]. Les mécanismes sous-jacents comprennent les effets inhibiteurs des RNS et ROS sur la phosphorylation oxydative et la production d'ATP. En particulier l'augmentation de production de NO et de superoxyde ainsi que la diminution des antioxydants intramitochondriaux [383]. L'ADN mitochondrial est plus susceptible aux dommages induits par l'endotoxine que l'ADN nucléaire [385, 394]. Cependant les ROS participent à la récupération en activant la biogenèse mitochondriale au sein du myocarde [385]. L'augmentation d'expression des protéines de découplage mitochondriales (UCP) pourrait diminuer le potentiel de membrane mitochondrial et la synthèse d'ATP [395, 396]. Le rôle de UCP1 dans le tissu adipeux brun est lié à la production de chaleur, tandis que les rôles d'UCP2 et UCP3 (que l'on retrouve dans le myocarde humain [397]) est moins clair en particulier pendant le sepsis [398]. Une fuite de proton induite par UCP peut réduire le rendement de la production d'ATP mais pourrait également limiter la production de superoxyde [399]. Les *Heat Shock Proteins* qui sont placées à l'intérieur et à l'extérieur de la mitochondrie, protègent les structures protéiques et les fonctions vitales lors de situations de stress [400]. Leur activation chez les rats septiques diminue la dysfonction mitochondriale cardiaque [401] et la mortalité [402]. Enfin le pore mitochondrial de transition de perméabilité pourrait jouer un rôle dans l'apparition de la dysfonction mitochondriale. Son inhibition améliore la respiration mitochondriale, restaure le

potentiel de membrane cardiomyocytaire, améliore la fonction cardiaque ex-vivo et diminue la mortalité des souris septiques <sup>[403]</sup>.



**Figure 49 : Mitochondries et effets du sepsis**

Les électrons passent le long de la chaîne respiratoire mitochondriale, génèrent un gradient de proton (H<sup>+</sup>) à travers la membrane mitochondriale interne. Ce gradient dirige la synthèse d'ATP. Au niveau du complexe IV, la plus grande partie de l'oxygène consommé a été réduit sous forme d'eau. Les autres molécules d'oxygène réagissent avec les électrons au niveau des complexes I et II, entraînant la production de superoxyde qui produira d'autres espèces réactives de l'oxygène ROS. Les protéines de découplage (UCP) dissipe le gradient de proton et réduisent la production d'ATP et de ROS. L'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) entraîne un gonflement de la mitochondrie, une chute du gradient de proton, une sortie de calcium et une libération du cytochrome c (CytC) qui peut induire l'apoptose.. Le sepsis entraîne une dysfonction mitochondriale à différents niveaux en partie par une production accrue de NO. D'après <sup>[7]</sup>.

### 6.3.6 L'apoptose myocardique septique et la voie des caspases

On distingue actuellement trois types principaux de mort cellulaire : La nécrose, l'apoptose et l'autophagie (Tableau 5). L'apoptose a été mise en évidence en 1972 par Kerr, Wyllie et Curie <sup>[404]</sup>. L'apoptose est un processus de mort cellulaire, également appelée « mort cellulaire programmée » en raison du caractère actif de la cellule dans la réalisation de sa propre mort. Elle fait suite à une voie de signalisation qui va activer des processus enzymatiques intracellulaire qui aboutiront à la fragmentation nucléaire et à l'arrêt de l'activité cellulaire.

<b>Apoptose</b>	<p>Exposition de phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique</p> <p>Bourgeonnement de la membrane plasmique (« <i>blebbing</i> »)</p> <p>Formation de corps apoptotiques (fragments de noyau et cytosol entourés d'une membrane plasmique) éliminés par des cellules phagocytaires</p> <p>Absence d'inflammation</p> <p>Activation d'enzymes spécifiques de l'apoptose : les caspases</p> <p>Processus ATP-dépendant</p> <p>Condensation et fragmentation de l'ADN génomique en fragments oligonucléosomiaux de 180 à 200 pb</p>
<b>Nécrose</b>	<p>Vacuolisation du cytoplasme</p> <p>Gonflement de la cellule et des organelles</p> <p>Rupture de la membrane plasmique</p> <p>Libération du contenu intracellulaire dans l'espace interstitiel et induction d'une réaction inflammatoire</p> <p>Type de mort cellulaire ne nécessitant pas d'ATP</p> <p>Dégradation non spécifique de l'ADN génomique</p>
<b>Autophagie</b>	<p>Dégradation des constituants cellulaires pour produire de l'énergie</p> <p>Formation dans le cytosol d'une vésicule à double membrane encapsulant organelles et cytosol : l'autophagosome</p> <p>Fusion de l'autophagosome avec les lysosomes (autophagolysosome) pour dégradation et recyclage du contenu</p> <p>Condensation de la chromatine (pycnose) sans fragmentation</p>

**Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des différents types de mort cellulaire.**

L'apoptose est un processus physiologie participant au renouvellement tissulaire. Mais elle a également été impliquée dans de nombreux processus pathologiques tels que les maladies neuro-dégénératives, les cancers, les maladies auto-immunes et certaines atteintes cardiaques. La nécrose a longtemps été considérée comme le mode de mort cellulaire des cellules cardiaques. Ce n'est que depuis les années 90 que l'apoptose cardiaque est étudiée dans différents modèles de défaillance myocardique. On a retrouvé une apoptose cardiomyocytaire, caractérisée par la fragmentation nucléaire, dans la cardiomyopathie dilatée<sup>[405]</sup>, l'infarctus du myocarde<sup>[406-409]</sup>, la myocardite<sup>[410]</sup>, la dysplasie arythmogène du ventricule droit<sup>[411]</sup> et la

défaillance myocardique septique [412-414]. Néanmoins, le taux d'apoptose nucléaire, même s'il est supérieur aux taux physiologiques, reste relativement faible dans la plupart de ces pathologies (généralement inférieur à 1%). La perte cellulaire entraînée par le processus apoptotique est donc insuffisante pour expliquer l'altération de la fonction cardiaque. Les voies biochimiques de l'apoptose sont activées dans ces tissus sans forcément aboutir à la mort cellulaire mais participe à l'adaptation de la cellule suite à divers stimuli pouvant éventuellement aboutir sur la mort cellulaire.



**Figure 50 : visualisation de l'apoptose nucléaire dans le myocarde**

Tissu myocardique de rat contrôle à gauche et de rat endotoxémique (8h après l'injection) à droite. Utilisation d'une technique marquant la fragmentation de l'ADN : technique transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). Grossissement x 400. La flèche indique un noyau TUNEL-positif.

### **6.3.6.1 Voies biochimiques de l'apoptose**

L'activation des voies biochimiques de l'apoptose peut se faire par deux voies : une voie passant par les récepteurs de mort, dite voie extrinsèque, ou une voie faisant intervenir la mitochondrie, dite voie intrinsèque. Au niveau myocardique, elle peut être déclenchée par une myriade de stimuli [415] : hypoxie, réoxygénation, acidose, stress oxydant, privation de sérum, carence en glucose, inhibition métabolique, agonistes  $\beta$ -adrénergiques, étirement, angiotensine II, TNF- $\alpha$ , FasLigand,

anthracyclines, sphingolipides. L'importance relative de ces différents inducteurs n'est pas encore établie. Ces stress cellulaires activent la machinerie apoptotique soit par une voie membranaire, soit par une voie mitochondriale. Les principales enzymes effectrices de l'apoptose appartiennent à la famille des caspases pour « *cysteine aspartate specific proteases* », ce sont des cystéines-protéases dirigées spécifiquement contre des résidus aspartate. On distingue, selon leurs fonctions respectives, trois groupes de caspases : initiatrices, effectrices ou inflammatoires (Tableau 6).

Subfamily	Role	Members
I	Apoptosis activator	Caspase-2 Caspase-8 Caspase-9 Caspase-10
II	Apoptosis executioner	Caspase-3 Caspase-6 Caspase-7
III	Inflammatory mediator	Caspase-1 Caspase-4 Caspase-5 Caspase-11 Caspase-12 Caspase-13 Caspase-14

**Tableau 6 : Différentes caspases classés par sous groupes.**

On distingue les caspases initiatrices, effectrices et inflammatoires. D'après <sup>[416]</sup>.

### 6.3.6.1.1 Initiation de l'apoptose

#### 6.3.6.1.1.1 Voie extrinsèque

La voie extrinsèque d'activation de l'apoptose passe par la stimulation d'un récepteur spécifique dit « récepteur de mort »<sup>[416]</sup>. Les récepteurs de morts appartiennent à la grande famille des récepteurs au TNF, ils présentent au niveau de leur domaine intracellulaire une séquence spécifique appelée « *Death Domain* » (DD). Les récepteurs les mieux caractérisés sont le TNFR-1 (p55, CD120a, DR-1) et le récepteur Fas (CD95, Apo-1, DR-2) dont les ligands respectifs sont le TNF- $\alpha$  et le

FasLigand (FasL). La fixation du ligand (FasL, TNF- $\alpha$ ) sur son récepteur de mort (Fas, TNFR-1) induit la trimérisation des récepteurs. Les régions cytoplasmiques DD vont alors se rapprocher et servir de point d'amarrage pour d'autres protéines appelées protéines adaptatrices. Ces protéines adaptatrices diffèrent suivant le récepteur de mort. Grâce à sa partie C-terminale contenant un DD, la protéine adaptatrice « *Fas-associated death domain* » (FADD) est recrutée au niveau du DD du récepteur Fas. Le TNFR-1 quant à lui recrute la protéine « *TNFR-1-associated death domain* » (TRADD) suivant les mêmes modalités. TRADD facilite à son tour la liaison de FADD. Ensuite, FADD, *via* un domaine appelé « *death effector domain* » (DED) recrute les procaspases-8 et -10. Le recrutement des procaspases au niveau des protéines FADD permet à ces proenzymes d'être en étroite relation. Leur faible activité protéolytique endogène sera suffisante à leur autoactivation. Les caspases initiatrices seront alors à même d'activer les caspases effectrices ou d'activer la voie intrinsèque mitochondriale via le clivage de Bid.

#### **6.3.6.1.1.2 Voie intrinsèque**

Sous l'action de divers facteurs (calcium, ROS, céramides, absence de facteur de croissance) la voie intrinsèque de l'apoptose va être déclenchée. Elle passe par la libération dans le cytosol du cytochrome-c, qui est normalement au niveau de la membrane interne mitochondriale. Différents mécanismes pourraient être à l'origine de la libération du cytochrome c, l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial ou la perméabilisation de la membrane mitochondriale par des protéines pro-apoptotique de la famille Bax/Bcl-2.

L'ouverture du pore de transition de perméabilité est à l'origine d'un gonflement de la matrice mitochondrial et d'une rupture de la membrane externe mitochondriale permettant ainsi la libération de facteurs pro-apoptotiques (cytochrome-c) <sup>[417]</sup>.

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie pourrait se faire par la polymérisation de Bax ou Bak au niveau de la membrane mitochondriale externe formant ainsi des pores qui permettrait la libération de cytochrome-c <sup>[418, 419]</sup>. L'activation la voie intrinsèque par Bid (évoqué plus haut) pourrait passer par ce type de mécanisme. Bid la forme tronquée par la caspase-8 de Bid entrainerai la

polymérisation de Bax ou pourrait elle-même s'oligomériser pour former un pore au niveau mitochondrial <sup>[420]</sup>.

La libération du cytochrome-c dans le cytosol va être à l'origine de la formation de l'apoptosome, un complexe enzymatique à l'origine de l'activation des caspases effectrices <sup>[421]</sup>. Le cytochrome-c se lie à APAF-1 qui change alors de conformation et lie de l'ATP puis se multimériser sous la forme d'un heptamère d'APAF-1 <sup>[422]</sup>. Sous cette forme APAF-1 va recruter la procaspase-9 et ainsi former l'apoptosome (association ATP-cytochrome-c-APAF-1-procaspase-9). Comme pour la procaspase-8, la faible activité protéolytique sera suffisante à leur autoactivation. Les caspases-9 actives seront alors à même d'activer les caspases effectrices.

Une autre voie d'activation de l'apoptose pourrait passer par une action de Bax au niveau du SR qui entraînerait une activation des calpaïnes, d'autres cystéines-protéases, qui sont à même d'activer la procaspase-12 <sup>[423]</sup> et de cliver Bid <sup>[424]</sup> entraînant ainsi l'activation des deux voies d'activation de l'apoptose.

#### 6.3.6.1.2 Phase effectrice de l'apoptose

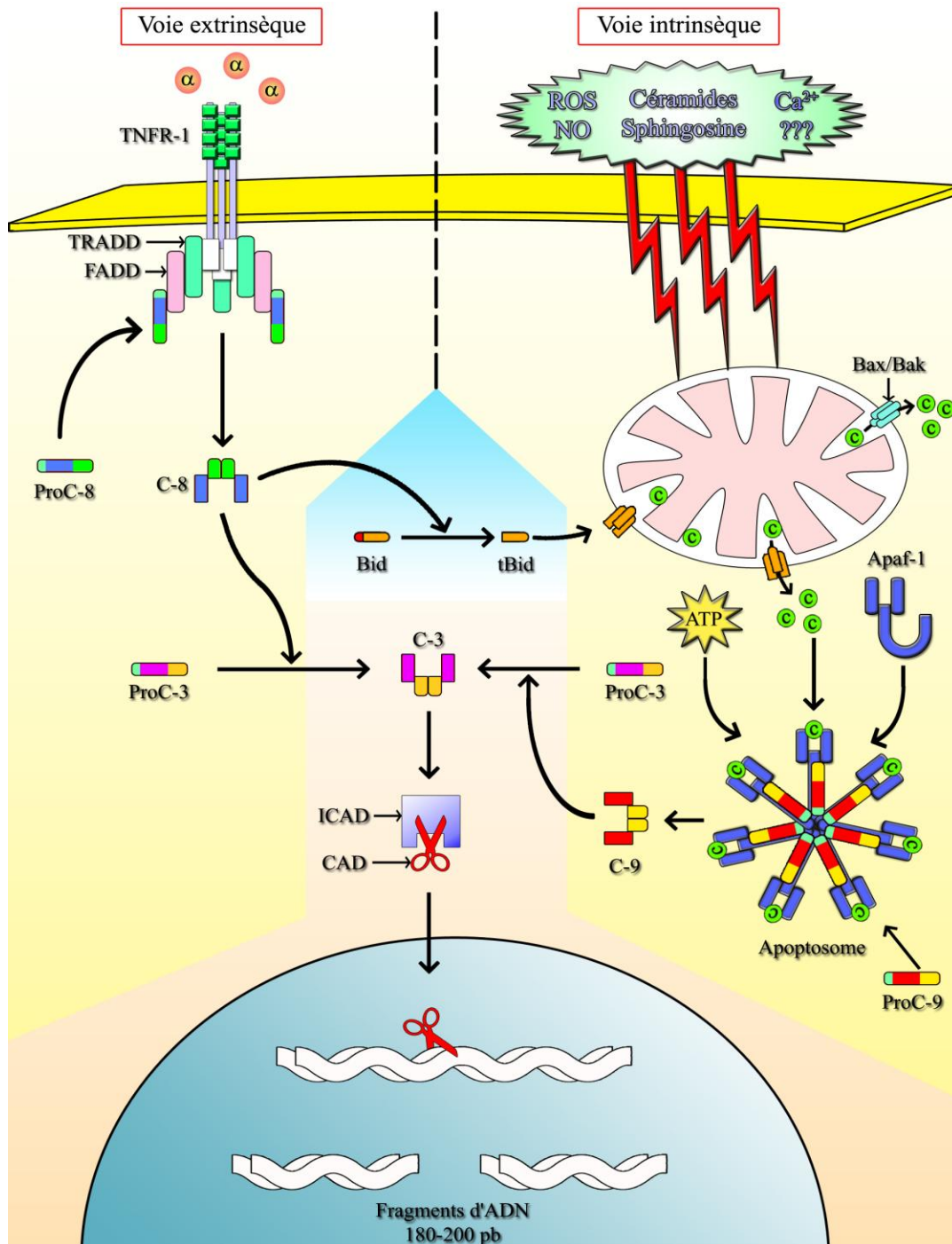
Cette phase a pour finalité la fragmentation de l'ADN nucléaire. Elle est principalement dépendante de l'activation des caspases effectrices mais il existe une autre voie passant par le « *apoptosis inducing factor* » (AIF) et l'endonucléase G qui proviennent de l'espace intermembranaire mitochondrial <sup>[425-427]</sup>.

Une fois activées, les caspases initiatrices clivent les procaspases effectrices afin de les activer. Ces dernières ont de nombreux substrats dont d'autres procaspases permettant ainsi une boucle d'autoamplification. Plus de cent protéines cellulaires ont été décrites comme substrats potentiels de ces protéases <sup>[428, 429]</sup>. L'enzyme de réparation nucléaire (PARP) est une cible des caspases-3 et -7. De même la caspase-3 clive ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*) levant ainsi l'inhibition qu'il exerce sur CAD (*caspase activated DNase*) qui une fois libérée pourra cliver l'ADN en fragments de 180 à 200 paires de bases.

Le cardiomyocyte est une cellule particulièrement riche en molécules permettant d'inhiber les processus apoptotiques dépendants des récepteurs de mort (FLIP,



ARC, IAP) ou des mitochondries (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) [430]. En outre, la mort cellulaire programmée peut être modulée par de nombreuses protéines kinases. Notamment par les voies des PI3K [431-434], des MAPK [435], des protéines kinases A [436-439].



**Figure 51 : Activation de l'apoptose par les voies intrinsèque et extrinsèque**

Pour détail voir texte. α : TNF-α ; c : cytochrome c ; ProC-3, -8, -9 : procaspases-3, -8, -9 ; C-3, -8, -9 : caspases-3, -8, -9 ; CAD : « caspase-activated DNase » ; ICAD : « inhibitor of CAD » ; TRADD : « TNFR-associated death domain » ; FADD « Fas-associated death domain ».

### **6.3.6.2 Apoptose myocardique et dysfonction myocardique septique**

Plusieurs études *in vitro* rapportent que différents types cellulaires cardiaques peuvent entrer en apoptose . Par exemple, suite à l'induction *in vitro* par du LPS, les cellules de l'endothélium ventriculaire enclenchent le processus apoptotique <sup>[440]</sup>. De plus, les cytokines synthétisées au cours du choc septique induisent l'apoptose d'autres cellules cardiaques. Ainsi, une étude sur des fibroblastes cardiaques de rats adultes montre que l'IL1- $\beta$  et non le TNF- $\alpha$  provoque l'expression de la NOS inducible. Le NO alors produit serait responsable de l'effet pro-apoptotique de l'IL1- $\beta$  <sup>[441, 442]</sup>. En outre, les cellules contractiles cardiaques exposées au LPS active la voie de l'apoptose. L'équipe de Sabbadini *et al.* suggère que l'effet pro-apoptotique du LPS passe par le récepteur CD14 exprimé à la surface des cardiomyocytes <sup>[443]</sup>. La voie de signalisation dépendante de ce récepteur serait responsable d'une sécrétion autocrine de TNF- $\alpha$ . Dès lors, le TNF- $\alpha$  pourrait enclencher les voies biochimiques de l'apoptose. *In vitro*, le LPS à faible dose (10 ng/mL) induirait la mise en oeuvre du processus apoptotique par l'activation des récepteurs de type I à l'angiotensine II <sup>[444]</sup>.

Dans un modèle de choc septique *in vivo*, la première équipe ayant décrit l'activation des processus apoptotiques au niveau myocardique est celle de Walley <sup>[414]</sup>. Suite à l'injection d'endotoxine à un rat, le coeur de l'animal est prélevé pour réaliser des études biochimiques. Les auteurs ont alors détecté une activation des caspases effectrices, une libération de facteurs pro-apoptotiques depuis la mitochondrie vers le cytosol mais également une augmentation du nombre de noyaux fragmentés. Dans cette étude, la dysfonction contractile cardiaque est temporellement associée avec l'activation des voies de l'apoptose. Toutefois, aucune preuve expérimentale n'est apportée pour prouver un quelconque lien de causalité entre apoptose et dysfonction cardiaque. C'est en 2001 <sup>[412, 413]</sup> que notre équipe a montré, pour la première fois, que l'inhibition pharmacologique des caspases permettait non seulement de réduire l'apoptose nucléaire mais aussi de prévenir la dysfonction myocardique septique. De plus, plusieurs travaux de notre équipe ont montré que l'inhibition des calpaines, de l'ouverture du port de transition de perméabilité (des mécanismes qui participent à l'induction de l'apoptose) ou la surexpression de Bcl-2 un facteur anti-apoptotique se

sont avérés permettre une prévention de la dysfonction contractile septique [403, 445-447].

## 7 OBJECTIFS DU TRAVAIL

Notre équipe s'est particulièrement intéressée à la défaillance circulatoire du sepsis et tout particulièrement à son versant cardiaque. Nous avons montré la survenue de phénomènes apoptotiques dans cette défaillance myocardique septique. Les premiers travaux que nous avons réalisés sur cette thématique ont montré que bien qu'elle soit augmentée dans le sepsis, on constate une faible prévalence de l'apoptose nucléaire cardiomyocytaire dans le tissu myocardique alors qu'il est constaté une augmentation de l'activité des caspases, protéases effectrices de l'apoptose. Son implication dans les altérations fonctionnelles n'était donc pas lié à la perte cellulaire mais comme nous l'avons montré antérieurement à l'activation des caspases elles-mêmes. L'activation de ces caspases participerait ainsi aux altérations des flux calciques et du fonctionnement de l'appareil contractile myocardique.

Les constatations fonctionnelles observées dans différents travaux nous ont amené à nous interroger sur l'effet de la fréquence cardiaque sur l'altération de la fonction myocardique. Et plus particulièrement l'effet du sepsis sur les relations force-fréquence et relaxation-fréquence et sur les mécanismes à l'origine des modifications observées.

Les différentes étapes de ce travail ont donc été de caractériser l'altération de la fonction contractile myocardique dans notre modèle de choc septique par endotoxémie. Afin d'en préciser les mécanismes, nous avons recherché à replacer le rôle de l'activation des caspases dans l'apparition de la dysfonction myocardique. Nous avons constaté que ces phénomènes peuvent être induits par le sérum d'animaux endotoxiniques. Nous avons recherché si, à partir du sérum de patients en choc septique, la présence de médiateurs circulants de type cytokiniques pouvait être à l'origine de cette dysfonction. Et enfin nous avons recherché à montrer l'altération des relations physiologiques liant la force contractile et la relaxation à la fréquence cardiaque.

## 8 RÉSULTATS

### 8.1 Article 1 : Ventricular Myocyte Caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction, *Circulation* 2005

Des publications précédentes du laboratoire ont montré l'augmentation des processus apoptotiques dans notre modèle de choc septique par endotoxémie chez le rat. Ils avaient montré que la mort cellulaire en elle-même n'est pas suffisante pour expliquer l'altération fonctionnelle myocardique. Par contre l'inhibition des caspases avait montré un effet bénéfique sur la fonction contractile.

Le but de ce travail est de confirmer l'implication de la voie des caspases dans les altérations contractiles myocardique, de montrer qu'elles participent à une diminution des transitoires calciques cardiomyocytaires et de rechercher des mécanismes par lesquels les caspases pourraient être à l'origine de cette dysfonction. Nous avons également souhaité vérifier le caractère transmissible de la dysfonction myocardique septique par un médiateur circulant, pouvant être TNF- $\alpha$ .

Ainsi, après avoir traité les rats par l'endotoxine (10 mg/kg, IV) avec ou sans inhibiteurs de caspases (benzyloxycarbonyl-val-ala-asp.fluoromethylketone zVAD.fmk 3 mg/kg, IV), les cardiomyocytes ont été isolés afin de mesurer leur fonction contractile, leurs transitoires calciques, leur organisation sarcomérique et l'activité des caspases intramyocytaires. Nous avons également évalué les effets des sérums de rats septiques sur des cardiomyocytes isolés de rats traités par le zVAD.fmk ou le zDEVD.cmk (un inhibiteur spécifique de la caspase 3), ou sur des cardiomyocytes contrôles traités *in vitro* par ces inhibiteurs (100  $\mu$ M).

L'endotoxémie entraîne une altération de la contractilité des cardiomyocytes, associée à une réduction des transitoires calciques, Une augmentation du calcium diastolique cytosolique, une diminution de la sensibilité des myofibrilles au calcium,

une désorganisation des sarcomères ainsi qu'à un clivage de la Troponine T (TnT). L'endotoxine induit au niveau cardiomyocytaire l'activation des voies apoptotiques dépendant des récepteurs de mort et des mitochondries. L'activité de type caspase-3 est associée aux anomalies fonctionnelles et structurelles observées. Ces altérations sont prévenues par le zVAD.fmk. Le sérum des rats septiques est riche en TNF- $\alpha$  et il est également capable d'induire une diminution de la fraction de raccourcissement, une diminution des transitoires calciques et un clivage de la TnT et l'augmentation de l'activité de type caspase-3. Que le traitement des cardiomyocytes par le zVAD.fmk ou le zDEVD.cmk, soit réalisé *in vivo* ou *in vitro*, il empêche les effets du sérum septique.

L'endotoxémie est capable d'induire différentes altérations fonctionnelles et structurelles au niveau du cardiomyocyte. Ces constatations pourraient être en partie expliquées par l'activation de multiples caspases qui sont capables d'altérer l'appareil contractile et qui semblent également impliquées dans les modifications des flux calciques observées lors de l'endotoxémie.

# Ventricular Myocyte Caspases Are Directly Responsible for Endotoxin-Induced Cardiac Dysfunction

Steve Lancel, PhD; Olivier Joulin, MD; Raphael Favory, MD; Jean Francois Goossens, PhD; Jérôme Kluza, PhD; Claude Chopin, MD; Pierre Formstecher, MD, PhD; Philippe Marchetti, MD, PhD\*; Remi Neviere, MD, PhD\*

**Background**—Although most of the deleterious effects of sepsis-induced apoptosis have been attributed to increased lymphocyte cell death, caspase activation may directly alter cell function of different organ systems. We postulated that left ventricular (LV) cardiomyocyte caspase activation is directly involved in sepsis-induced heart contractile dysfunction.

**Methods and Results**—LV cardiomyocytes isolated 4 hours after rat treatment with endotoxin injection (10 mg/kg) displayed major reductions in contractile reserve and myofilament response to  $Ca^{2+}$ . Concomitantly, endotoxin also induced increases in LV cardiomyocyte caspase-3, -8, and -9-like activities, which were associated with sarcomeric structure destruction and cleavage of components of the cardiac myofilament. Interestingly, zVAD.fmk treatment of septic rat prevented LV cardiomyocyte contractile dysfunction, reductions in myofilament response to calcium, troponin T cleavage, and sarcomere destruction. Serum (10%) of endotoxin-treated rats induced contractile dysfunction, caspase-3-like activity increase, and troponin T cleavage of naive LV cardiomyocytes. The effects of septic serum were prevented in LV cardiomyocytes isolated from zVAD.fmk- or zDEVD.cmk-treated rats or LV cardiomyocytes preincubated with zVAD.fmk or zDEVD.cmk.

**Conclusions**—The results show an important relationship between endotoxin-induced caspase activation and reduced contractile reserve and sarcomere disarray at the level of single LV cardiomyocytes. (*Circulation*. 2005;111:2596-2604.)

**Key Words:** apoptosis ■ myocardial contraction ■ myocytes, cardiac ■ inflammation ■ shock

In the United States, >500 000 patients per year develop bacterial sepsis, with an estimated rising incidence of  $\approx 1.5\%$  per year.<sup>1,2</sup> Sepsis remains the chief cause of death in intensive care units, with mortality rates between 30% and 70%.<sup>2,3</sup> Impaired myocardial contractile function is a well-documented feature that greatly contributes to the mortality associated with this pathological condition.<sup>2,4</sup> A large body of evidence<sup>4-6</sup> suggests that exposure of animals and humans to endotoxin (lipopolysaccharide) mimics the deleterious effects of bacterial sepsis on myocardial function. Although sepsis is generally viewed as a disease aggravated by an inappropriate inflammatory response to endotoxin, implication of apoptosis processes in the pathogenesis of sepsis has been recently demonstrated.<sup>2,7</sup>

Most of the deleterious effects of endotoxin-induced apoptosis have been attributed to increased circulating and lymphoid tissue resident lymphocyte cell death.<sup>7,8</sup> In these studies, protection induced by apoptosis inhibition involved prevention of bacterial growth, alteration in the immune

response, and remote effects of apoptosis inhibitors on different cell types.<sup>7,8</sup> Alternatively, it could be questioned whether endotoxin-induced activation of apoptosis pathways may directly induce myocardial dysfunction, which can be reduced by apoptosis inhibitors. Indeed, endotoxin may trigger end-stage apoptosis of myocardial cells, which is associated with heart multiple caspase activation and cytochrome *c* release from the mitochondria.<sup>9-12</sup> Interestingly, in vivo caspase activity blockade by broad-spectrum and effector caspase (ie, caspase-3) inhibitors reduced endotoxin-induced heart caspase-3 activity and myocardial dysfunction.<sup>11,13</sup> In these studies, however, indirect effects of caspase inhibitors on the extent of activation of immune cells cannot be ruled out.

The major goal of this study was to investigate the role of effector caspase activation in left ventricular (LV) cardiomyocyte dysfunction induced by endotoxin. First, we confirmed that caspase-3 activation and contractile dysfunction may be described at the level of LV cardiomyocytes isolated

Received July 8, 2004; revision received January 14, 2005; accepted January 20, 2005.

From EA 2689, CHRU, and Université de Lille 2, IFR 114 IMPRT (S.L., O.J., R.F., C.C., R.N.); INSERM U459 U524, IMPRT (J.K., P.F., P.M.); Laboratoire de Chimie analytique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2 (J.F.G.); and Département de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Lille 2 (S.L., O.J., R.F., R.N.), Lille, France.

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to Dr Remi Neviere, Département de Physiologie, Faculté de médecine, 1 place de Verdun, Lille Cedex 59045, France. E-mail rneviere@univ-lille2.fr

© 2005 American Heart Association, Inc.

*Circulation* is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.490979

Downloaded from [circ.ahajournals.org](http://circ.ahajournals.org) by on September 17, 2007



from septic rat hearts. Second, we developed an in vitro model to test whether caspase inhibition would prevent LV cardiomyocyte contractile dysfunction induced by septic serum, independently of the effects of caspase inhibitors on immunocompetent cells infiltrating the myocardium. Third, we proposed that endotoxin-induced effector caspase activation is centrally involved in LV cardiomyocyte contractile dysfunction and reduced myofilament response to calcium with major sarcomere disorganization and contractile protein cleavage.

## Methods

### Animal Preparation

Adult male Sprague-Dawley rats (weight, 250 to 300 g) were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg IP). Treatments were administered intravenously via the dorsal penile vein. Four hours after treatment, rats were used for cardiomyocyte isolation and serum preparation, as previously described.<sup>9</sup> The protocol was approved by the Animal and Use Committee of Lille, and the care and handling of the animals were conducted in accordance with our national institutional guidelines.

### LV Cardiomyocyte Shortening and $[Ca^{2+}]_i$ Measurement

LV cardiomyocytes (viability >85%) were plated (100 000 cells per milliliter) and stored at 37°C until use. For contraction amplitude (IonOptix), cells were placed in a flow chamber (30°C) on the stage of a microscope (E800, Nikon) and electrically stimulated at 1 Hz (voltage adjusted to maximize capture). The fluorescent  $Ca^{2+}$  indicator fluo-3 acetoxymethyl ester (6  $\mu$ mol/L for 20 minutes, 37°C) (Molecular Probes, Inc) was used to measure intracellular  $Ca^{2+}$  as previously described.<sup>14</sup> Fluorescence brightness (excitation 465 to 495 nm; emission 515 to 555 nm) was recorded with the use of a CCD camera (C2400-08). Calibration of  $[Ca^{2+}]_i$  was performed by the use of ionomycin, butanedione monoxime, and  $MnCl_2$  solutions, as previously described.<sup>14</sup>

### Serum and Heart Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Determination

Serum and heart homogenates were prepared for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine Murine rat TNF, R&D Systems), as described previously.<sup>13</sup>

### Caspase-3, -8, -9-Like Activity Assay

After incubation in assay buffer A (in mmol/L: HEPES 50, NaCl 100, EDTA 1, dithiothreitol 10, with CHAPS 0.1%, glycerol 10%; in  $\mu$ g/mL: aprotinin 10, leupeptin 10, pepstatin 10; pH 7.32), cells were lysed with a Kontes Glass. Next, 200  $\mu$ g of proteins was diluted in 200  $\mu$ L of assay buffer, then either Ac-DEVD-AMC, Ac-IETD-AMC, or Ac-LEHD-AMC (50  $\mu$ mol/L; Biomol) was added. Sample fluorescence (excitation 380 nm; emission 437 nm) was measured at 2 hours (Spex Fluoromax, Isa-Horiba).

### Immunohistochemistry for Active Caspase-3

Frozen sections of heart tissue (8  $\mu$ m) were used to detect caspase-3 by antibodies recognizing the cleaved active form of the enzyme (BD Pharmingen) according to the manufacturer's instructions.

### Western Blot Studies

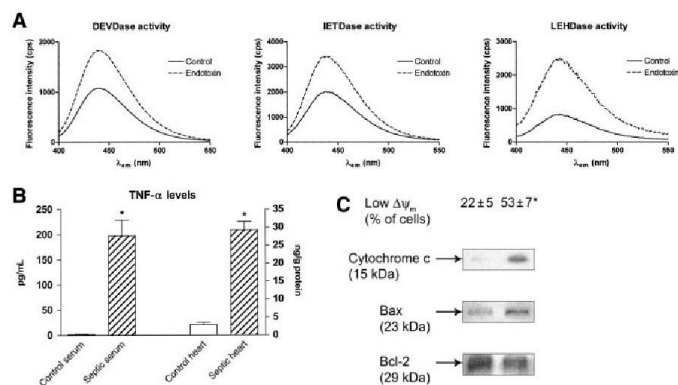
After cell lysate (buffer A) electrophoresis, polyclonal anti-caspase-3 antibody (BD Pharmingen) and polyclonal anti-caspase-7 antibody (Cell Signaling Technology) were used. After cell fractionation into mitochondrial and cytosolic compartments and electrophoresis, monoclonal anti-cytochrome *c* antibody (BD Pharmingen) was used. After heart homogenate preparation, polyclonal anti-Bcl-2 and anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used. After cell lysis with specific lysis buffer for myofilament preparation<sup>15</sup> and electrophoresis, monoclonal anti- $\alpha$ -actinin, anti-troponin T (Sigma), anti-troponin C (Novocastra Laboratories Ltd), and anti-troponin I (Advanced Immunochemical) antibodies were used.

### Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential was measured (FACS Calibur Analytic Flow Cytometer (BD Biosciences) in LV cardiomyocytes with the use of the fluorescent probe JC-1 (1  $\mu$ mol/L, 30 minutes), which produces green fluorescence in the cytoplasm and red-orange fluorescence when concentrated in respiring mitochondria that have a negative internal potential. Data were analyzed with Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry 2.8 software.

### Confocal Microscopy Studies

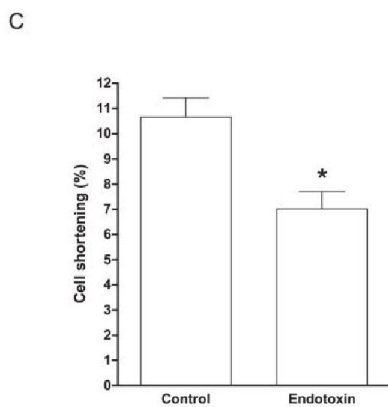
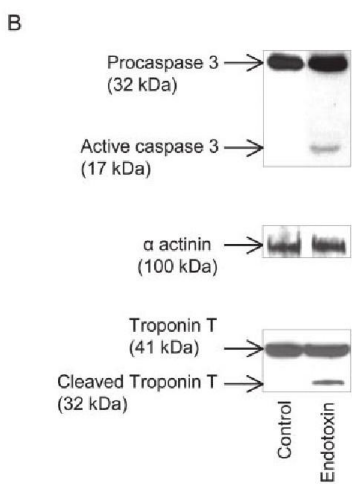
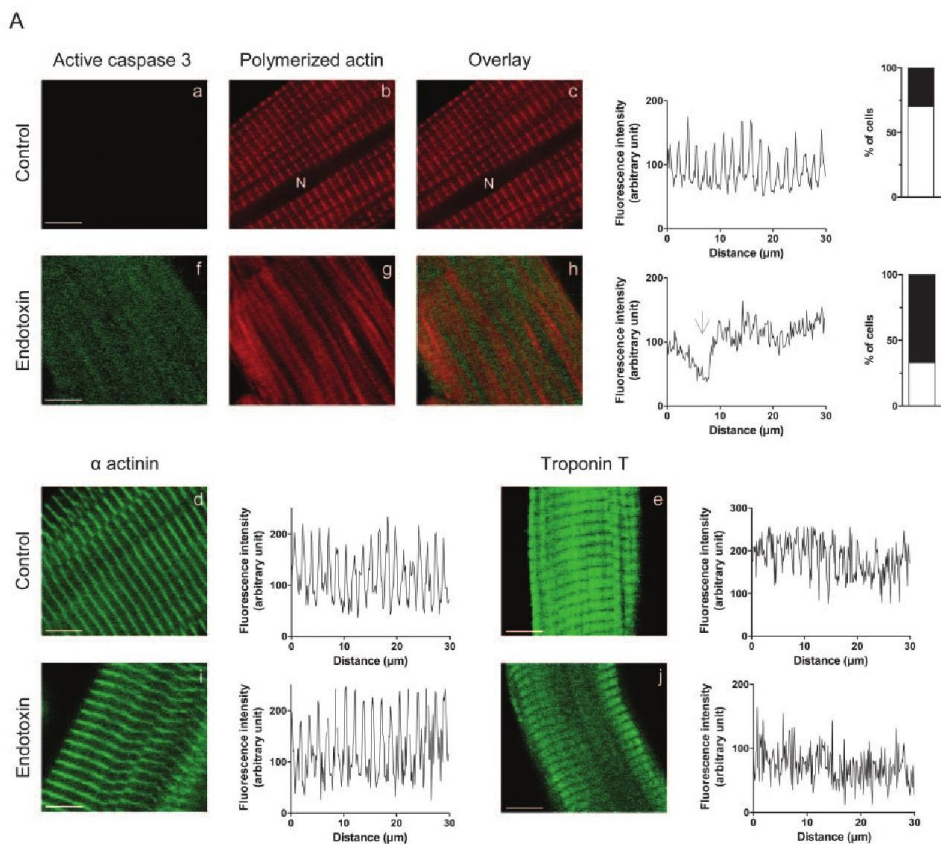
Ventricular sarcomere organization and caspase-3-like activation were assessed on isolated LV cardiomyocytes and visualized by confocal microscopy (Leica TCS NT, Microsystemes). According to the manufacturer's instructions, caspase-3-like activation was detected in living cells with the use of carboxyfluorescein-labeled fluoromethyl ketone peptide inhibitor of caspase-3 (FAM-DEVD-FMK) from CaspaTag Caspase 3/7 in situ assay kit (Chemicon



**Figure 1.** Effects of endotoxin treatment on apoptotic pathways. A, Endotoxin triggers upstream and downstream caspase activity increases. Representative caspase 3-like activity (DEVDase), caspase-8-like activity (IETDase), and caspase-9-like activity (LEHDase) measurement in LV myocytes of control and endotoxin-treated rats is shown. Maximal fluorescence intensity (counts per second [cps]) was measured ( $\lambda_{em} = 437$  nm) ( $n = 6$  in each group). B, Endotoxin induces serum and heart TNF- $\alpha$  level increases. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.01$  vs control;  $n = 6$  in each group. C, Endotoxin (right panel) activates mitochondrial apoptotic pathway. LV myocytes isolated from endotoxin-treated rats present low mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) compared with control (left panel), cytochrome *c* release in cytosolic compartment, Bax level increases, and reduction of Bcl-2 level. \* $P < 0.01$  vs control;  $n = 6$  in each group.

Downloaded from [circ.ahajournals.org](http://circ.ahajournals.org) by on September 17, 2007





International). Polymerized actin fibers,  $\alpha$ -actinin, and troponin T were visualized by Texas red-phalloidin (Molecular Probes), mouse monoclonal anti- $\alpha$ -actinin, and anti-troponin T (Sigma), respectively. Images were quantified and processed with the use of Leica TCS NT software (PowerScan module).

### Experimental Design

In the first series of experiments, LV cardiomyocytes of hearts of control (500  $\mu$ L IV saline), endotoxin *Escherichia coli* serotype 055:B5 (Sigma)-treated (10 mg/kg IV in 500  $\mu$ L saline), zVAD.fmk (Bachem)-treated (3 mg/kg IV in 500  $\mu$ L saline) control, and zVAD.fmk-treated endotoxin-treated rats were isolated for physiological and biological evaluation. Caspase inhibitors were administered at the same time as endotoxin.

In the second series of experiments, the effects of control and septic serum were studied on naive LV cardiomyocytes incubated with caspase inhibitors (zVAD.fmk or zDEVD.cmk; 100  $\mu$ mol/L). Alternatively, LV cardiomyocytes were isolated from rats treated with caspase inhibitors (zVAD.fmk or zDEVD.cmk; 3 mg/kg body wt, 4 hours).

In the third series of experiments, the effects of endotoxin 100 and 500 ng/mL were studied on LV cardiomyocyte survival, contractile function, caspase-3-like activity, and troponin T cleavage.

### Statistical Analysis

Data represent mean  $\pm$  SEM and were analyzed by ANOVA procedures. When a significant difference was found, we identified specific differences between groups using a sequentially rejective Bonferroni procedure. After application of Bonferroni correction, significance was achieved with  $P < 0.01$  for comparisons with control.

## Results

### Endotoxin Rat Treatment Induces Cardiomyocyte Caspase Activation, Contractile Dysfunction, and Sarcomeric Destruction

Four hours after endotoxin treatment, rats presented with diarrhea, polypnea, and pilo-erection. Endotoxin treatment induced downstream caspase activation in LV cardiomyocytes, which was evidenced as caspase-3-like activity increases (Figure 1A), active caspase-3-like staining increases (Figure 2A), and proteolytic activation of caspase-3 (Figure 2B). Proteolytic caspase-7 activity was not detected in LV cardiomyocytes of control and endotoxin-treated rats (data not shown). Cell viability (trypan blue exclusion) and nuclear condensation (Hoechst 33342 staining, 1  $\mu$ g/mL) of LV cardiomyocytes isolated from control and endotoxin-treated rats were quantified over time. Cell viability in control and septic LV cardiomyocytes remained up to 80% over time (4, 24, and 96 hours; data not shown). Few condensed nuclei (Hoechst staining) were detected (<5%) in control and septic

LV cardiomyocytes at 4 and 24 hours after isolation (data not shown). In LV cardiomyocytes of septic rats, caspase-3 activation was associated with heart and plasma TNF- $\alpha$  level (Figure 1B) and upstream caspase-8-like activity (Figure 1A) increases. Mitochondrial-related factors were investigated as a possible upstream pathway that would regulate caspase-3 activation. In LV cardiomyocytes of septic rats, we observed loss of mitochondrial membrane potential, reduced Bcl-2/Bax protein ratio, cytosolic cytochrome *c* release (Figure 1C), and caspase-9-like activity increases (Figure 1A).

To assess sarcomeric integrity, we evaluated sarcomeric unit structure, contractile protein cleavage, and caspase activities in the same population of LV cardiomyocytes. Septic LV cardiomyocytes, in which caspase-3-like activity was increased (Figure 2A), displayed hazy, destroyed, and disorganized sarcomeric unit structure (Figure 2A) and troponin T cleavage (32-kDa fragment) (Figure 2B).  $\alpha$ -Actinin remained unchanged (Figure 2A, 2B). No significant proteolytic cleavages were detected for troponin I (32 kDa), troponin C (19 kDa), or actin (43kDa) (data not shown).

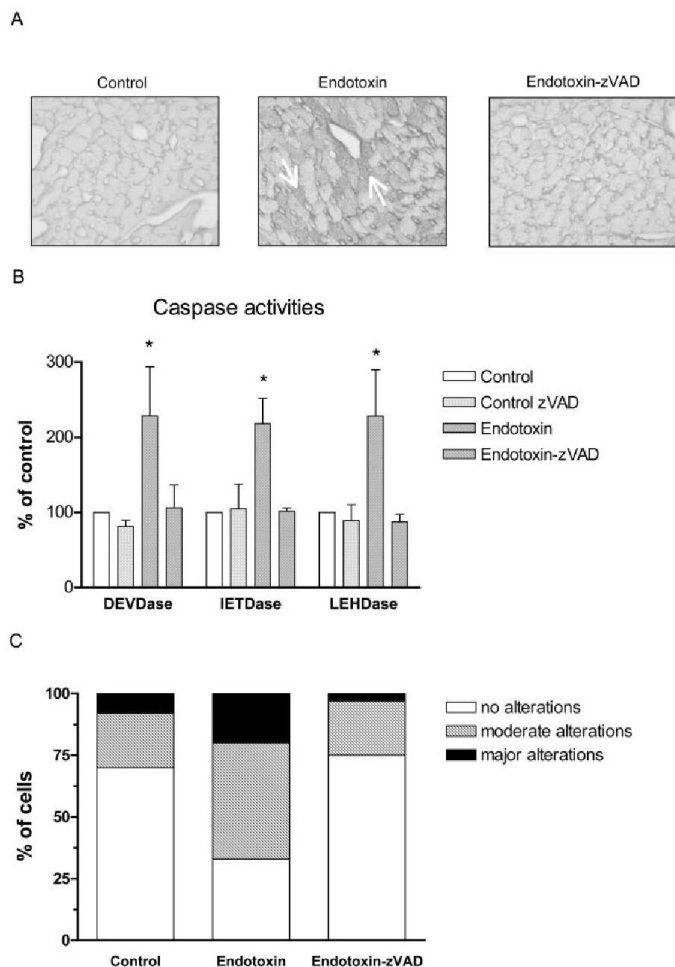
From the same rat heart, cell shortening was measured. In contrast to control LV cardiomyocytes, fractional cell shortening was severely depressed in septic LV cardiomyocytes (Figure 2C).

### zVAD.fmk Prevents Endotoxin-Induced Cardiomyocyte Multiple Caspase Activation and Contractile Dysfunction

zVAD.fmk treatment had no effects on clinical signs of sepsis and endotoxin-induced heart and plasma TNF- $\alpha$  level increases (data not shown). zVAD.fmk prevented endotoxin-induced LV cardiomyocyte caspase-3 activation (Figure 3A) and proteolytic procaspase-3 cleavage (data not shown), which were associated with reduced caspase-3-like, death receptor-dependent caspase-8, and mitochondrial-related caspase-9 activities (Figure 3B). zVAD.fmk inhibited sarcomere alterations induced by endotoxin (Figure 3C).

Fractional shortening and calcium transient were significantly decreased in LV cardiomyocytes isolated from endotoxin-treated rat hearts compared with control LV cardiomyocytes (Figure 4A, 4B). Reductions in calcium transient in LV cardiomyocytes isolated from endotoxin-treated rat hearts were mainly related to increases in diastolic  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 4C). Rat treatment with zVAD.fmk prevented changes in cell shortening, calcium transient, and diastolic  $[Ca^{2+}]_i$  observed in septic LV cardiomyocytes.

**Figure 2.** Endotoxin treatment induces caspase-3-like activation, sarcomeric structure alterations, troponin T cleavage, and contractile dysfunction. Each experiment was performed on the same population of LV myocytes isolated from control (a to e) or endotoxin-treated (f to j) rats (n=6 in each group). A, top, Confocal visualization of active caspase-3-like stained by FAM-DEVD-FMK (a, f), polymerized actin fibers stained by Texas red-phalloidin (b, g), and colocalization of active caspase-3-like and polymerized actin fibers (c, h). N indicates nucleus localization. Magnification  $\times 630$ . Bars=5  $\mu$ m. Line graphs are semiquantitative analysis of actin fiber organization, which was appreciated as fluorescence pixel intensity along a longitudinal axis line of cells. Control cells exhibit regular oscillations between high- and low-fluorescence intensities, representative of well-organized sarcomeres, which were not present in cells isolated from endotoxin-treated rats. Arrow on graph represents space without actin fibers. Bar graphs represent percentage of cells displaying destroyed sarcomeres. One hundred fifty cells obtained from 6 rats in each group were analyzed. Black pattern represents altered sarcomeres; white pattern, well-organized sarcomeres. Bottom, Confocal visualization of  $\alpha$ -actinin staining (d, i). Cells isolated from control and endotoxin-treated rats present the same well-organized pattern displayed on line graphs. Troponin T confocal visualization (e, j) is shown. Cells isolated from endotoxin-treated rats displayed a hazy structure associated with a low fluorescence intensity that is not observed in control cells. B, Western blotting of caspase-3,  $\alpha$ -actinin, and troponin T.  $\alpha$ -Actinin was not altered by rat treatment. Active caspase-3 (17 kDa) was detected on cells isolated from endotoxin-treated rats. Troponin T (41 kDa) was cleaved in a 32-kDa fragment in cells obtained from septic rats. C, Cells isolated from endotoxin-treated rats present a lower cell shortening than control cells. \* $P < 0.01$  vs control.



**Figure 3.** zVAD.fmk prevents caspase activation. **A**, Detection of active caspase-3 by immunohistochemistry on heart sections. Positive cells are detected in endotoxin-treated rat heart (arrows) but not in control or endotoxin+zVAD.fmk-treated rats. Magnification  $\times 400$ . Bars =  $40 \mu\text{m}$ . **B**, DEVDase, IETDase, and LEHDase activities of LV cardiomyocytes. Data represent percentage of fluorescence intensity of control cells (results are mean  $\pm$  SEM of 6 experiments;  $*P < 0.01$ ). **C**, Semiquantitative analysis of phalloidin staining. White pattern indicates that less than one third of cell area was composed of altered sarcomeres (no alterations); striped pattern, less than two thirds (moderate alterations); and black pattern, more than two thirds (major alterations) ( $n = 6$  in each group; 150 cells were analyzed per isolation).

LV cardiomyocyte contractile reserve was further studied by increasing extracellular  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  from 0.5 to 3.0 mmol/L at a constant pacing frequency of 1 Hz. Diastolic length decreased slightly, but there were no differences among the groups (Figure 5A). In control LV cardiomyocytes, fractional cell shortening increased in response to the increased  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  (Figure 5B). In contrast to control LV cardiomyocytes, fractional cell shortening was severely depressed in septic LV cardiomyocytes, which was prevented by zVAD.fmk rat treatment (Figure 5B).

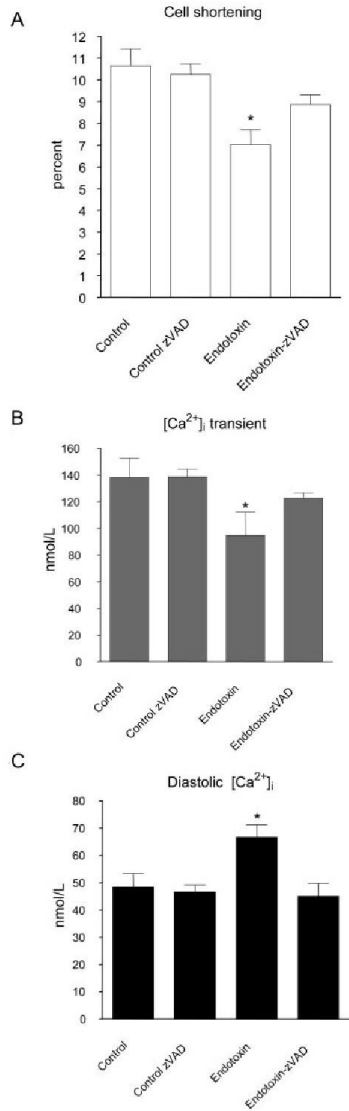
To assess myofilament response to  $\text{Ca}^{2+}$  in single LV cardiomyocytes, a repetitive electric tetanization technique (10 Hz; 10 to 20 s) was used in thapsigargin ( $2 \mu\text{mol/L}$ )-treated cells, as previously described.<sup>16</sup> In the setting of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibition by thapsigargin, this procedure results in reproducible maintained elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  during tetanic shortening, thus allowing as-

essment of a steady state relation between shortening and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in intact cells. Compared with control LV cardiomyocytes, the relationship between tetanic elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and fractional shortening was shifted rightward in septic LV cardiomyocytes, which suggests reductions in myofilament response to  $\text{Ca}^{2+}$ . Reductions in myofilament response to  $\text{Ca}^{2+}$  were largely prevented in septic LV cardiomyocytes isolated from rats treated with zVAD.fmk (Figure 5C).

#### In Vitro Effects of Serum From Endotoxin-Treated Rats on Cardiomyocyte Contractile Function, Caspase-3-Like Activity, and Troponin T

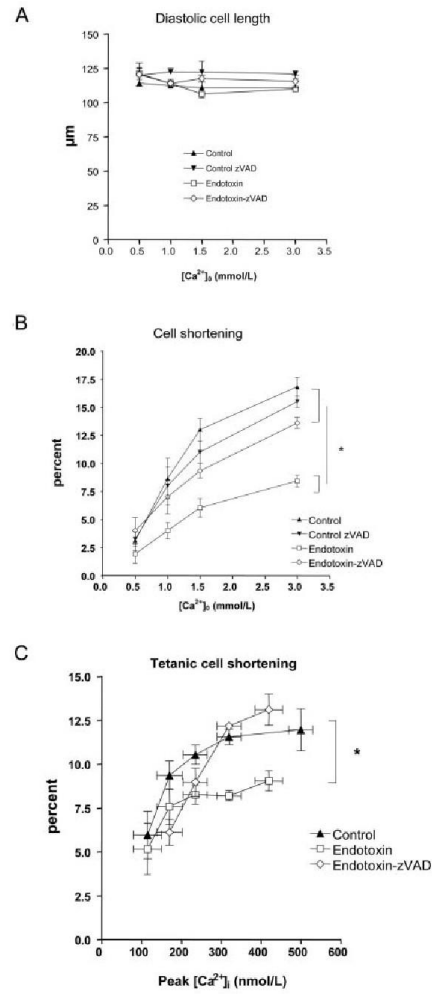
In vitro serum treatment had no effects on LV cardiomyocyte cell death (trypan blue exclusion and Hoechst 33342 staining; data not shown). Exposure of control LV cardiomyocytes with serum of endotoxin-treated rats induced sustained depression of fractional shortening (Figure 6A) and calcium





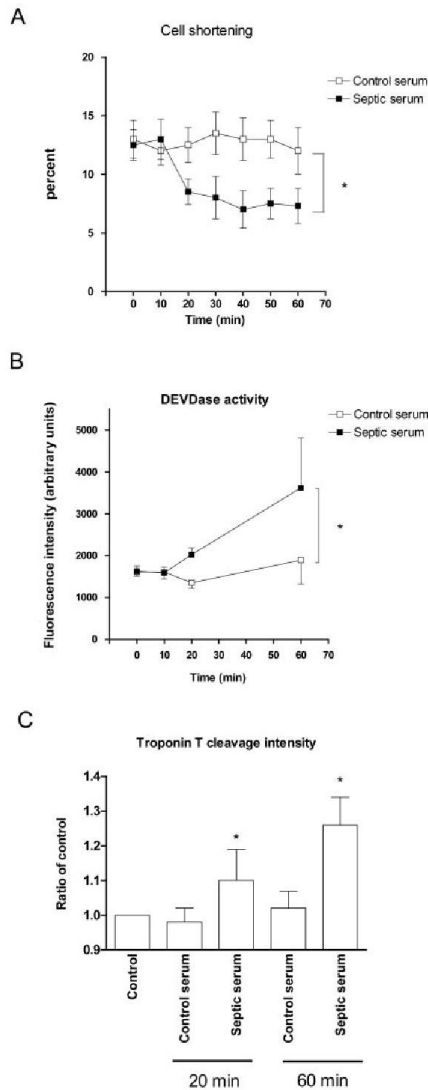
**Figure 4.** Effects of rat treatment on cardiomyocyte function. In each experiment, LV cardiomyocytes were isolated from control, zVAD.fmk-, endotoxin-, or endotoxin+zVAD.fmk-treated rats (n=6 in each group). Results are mean±SEM of 72 cells; \*P<0.01 vs control. A, Fractional shortening; B, calcium transient, and C, diastolic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of LV cardiomyocytes.

transient (data not shown) starting at 20 minutes, whereas control serum had no effect. Septic serum induced progressive increases in LV cardiomyocyte caspase-3-like activity (Figure 6B) and troponin T cleavage (Figure 6C), whereas control serum had no effect.

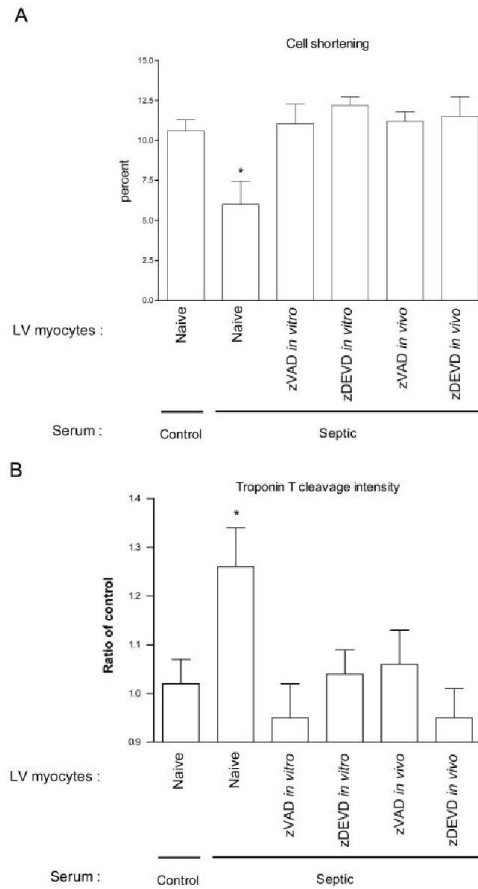


**Figure 5.** Effects of rat treatment on Ca<sup>2+</sup>-dependent contractile reserve. In each experiment, LV cardiomyocytes were isolated from control, zVAD.fmk-, endotoxin-, or endotoxin+zVAD.fmk-treated rats. Results are mean±SEM of 50 cells; n=6 rats in each group. Influence of extracellular calcium concentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> on diastolic cell length (A) and on cell shortening (B) is shown. C, Relationship between intracellular calcium concentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and tetanic cell shortening.

Serum from endotoxin-treated rats induced reductions in LV cardiomyocyte shortening (Figure 7A), calcium transient (data not shown), and increases in caspase-3-like activity (data not shown), and troponin T cleavage (Figure 7B). Serum from endotoxin plus zVAD.fmk or zDEVD.cmk had similar effects (data not shown). In contrast, these abnormalities were prevented in LV cardiomyocytes incubated (15 minutes) with caspase inhibitor (zVAD.fmk or zDEVD.cmk; 100 µmol/L) or



**Figure 6.** Effects of pooled serum (10%) obtained from control (n=6) or endotoxin-treated (n=6) rats on naive LV cardiomyocytes (n=6 cell isolations). A, Fractional shortening was measured on the same LV cardiomyocyte every 10 minutes for 1 hour after serum exposure. A total of 50 LV cardiomyocytes were evaluated. \* $P < 0.01$  vs control serum-treated cells. B, Caspase-3-like activity of LV cardiomyocytes treated for 0, 10, 20, or 60 minutes with serum. Data represent fluorescence intensity. Results are mean  $\pm$  SEM of 6 experiments; \* $P < 0.01$  vs control serum-treated cells. C, Intensity of 32-kDa fragment troponin T of naive LV cardiomyocytes treated for 20 and 60 minutes with 10% serum. Data represent ratio of control (results are mean  $\pm$  SEM of 6 experiments; \* $P < 0.01$  vs control serum-treated cells).



**Figure 7.** Effects of caspase inhibitor treatments (zVAD.fmk and zDEVD.cmk), both *in vivo* and *in vitro*, on septic serum (10%, 60 minutes)-induced fractional cell shortening and troponin T cleavage. A, LV cardiomyocytes and cell shortening. Results are mean  $\pm$  SEM of 50 cells (n=6 rats in each group; \* $P < 0.01$  vs control serum-treated cells). B, Troponin T (32 kDa) fragment intensity. Data represent ratio of control (results are mean  $\pm$  SEM of 6 experiments; \* $P < 0.01$  vs control serum-treated cells).

isolated from caspase inhibitor (zVAD.fmk or zDEVD.cmk; 3 mg/kg body wt)-treated rats (Figure 7A, 7B).

Exposure (60 minutes) of LV cardiomyocytes to 100 and 500 ng/mL endotoxin had no effects on cell viability, fractional cell shortening, caspase-3-like activity, and troponin T (Table).

### Discussion

Myocardial dysfunction encountered in septic shock has been attributed to either the cardiodepressive properties of circulating cytokines<sup>10</sup> or the impairment of cardiac regional perfusion, and endotoxin may act as a causative agent in both settings.<sup>4-6</sup> The present study suggests the new finding that

**Effects of Lipopolysaccharide (60 Minutes) on LV Myocyte Viability, Cell Shortening, Caspase-3-Like Activity, and Troponin T Cleavage**

	Control	Lipopolysaccharide 100 ng/mL	Lipopolysaccharide 500 ng/mL
Trypan blue exclusion, %	79±2	80±5	80±3
Cell shortening, %	10.4±2.2	9.8±1.8	10.0±2.5
DEVDase activity, fluorescence intensity	1565±162	1583±217	1724±139
Troponin T cleavage	Not detected	Not detected	Not detected

caspase-3 activation plays an important role in endotoxin-induced cardiomyocyte dysfunction, which may be related to changes in calcium myofilament response, contractile protein cleavage, and sarcomere disorganization.

Caspase activation has been implicated in contractile dysfunction of various models of myocardium injury.<sup>15,17,18</sup> In these models, contractile dysfunction was not associated with elevated LV cardiomyocyte end-stage nuclear apoptosis.<sup>18</sup> Consistently, we observed that in vivo endotoxin treatment induced LV cardiomyocyte caspase-3 activation, without major terminal apoptosis.<sup>13</sup> Both death receptor- and mitochondrial-related factors represent possible upstream pathways that would regulate effector caspase activation. These results are consistent with previous studies showing activation of whole heart multiple caspases in response to sepsis.<sup>9,11-13</sup> Along with cardiomyocyte caspase-3 activation, endotoxin treatment induced major reduction of contractile function with troponin T cleavage and sarcomere disarray. Endotoxin also produced alterations in myofilament Ca<sup>2+</sup> response,<sup>16,19</sup> which may participate in the septic myocardial dysfunction. Importantly, functional and morphological alterations of septic cardiomyocytes were prevented by caspase inhibitor zVAD.fmk, suggesting that caspase-3 activation may underlie, at least part, cardiomyocyte contractile dysfunction and calcium homeostasis perturbations. Beneficial effects of caspase inhibition could not be related to changes in TNF- $\alpha$  production because zVAD.fmk did not prevent endotoxin-induced increases in serum and heart TNF- $\alpha$  levels. These results are, however, consistent with studies indicating that caspase activation may directly alter myofibrillar structure and calcium pumps and channels.<sup>20,21</sup>

Next, we evaluated the effects of caspase inhibitors on naive cardiomyocytes exposed to septic serum to test potential changes in host immune response and noncardiomyocyte cells associated with caspase inhibitor treatments.<sup>7,8</sup> Consistent with studies in which similar in vitro models were used,<sup>4,6</sup> we observed that septic serum induced cardiomyocyte dysfunction in the absence of detectable endotoxin levels. Any direct endotoxin effects on LV myocyte structures and functions were further excluded in our in vitro series of experiments.

Septic sera induced cardiomyocyte caspase-3 activation, troponin T cleavage, and contractile dysfunction, which were prevented by the use, both in vivo and in vitro, of zVAD.fmk, a pan-caspase inhibitor, and zDEVD.cmk, a specific caspase-3-like inhibitor.<sup>22,23</sup>

In contrast, no beneficial effects on LV myocyte structures and functions were observed when serum obtained from

endotoxin- and zVAD.fmk-treated rats was used. This is consistent with either high cell permeability and serum short half-life<sup>24,25</sup> or absence of effects on immune response of small peptide caspase inhibitors. Caspase-3-like activation can be directly responsible for septic serum-induced cardiomyocyte contractile dysfunction. This contention is supported by the novel findings that caspase-3 may have a role in regulating cardiac contractility and that its inhibition may be associated with reversible states of depressed contractility.<sup>26</sup> In addition, similar results emerged from studies showing that contractile performance and sarcomere disarray of failing ventricular myocytes can be corrected via caspase inhibition.<sup>17,18</sup> Many putative caspase cleavage sites in cardiac contractile and structural proteins may be identified through databank research with caspase cleavage motifs. Additionally, exposure of myofibrillar proteins to activated caspase-3 results in  $\alpha$ -actin,  $\alpha$ -actinin, troponin T,<sup>15</sup> and myosin light chain<sup>27</sup> cleavage. In our model of sepsis, cardiomyocytes isolated from endotoxin-treated rats displayed troponin T cleavage and sarcomere disorganization, which were prevented by the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD.fmk. Although these observations do not demonstrate a causal link, breakdowns of cardiac myofilament components and sarcomere disorganization induced by caspase activation suggest an important interrelationship between caspase activation and functional reserve in cardiomyocytes.

In summary, the results show an important relationship between effector caspase-3 activation and functional contractile reserve in cardiomyocytes in a rat endotoxin model of sepsis. Targeting caspases in cardiomyocytes may be beneficial not only for cardiomyocyte function but also for myocardial depression of sepsis.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from Fondation de l'Avenir pour la recherche médicale appliquée (ET1-306, 2001) and INSERM (Biologie et pathologie des régulations cellulaires). U459 and EA 2689 belong to IFR 114 IMPRT (CHU, COL, INSERM, IRCL, Université Lille 2). S. Lancel is supported by grants from of Ministère de l'éducation nationale, de la recherche, et de la technologie MENRT 3857-2002.

### References

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001; 29:1303-1310.
2. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348:138-150.
3. Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, Damske BA, Parrillo JE. Profound but reversible myo-

- cardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med.* 1984; 100:483–490.
4. Kumar A, Haery C, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin.* 2000;16:251–287.
  5. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med.* 1989;321:280–287.
  6. Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. 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.* 1985;76:1539–1553.
  7. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:14541–14546.
  8. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol.* 2000;1:496–501.
  9. McDonald TE, Grinman MN, Carthy CM, Walley KR. Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts. *Am J Physiol.* 2000;279:H2053–H2061.
  10. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol.* 1998; 274:R577–R595.
  11. Fauvel H, Marchetti P, Chopin C, Formstecher P, Neviere R. Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis. *Am J Physiol.* 2001;280:H1608–H1614.
  12. Fauvel H, Marchetti P, Obert G, Joulin O, Chopin C, Formstecher P, Neviere R. Protective effects of cyclosporin A from endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:449–455.
  13. Neviere R, Fauvel H, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P. Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:218–225.
  14. Gomez AM, Kerfant BG, Vassort G. Microtubule disruption modulates Ca<sup>2+</sup> signaling in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 2000;86:30–36.
  15. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:6252–6256.
  16. Tavernier B, Li JM, El-Omar MM, Lanone S, Yang ZK, Trayer IP, Mebazaa A, Shah AM. Cardiac contractile impairment associated with increased phosphorylation of troponin I in endotoxemic rats. *FASEB J.* 2001;15:294–296.
  17. Laugwitz KL, Moretti A, Weig HJ, Gillitzer A, Pinkernell K, Ott T, Pragst I, Stadele C, Seyfarth M, Schomig A, Ungerer M. Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium. *Hum Gene Ther.* 2001;12:2051–2063.
  18. Ruetten H, Badorff C, Ihling C, Zeiher AM, Dimmeler S. Inhibition of caspase-3 improves contractile recovery of stunned myocardium, independent of apoptosis-inhibitory effects. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38: 2063–2070.
  19. Yasuda S, Lew WY. Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and  $\beta$ -adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca<sup>2+</sup> in cardiac myocytes. *Circ Res.* 1997;81:1011–1020.
  20. Hirota J, Furuichi T, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is a substrate for caspase-3 and is cleaved during apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *J Biol Chem.* 1999;274:34433–34437.
  21. Schwab BL, Guerini D, Didszun C, Bano D, Ferrando-May E, Fava E, Tam J, Xu D, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Carafoli E, Nicotera P. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.* 2002;9:818–831.
  22. Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 1999;6:1081–1086.
  23. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem.* 1998;273:32608–32613.
  24. Fletcher DS, Agarwal L, Chapman KT, Chin J, Egger LA, Limjuco G, Luell S, MacIntyre DE, Peterson EP, Thornberry NA, et al. A synthetic inhibitor of interleukin-1 beta converting enzyme prevents endotoxin-induced interleukin-1 beta production in vitro and in vivo. *J Interferon Cytokine Res.* 1995;15:243–248.
  25. Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P. Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J Exp Med.* 1996;184:2067–2072.
  26. Condorelli G, Roncarati R, Ross J Jr, Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C, Croce CM. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:9977–9982.
  27. Moretti A, Weig HJ, Ott T, Seyfarth M, Holthoff HP, Grewe D, Gillitzer A, Bott-Flugel L, Schomig A, Ungerer M, Laugwitz KL. Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11860–11865.



## **8.2 Article 2 : Cytokine Profile of Human Septic Shock Serum Inducing Cardiomyocyte Contractile Dysfunction, Physiological Research 2007**

Comme démontré dans la publication précédente, la dépression myocardique du sepsis peut être induite par un médiateur circulant. Bien que cette hypothèse soit évoquée depuis de nombreuses années dans la littérature, l'identité de ce facteur dépresseur myocardique circulant n'est pas encore établie. Le TNF- $\alpha$  et IL1- $\beta$  ont montré leur capacité à entraîner isolément ou conjointement une défaillance myocardique. L'implication du NO comme facteur circulant a également été évoquée.

Le but de ce travail a été de reproduire, avec des sérums de patients en choc septique, les données obtenues précédemment avec des sérums de rats endotoxémiques. Nous avons également recherché des arguments afin de mieux caractériser ce ou ces facteurs dépresseurs myocardiques circulants.

Après avoir prélevé du sérum à dix patients de réanimation présentant un choc septique et dix autres patients non septique. Nous avons mesuré, sur des préparations de cardiomyocytes isolés de rats, l'effet sur la contractilité de l'exposition à ces sérums. Nous avons également cherché si les sérums de patients en choc septique présentaient une modification de leur profil cytokinique et si ils présentaient une augmentation des métabolites du NO : les nitrites et nitrates.

Ce travail confirme le pouvoir dépresseur sur la contractilité du sérum de patients en choc septique. Nous n'avons pas constaté d'augmentation de TNF- $\alpha$  et IL1- $\beta$  dans ces sérums. De même nous n'avons pas constaté d'augmentation des métabolites du NO. Nous avons par contre retrouvé des taux élevés d'IL-6, IL-8 et IL-10 comparé aux sérums témoins.

La dysfonction a donc été induite dans cette expérimentation par d'autres substances. L'IL-6 a déjà été rapporté comme pouvant induire une altération de la fonction contractile. La présence dans les sérums étudiés de taux élevés d'interleukine-6 (IL-6) et de taux inchangés de TNF- $\alpha$  et IL1- $\beta$  est un élément en



faveur de l'implication d'IL-6 dans notre modèle. TNF- $\alpha$  et IL1- $\beta$  sont des cytokines d'apparition précoce dans la réaction inflammatoire, les patients chez qui les sérums ont été prélevés étaient hospitalisés en réanimation et cela implique un délai entre l'apparition du sepsis et le moment du prélèvement. Nous ne nions pas l'implication de ces cytokines dans l'induction de la dysfonction myocardique septique mais nous avançons ici des arguments évoquant la possibilité qu'à une phase plus tardive du sepsis cette dysfonction puisse être induite par d'autres cytokines.

## Cytokine Profile of Human Septic Shock Serum Inducing Cardiomyocyte Contractile Dysfunction

O. JOULIN<sup>1</sup>, P. PETILLOT<sup>2</sup>, M. LABALETTE<sup>3</sup>, S. LANCEL<sup>1,4</sup>, R. NEVIERE<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>EA 2689, IMPRT-IFR 114, Lille University, <sup>2</sup>Department Anesthésie Réanimation (DAR 2), CHRU de Lille, Faculté de Médecine de Lille, <sup>3</sup>Service d'Immunologie, CHRU de Lille, Faculté de Médecine de Lille, <sup>4</sup>Department of Physiology, IMPRT-IFR 114, University of Lille, France

Received January 18, 2006

Accepted April 5, 2006

On-line available June 22, 2006

---

### Summary

This study was designed to measure nitrite/nitrate and cytokine levels of serum obtained from septic shock patients and to describe potential depressant effects of human septic serum on rat cardiomyocytes. Serum was prepared from 10 non-septic patients and 10 patients with documented septic shock. Adult rat ventricular myocytes were exposed to 20 % serum in the medium. Cardiomyocyte contractility was assessed by measuring shortening fraction and shortening velocity. Serum levels of nitrite/nitrate, a marker of nitric oxide final metabolites, and cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL) 1 $\beta$ , 6, 10, 8 and 12p70) were measured. Compared with serum from non-septic patients, serum of septic shock patients induced rapid reduction of the extent and velocity of shortening in isolated cardiomyocytes. Nitrite/nitrate, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-12p70 concentrations of tested serum for cardiomyocyte studies were not increased in septic serum compared with controls. In contrast, septic serum that induced a depression of *in vitro* contractility, had increased levels of IL-6, IL-8 and IL-10. We can conclude that the depression of *in vitro* contractility induced by septic serum is not directly dependent on elevated levels of nitric oxide metabolites, TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . Our results support the view that other cytokines, including IL-6, IL-8 and IL-10, are potent circulating mediators of myocardial depression in cardiomyocytes.

---

### Key words

Heart dysfunction • Tumor necrosis factor • Interleukin • Sepsis • Cell shortening

### Introduction

Endotoxin, or bacterial lipopolysaccharide, elicits a cascade of pro and anti-inflammatory cytokine responses which may induce myocardial contractility depression both in laboratory animals and human sepsis. In this context, myocardial dysfunction is a consistent and important feature of septic shock and contributes to

the high mortality rate associated with this disorder (Court *et al.* 2002, Krishnagopalan *et al.* 2002). Although sepsis-induced myocardial depression is a well defined entity in the clinical literature, the cellular basis for this reduction in contractility is still poorly understood. Myocardial dysfunction does not appear to be due to myocardial hypoperfusion (Kumar *et al.* 2000) but rather due to circulating depressant factors, including cytokine

---

PHYSIOLOGICAL RESEARCH

© 2007 Institute of Physiology v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic  
E-mail: physres@biomed.cas.cz

ISSN 0862-8408

Fax +420 241 062 164  
<http://www.biomed.cas.cz/physiolres>

tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$  (Parrillo *et al.* 1985, Kumar *et al.* 2003). At a cellular level, reduced myocardial contractility seems to be induced by both nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent mechanisms. Indeed, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  alter myocardial function *via* a cascade of intracellular events, which includes activation of neutral sphingomyelinase and nitric oxide pathways, suppression of the calcium transient, mitochondrial dysfunction, and apoptosis (Parker 1998, Levy and Deutschman 2004).

During human septic shock, circulating myocardial depressant substances that directly alter *in vitro* cardiomyocyte contractility has been described (Lefer 1979, Parrillo *et al.* 1985, Kumar *et al.* 1996, Pathan *et al.* 2002, 2004). For example, elevated serum concentrations of TNF- $\alpha$  (alone or in association with IL-1 $\beta$ ) (Lefer 1979, Pathan *et al.* 2002, 2004) and nitric oxide metabolites (Parker 1998, Levy and Deutschman 2004) that cause cardiomyocyte depression *in vitro* are found during human sepsis. In addition, removal of TNF- $\alpha$  by monoclonal antibodies and immunoabsorption of IL-1 $\beta$  partially neutralizes cardiac myocyte depressant activity of human septic serum. However, extensive characterization of multiple cytokine concentrations and pathological production of nitric oxide of septic serum that induces *in vitro* cardiac depression are not readily available.

The major goal of our study was to test whether septic serum that induces reductions in cardiomyocyte contractile function has elevated pro- and anti-inflammatory cytokine concentrations and nitrite/nitrate levels. Altogether our results show that septic serum which induced major reductions in cardiomyocyte cell shortening had no increased levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and nitrite/nitrate. In sharp contrast, IL-6, IL-8 and IL-10 levels were increased in septic serum compared with the control serum.

## Methods

### Patients

After ethical committee approval and written informed consent from the legal representatives, 10 patients suffering from septic shock along with 10 control patients with non-septic chronic obstructive pulmonary disease were enrolled in this pilot study. Patients fulfilled the clinical and laboratory criteria of septic shock as outlined in the 1992 Consensus Conference. Exclusion criteria were age <18 years, pregnancy, patients who have

had surgery within 48 h before inclusion and patients who have had cardiac surgery and neurosurgery. Patients with an acute history of severe cardiac insufficiency (New York Heart Association class III-IV) and coronary artery disease before the development of septic shock were also excluded. The rationale for this was to omit myocardial congestive failure as a confounding factor of serum-induced cardiomyocyte contractile depression.

On intensive care unit (ICU) admission, standard volume resuscitation combined with inotropic/vasopressor support was used to maintain the systolic arterial pressure above 90 mm Hg. All patients received mechanical ventilation. Assessment of left ventricular (LV) systolic function by echocardiography revealed a markedly hypokinetic LV (mean LV ejection fraction:  $39 \pm 17$  %). Blood samples were withdrawn within the first hours after patient ICU admission. Venous blood was collected on admission into a 10 ml sterile plain tube before administration of any medications and stored at  $-80$  °C until use. Before assay, all samples were thawed to room temperature and mixed by gentle swirling. All serum samples were assayed on the same day to avoid inter-assay variation.

### Biological assays for nitrite/nitrate and cytokine concentrations

Nitrite/nitrate levels, an indicator of nitric oxide (NO) synthesis, were measured. First, nitrate in serum were reduced to nitrite by adding nitrate reductase (25 mU/ml; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and NADPH (200  $\mu$ M; Calbiochem) at room temperature. After 3 h, samples were deproteinized by adding a solution of ZnSO<sub>4</sub> 30 %, and 15 min later, samples were centrifuged at 2000  $\times$ g for 10 min. Nitrite concentration in the samples was measured by the Griess reaction: 100  $\mu$ l of Griess reagent (0.1 % naphthalethylenediamine dihydrochloride in H<sub>2</sub>O and 1 % sulfanilamide in 5 % concentrated H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; vol 1:1; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) were added to 100  $\mu$ l of supernatants. The optical density at 550 nm (OD 550) was measured using a microplate reader. Nitrate concentrations were calculated by comparison with OD 550 of standard solutions of sodium nitrite (Lancel *et al.* 2004).

Multiplex bead kits (Human Inflammation Kit, BD™ Cytometric Bead Array were purchased from Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, USA). Cytokines analyzed in duplicate by each kit included tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10

(IL-10) and interleukin-12 (IL-12p70). Each multiplex assay was performed in duplicate according to the manufacturers' specifications. Standard curves for each cytokine were generated by using the reference cytokine concentrations supplied by the manufacturer. To obtain concentration values, raw data (mean fluorescent intensity) were analyzed as recommended by BD™ Cytometric Bead Array, Becton Dickinson Company.

#### *Left ventricle cardiomyocyte contractile function*

Rat experiments were conducted in accordance with the National and European Institutes of Health guidelines for the use of laboratory animals and were approved by Lille University Ethic Committee. Freshly isolated cells were prepared from ventricles of Sprague-Dawley rats (Lancel *et al.* 2005). Hearts were perfused through the aorta for 5 min with a nominally calcium-free modified Krebs-Henseleit (KH) buffer (in mmol/l: NaCl 120, KCl 4.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, and glucose 11) after which the buffer was changed to one containing 0.1 % of collagenase type II (Worthington, Lakewood, NJ, USA) and 0.01 % of protease type XIV (Sigma St, Quentin Fallavier, France). The cells were separated on a Percoll gradient and plated in dishes to a concentration of 10<sup>5</sup> cells/ml. Cells were stored at 37 °C and used within 3 h after isolation. Cell viability (> 85 %) was assessed by the Trypan blue exclusion test on about 100 cells.

Primary cultured adult rat ventricular myocytes were placed in the perfusion chamber (Krebs-Henseleit Ca<sup>2+</sup> 1.8 mmol/l) on the thermo regulated (30 °C) stage of a Nikon Eclipse E 800 microscope (Nikon, Paris, France) and then stimulated to contract (5 ms square pulse, voltage-adjusted to maximize capture) at 1 Hz (Grass S48, Grass Instrument Division, Astro-Med, Trappes, France). The steady-state contractions were recorded and digitized at a rate of 256 Hz. Edge-detection algorithms allowed derivation of contractile parameters (IonOptix, Milton, MA, USA). Measurements from 12 steady-state contractions were averaged for each cell (Lancel *et al.* 2005). Primary cultured adult rat ventricular myocytes were incubated in standard growth media consisted of Medium 199 (calcium 1.8 mM) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) supplemented with insulin (10 mg/ml), L-carnitine (20 mM), creatine (50 mM), taurine (50 mM), penicillin and streptomycin (Sigma, St. Quentin Fallavier, France). Test media used 20 % human serum of either control or septic shock patients. Measurements of maximum extent and peak velocity of

cardiomyocyte shortening were obtained every 5 min for 60 min.

#### *Statistical analysis*

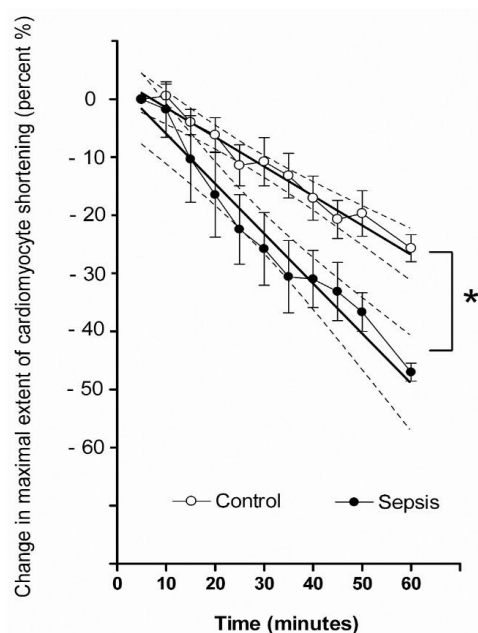
By comparing the maximum extent and peak velocity of shortening at each 10-min interval to the baseline value, changes were compared to initial contractility. Data for the change in maximum extent and peak velocity of cardiomyocyte shortening (percentage change from baseline) were pooled and plotted as a function of time for each control and septic shock serum. Linear regression analysis was utilized to fit a line for each resulting plot. Slopes of lines for control and septic shock serum were compared by a two-tailed Student's *t*-test to determine whether these slopes were significantly different. In this manner, increased depressant activity was indicated by a more negative value for slope of the regression line (Kumar *et al.* 1999). All other analyses used ANOVA procedures where appropriate. When a significant difference was found, we identified specific differences between groups using a sequentially rejective Bonferroni procedure. After application of the Bonferroni correction, significance was evaluated with *P*<0.05 for comparisons.

## **Results**

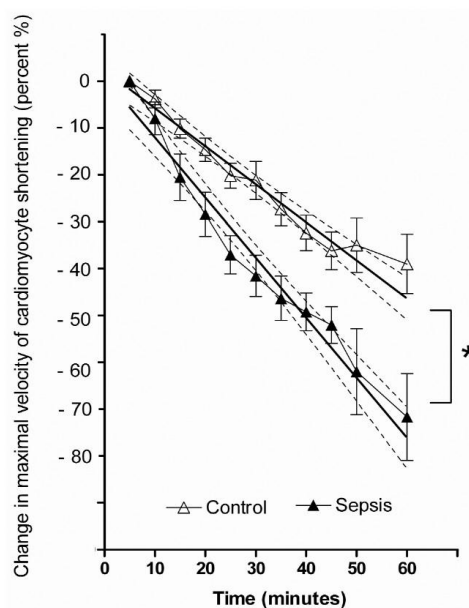
Ten septic shock patients were included with the diagnosis of peritonitis (4 patients), pneumonia (4 patients) and soft tissue infection (2 patients). Severity of disease was measured by Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II and Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) scores at admittance, averaging 22±7 and 10.3±4.7, respectively. Ten non-septic patients with no signs of sepsis served as controls. Non septic patients were admitted in ICU for acute respiratory failure in the context of chronic obstructive pulmonary disease (APACHE II score 17±9).

Changes in maximum extent and velocity of myocardial cell shortening as a function of time after exposure to either 20 % control or septic shock patient serum are presented in Figures 1 and 2. In each case, 20 % serum from septic shock patients caused significant depression of both extent (Fig. 1) and velocity (Fig. 2) of shortening compared with controls.

On the basis of week to week analysis using different LV cardiomyocyte isolations, we confirmed that control serum induced minimal cardiomyocyte contractile effects whereas septic shock serum consistently reduced



**Fig. 1.** Changes in maximum extent of myocardial cell shortening as a function of time. Data for the change in maximum extent cardiomyocyte shortening (percentage change from baseline) are pooled and plotted as a function of time after incubation with 20 % serum of control patient (n=10) and septic shock patients (n=10). Linear regression analysis was used to fit a line for each resulting plot. Slopes of changes for serum of control and septic shock patients were statistically different by two-tailed Student's t-test; \* P<0.01. Data are means  $\pm$  S.D.



**Fig. 2.** Changes in maximum velocity of myocardial cell shortening as a function of time. Data for the change in maximum velocity cardiomyocyte shortening (percentage change from baseline) are pooled and plotted as a function of time after incubation with 20 % serum of control patient (n=10) and septic shock patients (n=10). Linear regression analysis was used to fit a line for each resulting plot. Slopes of changes for serum of control and septic shock patients were statistically different by two-tailed Student's t-test; \* P<0.01. Data are means  $\pm$  S.D.

contractile function (data not shown).

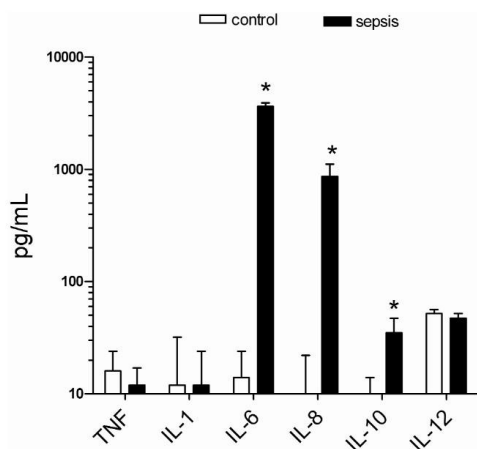
There were no differences in nitrite/nitrate levels between serum of controls and septic shock patients ( $22 \pm 8$  vs  $24 \pm 12$   $\mu\text{mol/l}$ ). Serum cytokine concentrations of controls and septic shock patients are presented in Figure 3. We mainly observed that in septic serum, inducing reductions in cardiomyocyte cell shortening, IL-6, IL-8 and IL-10 levels were increased compared with control serum. Control and septic serum had similar concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

## Discussion

The objective of our study was to test whether septic sera that induce reductions in cardiomyocyte contractile function has elevated pro and anti-inflammatory cytokine and nitrite/nitrate concentrations. Our results indicate that the septic serum, which induced reductions in cardiomyocyte cell shortening, had no

increased levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and nitrite/nitrate. On the contrary, IL-6, IL-8, and IL-10 levels in septic serum were increased, which could play a role in septic serum-induced cardiomyocyte cell shortening depression. Although no direct link between cardiomyocyte contractile function and serum cytokine levels was tested, we believe that our experiments are important for designing further studies of the role of cytokines such as IL-6, IL-8 and IL-10 in the pathophysiology of endotoxin-induced myocardial depression.

A wide range of circulating inflammatory mediators have been reported to induce myocardial depressant activity both in isolated cardiomyocytes and in the whole heart (Natanson *et al.* 1989, Kapadia *et al.* 1995). These include proinflammatory cytokines and nitric oxide pathway metabolites (Kumar *et al.* 2000, 2003, Court *et al.* 2002, Krishnagopalan *et al.* 2002). Sizing of the circulating myocardial depressant factor estimated by gel filtration suggests a molecular weight of



**Fig. 3** Cytokine concentrations in serum of control and septic shock patients. Concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF), interleukin-1 $\beta$  (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10) and interleukin-12 p70 (IL-12) were measured in the serum by the use of multiplex assay. Y axis is given in  $\log_{10}$  cytokine concentrations. Results were analyzed by ANOVA procedures. After application of Bonferroni correction, significance was achieved with \*  $P < 0.01$  for comparisons. Data are means  $\pm$  S.D.

10–25 kDa, similar to the expected molecular weight of TNF- $\alpha$  (17 kDa) and other proinflammatory cytokines including IL-1 $\beta$  (Parrillo *et al.* 1985, Reilly *et al.* 1989, Kumar *et al.* 1999, Pathan *et al.* 2002, 2004, Kumar *et al.* 2003). Negative inotropic role of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  has been strengthened by the evidence that removal of TNF- $\alpha$  by monoclonal antibodies and immunoadsorption of IL-1 $\beta$  partially neutralize cardiomyocyte depressant activity of human septic serum (Parrillo *et al.* 1985). Results from previous studies strongly suggest that TNF- $\alpha$  alone or in association with IL-1 $\beta$  is critical for septic serum-induced cardiodepression. However, it should be noted that no extensive information on cytokine concentrations and other potent depressor mediators present in human septic serum was available in the above cited studies.

To the best of our knowledge, the present study is the first to report multiple cytokine and nitrite/nitrate concentrations in septic shock serum, which actually induces major reductions in cardiomyocyte contractile function. Surprisingly, there were no differences in TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and nitrite/nitrate levels between control and septic shock serum. These results raise the question of their implication in the observed reduction of contractile function of cardiomyocytes induced by septic serum. Indeed, the effects of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  on myocardial

function are not consistent with reports showing either increases, decreases or even no effects on cardiomyocyte contractile function (Finkel *et al.* 1992, Amadou *et al.* 2002, Cailleret *et al.* 2004, Pathan *et al.* 2004). Hence, other cytokines within sizing of myocardial depressant factor(s) could be implicated. For example, we found that concentration of IL-6 was markedly increased in serum of septic shock patients. Elevated serum IL-6 concentration could be responsible, at least in part, for myocardial depression as IL-6 has been shown to depress papillary muscle contraction and is negatively inotropic in cardiomyocyte cultures (Finkel *et al.* 1992, Kinugawa *et al.* 1994). In addition, myocardial depressant activity of serum from patients with meningococemia is completely removed by affinity-adsorption of interleukin 6, while immunoadsorption of TNF- $\alpha$  had no effects (Pathan *et al.* 2004). IL-6-induced decrease in cardiac contractility is mediated by rapid (5–10 min) activation of Janus kinase (JAK)2/signal transducers and activators of transcription (STAT)3 leading to nitric oxide production, reduced sarcoplasmic reticular function and concomitant decrease in the phosphorylation of phospholamban (Yu *et al.* 2005a,b).

Previous results suggested that IL-8 and IL-10 may be homeostatic regulators of hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular dysfunction in sepsis. Our results reveal that concentrations of IL-8 and IL-10 were markedly increased in the serum of septic shock patients and negatively alter cardiomyocyte contractile function. At this time, controversy exists over the role of these interleukins in sepsis. For example, IL-10 is considered to have both anti-inflammatory and immune suppressive effects and may be protective in models of endotoxemia whereas it seems to be deleterious in models of polymicrobial sepsis (Parsons 1998).

Several reports have linked increased production of the endogenous vasodilator nitric oxide to the occurrence of myocardial dysfunction during experimental septic shock (Kumar *et al.* 2000, Court *et al.* 2002, Krishnagopalan *et al.* 2002). Further evidence for a role of nitric oxide in septic shock is derived from several studies in humans showing elevated plasma concentrations of the nitric oxide bioreaction products, i.e. nitrite/nitrate (Gomez-Jimenez *et al.* 1995, De Werra *et al.* 1997, Strand *et al.* 2000, Mitaka *et al.* 2003, Soop *et al.* 2003). Although several studies of nitrite/nitrate plasma concentrations in human sepsis have showed elevated levels, a substantial fraction of patients with

septic shock and human volunteers exposed to endotoxin has plasma nitrite/nitrate concentrations within the normal range. In the present study, there were no differences in nitrite/nitrate levels between serum of controls and septic shock patients. Hence, based on the available literature and our own results, the hypothesis that nitric oxide metabolites are central mediators in cardiomyocyte dysfunction induced by the serum of septic shock patients can thus be questioned.

Several limitations may be found in our study. First, myocardial dysfunction in septic shock patients was established on the basis of non-invasive echocardiographic assessment. Only major reductions in left ventricular ejection fraction were used to define myocardial dysfunction. No correlation between reductions in left ventricular ejection fraction and effects of serum on cardiomyocyte contractile function was tested. Results from our study are only descriptive and no attempt was made to find a link between cardiomyocyte contractile function and serum cytokine levels has been achieved. However, our study supports the view that

cytokine(s) other than TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  may be implicated in septic serum-induced cardiomyocyte contractile depression. Based on the analysis of a cytokine panel that measures cytokine wide ranges, we choose to implicate IL-6 in myocardial depression in sepsis as this cytokine has been recently shown to impact heart function. Endogenous vasodilator nitric oxide has been linked to the occurrence of myocardial dysfunction during septic shock. Pathological production of nitric oxide was assessed by the means of nitrite/nitrate levels that may not accurately reflect nitric oxide metabolism *in vivo*. Also, cardiac toxicity of peroxynitrite, a reactive nitrogen species produced in presence of reactive oxygen species and nitric oxide, has not been directly tested herein.

In conclusion, results from our and other studies support to the view that interleukin 6 as a potent circulating mediator of myocardial depression in cardiomyocytes. Further efforts should be made to identify interleukin IL-6 is a plausible cause of myocardial dysfunction in sepsis.

## References

- AMADOU A, NAWROCKI A, BEST-BELPOMME M, PAVOINE C, PECKER F: Arachidonic acid mediates dual effect of TNF- $\alpha$  on  $Ca^{2+}$  transients and contraction of adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* **282**: C1339-C1347, 2002.
- CAILLERET M, AMADOU A, ANDRIEU-ABADIE N, NAWROCKI A, ADAMY C, AIT-MAMAR B, ROCARIES F, BEST-BELPOMME M, LEVADE T, PAVOINE C, PECKER F: N-acetylcysteine prevents the deleterious effect of tumor necrosis factor-( $\alpha$ ) on calcium transients and contraction in adult rat cardiomyocytes. *Circulation* **109**: 406-411, 2004.
- COURT O, KUMAR A, PARRILLO JE, KUMAR A: Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* **6**: 500-508, 2002.
- DE WERRA I, JACCARD C, CORRADIN SB, CHIOLERO R, YERSIN B, GALLATI H, ASSICOT M, BOHUON C, BAUMGARTNER JD, GLAUSER MP, HEUMANN D: Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med* **25**: 607-613, 1997.
- FINKEL MS, ODDIS CV, JACOB TD, WATKINS SC, HATTLER BG, SIMMONS RL: Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* **257**: 387-389, 1992.
- GOMEZ-JIMENEZ J, SALGADO A, MOURELLE, MARTIN MC, SEGURA RM, PERACAULA R, MONCADA S: L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit Care Med* **23**: 253-258, 1995.
- KAPADIA S, LEE J, TORRE-AMIONE G, BIRDSALL HH, MA TS, MANN DL: Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* **96**: 1042-1052, 1995.
- KINUGAWA K, TAKAHASHI T, KOHMOTO O, KOHMOTO O, SERIZAWA T, TAKAHASHI T: Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on  $[Ca^{2+}]_i$  and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ Res* **75**: 285-295, 1994.
- KRISHNAGOPALAN S, KUMAR A, PARRILLO JE, KUMAR A: Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Curr Opin Crit Care* **8**: 376-388, 2002.

- KUMAR A, THOTA V, DEE L, OLSON J, URETZ E, PARRILLO JE: Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$  are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* **183**: 949-958, 1996.
- KUMAR A, BRAR R, WANG P, DEE L, SKORUPA G, KHADOUR F, SCHULZ R, PARRILLO JE: Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* **276**: R265-R276, 1999.
- KUMAR A, HAERY C, PARRILLO JE: Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin* **16**: 251-287, 2000.
- KUMAR A, WOOD K, PARRILLO JE: Circulating substances and energy metabolism in septic shock. *Crit Care Med* **31**: 632-633, 2003.
- LANCEL S, TISSIER S, MORDON S, MARECHAL X, DEPONTIEU F, SCHERPEREEL A, CHOPIN C, NEVIERE R: Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol* **43**: 2348-2358, 2004.
- LANCEL S, JOULIN O, FAVORY R, GOOSSENS JF, KLUZA J, CHOPIN C, FORMSTECHEP P, MARCHETTI P, NEVIERE R: Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* **111**: 2596-2604, 2005.
- LEFER AM: Mechanisms of cardiodepression in endotoxin shock. *Circ Shock* **6** (Suppl 1): 1-8, 1979.
- LEVY RJ, DEUTSCHMAN CS: Evaluating myocardial depression in sepsis. *Shock* **22**: 1-10, 2004.
- MITAKA C, HIRATA Y, YOKOYAMA K, WAKIMOTO H, HIROKAWA M, NOSAKA T, IMAI T: Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome. *Shock* **19**: 305-309, 2003.
- NATANSON C, EICHENHOLZ PW, DANNER RL, EICHACKER PQ, HOFFMAN WD, KUO GC, BANKS SM, MACVITTIE TJ, PARRILLO JE: Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* **169**: 823-832, 1989.
- PARKER MM: Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in septic shock. *New Horiz* **6**: 130-138, 1998.
- PARRILLO JE, BURCH C, SHELHAMER JH, PARKER MM, NATANSON C, SCHUETTE W: 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, 1985.
- PARSONS PE: Interleukin-10: the ambiguity in sepsis continues. *Crit Care Med* **5**: 818-819, 1998.
- PATHAN N, SANDIFORD C, HARDING SE, LEVIN M: Characterization of a myocardial depressant factor in meningococcal septicemia. *Crit Care Med* **30**: 2191-2198, 2002.
- PATHAN N, HEMINGWAY CA, ALIZADEH AA, STEPHENS AC, BOLDRICK JC, ORAGUI EE, MCCABE C, WELCH SB, WHITNEY A, O'GARA P, NADEL S, RELMAN DA, HARDING SE, LEVIN M: Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet* **363**: 203-209, 2004.
- REILLY JM, CUNNION RE, BURCH-WHITMAN C, PARKER MM, SHELHAMER JH, PARRILLO JE: A circulating myocardial depressant substance is associated with cardiac dysfunction and peripheral hypoperfusion (lactic acidemia) in patients with septic shock. *Chest* **95**: 1072-1080, 1989.
- SOOP A, SOLLEVI A, WEITZBERG E, LUNDBERG JO, PALM J, ALBERT J: Exhaled NO and plasma cGMP increase after endotoxin infusion in healthy volunteers. *Eur Respir J* **21**: 594-599, 2003.
- STRAND OA, LEONE A, GIERCKSKY KE, KIRKEBOEN KA: Nitric oxide indices in human septic shock. *Crit Care Med* **28**: 2779-2785, 2000.
- YU X, CHEN Q, KENNEDY RH, LIU SJ: Inhibition of sarcoplasmic reticular function by chronic interleukin-6 exposure via iNOS in adult ventricular myocytes. *J Physiol Lond* **566**: 327-340, 2005a.
- YU X, LIU MG, KENNEDY RH, CHEN Q: Both cGMP and peroxynitrite mediate chronic interleukin-6-induced negative inotropy in adult rat ventricular myocytes. *J Physiol Lond* **566**: 341-353, 2005b.

---

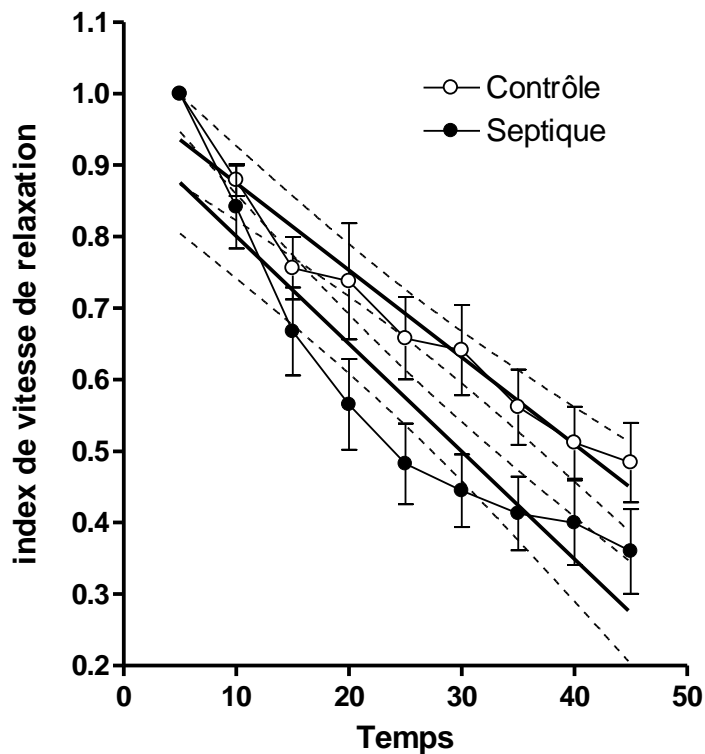
**Corresponding author**

Remi Neviere, Département de Physiologie, Faculté de Médecine 1, Place Verdun, Lille 59045 Lille Cedex; France.  
E-mail: rneviere@univ-lille2.fr



### 8.2.1 Résultats non publiés

Parallèlement aux résultats publiés dans cet article d'autres constatations ont été faites sur l'effet du sérum de patients en choc septique sur la fonction contractile des cardiomyocytes. Nous avons mesuré une diminution de la vitesse de relaxation des cardiomyocytes (Figure 52).



**Figure 52: Effet du plasma de patients septiques sur l'index de vitesse de relaxation**  
Les droites de régression sont tracées avec leurs intervalles de confiance à 95%. \* :  $p < 0,05$ .

Lors des stimulations répétées des préparations de cardiomyocytes isolés, les premières contractions des cellules semblaient très différentes dans leur force et leur rapidité avant d'atteindre un « rythme de croisière ». Jusqu'à cette publication nous utilisions une fréquence de stimulation de 1Hz retrouvée dans la littérature afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux des autres équipes. Cette observation nous a fait nous interroger sur l'effet des contractions précédentes sur les suivantes et plus

largement sur l'effet de la fréquence de stimulation. Nos observations auraient-elles été similaires à des fréquences plus proches des fréquences physiologiques ?

Le choc septique étant caractérisé par une tachycardie intense et les observations que nous avons effectuées d'une altération de la contractilité mais également de la relaxation myocardique. Les mécanismes d'adaptation cardiaque à la fréquence nous ont semblé avoir une place importante mais nettement sous-explorée dans les mécanismes d'adaptation de la fonction cardiaque.

### **8.3 Article 3 : Cardiac force-frequency relationship and frequency-dependent acceleration of relaxation are impaired in LPS-treated rats, Critical Care 2009**

Nos travaux précédents ont montré que le sepsis induit des altérations de la fonction contractile mais également de la relaxation ventriculaire. La tachycardie qui caractérise le choc septique est à l'origine d'une diminution de temps de diastole ce qui réduit le temps laissé au ventricule pour se remplir. La relation force-fréquence (FFR) et l'accélération fréquence dépendante de la relaxation (FDAR) sont deux mécanismes permettant respectivement le maintien d'un volume d'éjection en augmentant la force d'éjection du myocarde et la préservation d'un remplissage satisfaisant du ventricule. Ces mécanismes sont donc particulièrement importants pour la bonne adaptation à la tachycardie. Ils sont modifiés par de nombreuses situations pathologiques mais aucune investigation n'a été menée à ce jour dans le contexte du choc septique.

Le but de cette étude est de rechercher une éventuelle altération de FFR et FDAR dans le choc septique. La recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique participe à ces mécanismes physiologiques et nous avons recherché si elle était modifiée par le sepsis. Nous avons enfin recherché quels pouvait être les acteurs de cette modification de recapture calcique.

Nous avons utilisé notre modèle bien établi de choc septique chez le rat par injection intraveineuse d'endotoxine. Tout en modifiant la fréquence cardiaque, nous avons évalué la fonction contractile myocardique par tous les moyens à notre disposition. D'abord nous avons réalisé des évaluations, *in vitro*, sur cardiomyocytes isolés. Puis nous avons utilisé l'évaluation, *ex vivo*, de la pression développée par le ventricule gauche sur cœur isolé perfusé. Et enfin nous avons mesuré, *in vivo*, des paramètres écho-cardiographiques et Doppler de la contraction et la relaxation ventriculaire.

La phosphorylation de la calcium-calmoduline-kinase II (CaMKII) et de phospholamban (PLB) (des protéines intervenant dans la régulation de la recapture

calcique sarcoplasmique en fonction de leur degré de phosphorylation) a été évaluée. La mesure de recapture calcique par le SR a été réalisée sur des préparations de vésicules de réticulum sarcoplasmique isolées. Sur ces préparations ont également été évalué l'activité des phosphatases.

Nous avons retrouvé dans tous nos modèles une diminution de la contractilité et de la relaxation myocardique. Nous n'avons pas retrouvé d'altération de FFR sur cœur isolé perfusé ou en échocardiographie. Par contre une FFR négative a été constaté sur nos préparations de cardiomyocytes isolés. FDAR est diminué dans tous nos modèles. La diminution de recapture calcique par les vésicules de SR que nous constatons pourrait l'expliquer.

La forme phosphorylée du phospholamban (P-PLB) est diminuée dans les cœurs septiques alors qu'il n'y a pas de modification de la phosphorylation de CaMKII. Cette diminution pourrait être due à l'augmentation d'activité phosphatasique que nous avons observée dans les cœurs septiques. En effet l'inhibition des phosphatases permet l'augmentation de P-PLB, la restauration de la recapture calcique et l'amélioration de la relaxation ventriculaire.

## Research

## Open Access

**Cardiac force-frequency relationship and frequency-dependent acceleration of relaxation are impaired in LPS-treated rats**Olivier Joulin<sup>1</sup>, Sylvestre Marechaux<sup>2,3</sup>, Sidi Hassoun<sup>1,3</sup>, David Montaigne<sup>1,3</sup>, Steve Lancel<sup>3</sup> and Remi Neviere<sup>1,3</sup><sup>1</sup>EA 2689, IMPRT-IFR114, Université de Lille 2, 1 place de Verdun 59000 Lille, France<sup>2</sup>Service Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires, CHRU Lille, Bd Pr. Leclercq 59000 Lille, France<sup>3</sup>Département de Physiologie, Faculté de Médecine, 1 place de Verdun 59000 Lille, FranceCorresponding author: Remi Neviere, [rneviere@univ-lille2.fr](mailto:rneviere@univ-lille2.fr)

Received: 8 Oct 2008 Revisions requested: 13 Jan 2008 Revisions received: 17 Dec 2008 Accepted: 6 Feb 2009 Published: 6 Feb 2009

*Critical Care* 2009, **13**:R14 (doi:10.1186/cc7712)This article is online at: <http://ccforum.com/content/13/1/R14>© 2009 Joulin *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.**Abstract**

**Introduction** Frequency-dependent acceleration of relaxation (FDAR) ensures appropriate ventricular filling at high heart rates and results from accelerated sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) activity independent of calcium removal from the cell. Because lipopolysaccharide (LPS) challenge may induce aberrations in calcium trafficking and protein phosphorylation, we tested whether LPS would abolish FDAR in rats.

**Methods** Following LPS injection, changes in force-frequency relationship and FDAR were studied in cardiomyocytes, isolated hearts and *in vivo* by echocardiography. Calcium uptake and phosphatase activities were studied in sarcoplasmic reticulum (SR) vesicle preparations. Western blots of phospholamban and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, and serine/threonine phosphatase activity were studied in heart preparations.

**Results** In cardiomyocytes and isolated heart preparations, reductions in time constant of relaxation ( $\tau$ ) and time to 50% relaxation at increasing rate of pacing were blunted in LPS-treated rats compared with controls. Early diastolic velocity of the mitral annulus (Ea), a relaxation parameter which correlates *in vivo* with  $\tau$ , was reduced in LPS rats compared with control rats. LPS impaired SR calcium uptake, reduced phospholamban phosphorylation and increased serine/threonine protein phosphatase activity. *In vivo* inhibition of phosphatase activity partially restored FDAR, reduced phosphatase activity and prevented phospholamban dephosphorylation in LPS rat hearts.

**Conclusions** LPS impaired phospholamban phosphorylation, cardiac force-frequency relationship and FDAR. Disruption of frequency-dependent acceleration of LV relaxation, which normally participates in optimal heart cavity filling, may be detrimental in sepsis, which is typically associated with elevated heart rates and preload dependency.

**Introduction**

Apart from the Frank-Starling mechanism, force-frequency relationship represents a major intrinsic regulatory factor that is essential for the immediate adjustment of cardiac contractile function to rapid changing requirements of blood supply. The frequency-dependent gain in contractility is an intrinsic property of cardiac muscle present in all mammals and allows for greater contractile force [1]. Not only does the heart generally beat stronger when it is stimulated to contract faster, the kinetic of contraction is also accelerated, that is, the fre-

quency-dependent acceleration of relaxation (FDAR) [1,2]. From a physiological perspective, FDAR participates in the maintenance of efficient ventricular filling and coronary blood at higher heart rates, despite a decreased diastolic time interval [2]. In clinical sepsis, left ventricle (LV) systolic dysfunction and altered diastolic relaxation are typically observed [3]. In contrast, only a limited number of studies have evaluated the frequency-dependent gain in contractility in the septic myocardium. In these studies, inotropic responsiveness to changes in frequency of stimulation from lipopolysaccharide (LPS)

ANOVA: analysis of variance; CaMKII: calcium/calmodulin protein kinase type II;  $dP/dt_{max}$ : LV developed pressure first maximal positive derivatives;  $dP/dt_{min}$ : LV developed pressure first maximal negative derivatives; E: early flow; Ea: early diastolic velocity of the mitral annulus; FDAR: frequency-dependent acceleration of relaxation; LPS: lipopolysaccharide; LV: left ventricle; LVDP: left ventricle developed pressure; LVEDD: left ventricle end diastolic diameter; LVESD: left ventricle end systolic diameter; PW: diastolic posterior wall thickness; SERCA: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase; SR: sarcoplasmic reticulum; SW: septal wall thickness; VTI: velocity time integral.

treated hearts was significantly less than controls [4,5]. Effects of LPS on FDAR have not been previously described.

Force-frequency relationship and FDAR are primarily related to changes in intracellular calcium transients [1,2]. The exact molecular basis for FDAR has not been resolved, yet an attractive mechanism implicates thr-17 phosphorylation of phospholamban by calcium/calmodulin protein kinase II (CaMKII) [6-8]. In addition to these intrinsic heart regulatory processes, stimulation of  $\beta$ -adrenoceptors increases contractility and accelerates relaxation through accumulation of cyclic AMP and subsequent activation of protein kinase A. Activated protein kinase A phosphorylates phospholamban at ser-16 residue that relieves sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) inhibition, enhances removal of calcium from the cytosol and increased heart contractility [8]. Conversely, activation of protein phosphatase-1 and 2, which are the major phosphatases functionally relevant in the heart, dephosphorylate phospholamban and favour SERCA inhibition [8].

We hypothesised that intracellular calcium traffic aberrations and changes in calcium handling protein phosphorylation reported in LPS challenge [9-11] would alter FDAR response. For example, reduced phospholamban phosphorylation by protein kinase inhibition [10,12] and activation of protein phosphatases that dephosphorylate phospholamban [13,14] typically observed in sepsis may in turn alter inotropic and relaxation responsiveness with changes in frequency of heart stimulation.

The present experiment was undertaken to assess the potential effects of LPS on force-frequency relationship and FDAR in rats. Preparations of intact cardiomyocytes, isolated hearts and echocardiography were evaluated. First, we tested whether LPS would reduce phospholamban phosphorylation and disrupt cardiac force-frequency relationship and FDAR. As FDAR was disrupted in LPS-treated rats, we next tested whether phospholamban dephosphorylation induced by LPS was associated with CaMKII activation (which phosphorylates phospholamban at the thr-17 residue) and serine/threonine phosphatase activation (which dephosphorylates phospholamban).

## Materials and methods

### Animal preparation

All work was performed under a protocol approved by the University of Lille's Institutional Animal Care and Research Advisory Committee. The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health. Under brief isoflurane anaesthesia, adult male Sprague-Dawley rats (weighing 250 to 300 g) (Charles River Lab, L'Arbresle, France) were treated with either 10 mg/kg of LPS from *Escherichia coli* serotype 055:B5 in 500  $\mu$ L saline or 500  $\mu$ L saline administered intra-

venously via the dorsal penile vein. Where indicated, we used tacrolimus (FK506; Fujisawa, La Celle St Cloud, France) as a protein phosphatase type 2 inhibitor. Tacrolimus-treated LPS-challenged rats received 0.01 mg/kg of tacrolimus in 500  $\mu$ L LPS in saline mixture. Four hours after treatments, rats were prepared for echocardiography, and isolated heart or single cardiac myocyte evaluations.

### Left ventricular cardiomyocyte shortening

Ventricular myocytes were isolated as previously described [15]. For contraction amplitude, cells were placed in a flow chamber and field-stimulated with pulses of 5 ms duration at a frequency of 0.5 and 2 Hz. As an index of acceleration of relaxation, we calculated time constant of relaxation ( $\tau$ ,  $\tau$ ) at 0.5 Hz and 2 Hz.

### Myocardial in isolated heart preparation

Myocardial contractile function was studied using a modified Langendorff isolated heart preparation technique, as previously described [16]. After the equilibration period, heart parameters were recorded at 150 and 300 beats/minute pacing rates. Left ventricular developed pressure (LVDP), its first maximal derivatives ( $dP/dt_{max}$  (positive) and  $dP/dt_{min}$  (negative)) and coronary perfusion pressure were recorded using a Biopac Data Acquisition System (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA). Half-relaxation time ( $t_{1/2}$ ) and time constant of LV isovolumic relaxation ( $\tau$ ,  $\tau$ ) were calculated at 150 and 300 beats/minute. LV pressure from the time of peak negative  $dP/dt$  to 5 mmHg above LV end diastolic pressure was fitted by the monoexponential equation:

$$p(t) = pe^{-t/\tau}$$

where  $t$  is time obtained,  $e$  is natural logarithm and  $p$  is pressure [17]. Time constant of LV isovolumic relaxation ( $\tau$ ) were calculated from the above equation.

### Echocardiography evaluation

Rat echocardiography was performed as previously described [18] at baseline and four hours after intravenous administration of LPS in the same individual. Two-dimensional (2D) Doppler echocardiography was obtained in the left lateral decubitus position with a linear transducer (14 MHz, Acuson Sequoia C512 system, Mountain View, CA, USA). All echocardiographs and data analysis were performed by MS, blinded for group design. Measurements were performed after magnification to ensure optimal visualisation of cardiac chambers, and depth was set at 20 mm. Gain was set for best imaging and compression was 65 dB. For the assessment of LV function, parasternal short and long axis 2D views were sampled to obtain at least 15 images per second. For blood flow and tissue Doppler measurements, the sweep speed was 200 mm/s.

The anterior chest hair was shaved off and recordings were made under continuous monitoring by fixing the electrodes to the limbs. At least three cardiac cycles were used for each measurement, and the average value was taken. M-mode tracing of the LV was obtained from the parasternal long axis view allowing the measurement of LV end diastolic diameter, LV end systolic diameter, and diastolic posterior and septal wall thickness in accordance with the American Society of Echocardiography guidelines. The following parameters were calculated: left ventricular weight =  $1.04 \times (\text{LVEDD} + \text{PW} + \text{SW})$ , and fractional shortening =  $(\text{LVEDD} - \text{LVESD})/\text{LVEDD}$ , where LVEDD is left ventricle end diastolic diameter, LVESD is left ventricle end systolic diameter, PW is diastolic posterior wall thickness and SW is septal wall thickness.

From the parasternal short axis view, pulmonary flow was recorded using pulsed Doppler with the smallest sample volume placed at the level of the pulmonary annulus. Cardiac output was calculated as the product of the pulmonary forward stroke volume:

$$\text{VTI} \times \text{D}^2/4 \times \pi$$

where D is the diameter of the right ventricle outflow tract, and heart rate, and VTI is velocity time integral. Pulsed Doppler mitral inflow velocities were obtained by placing a 0.6 mm sample volume between the tips of the mitral leaflets in the apical four-chamber view. The Doppler beam was aligned parallel to the direction of flow. Isovolmic relaxation time was measured as the interval between aortic closure and the start of mitral flow. Ea was obtained from the four apical chamber view using tissue Doppler imaging as an indice of LV relaxation. Data were stored on compact discs in DICOM format and measured offline with the Echo PAC PC Software release 08 (General Electrics, Horten, Norway). Transthoracic echocardiography was performed under inhaled sevoflurane anaesthesia, 100% oxygen and spontaneous respiration. Increases in sevoflurane concentrations (2 to 4%) were used to decrease heart rate by about 20%. An echo image is shown in Figure 1.

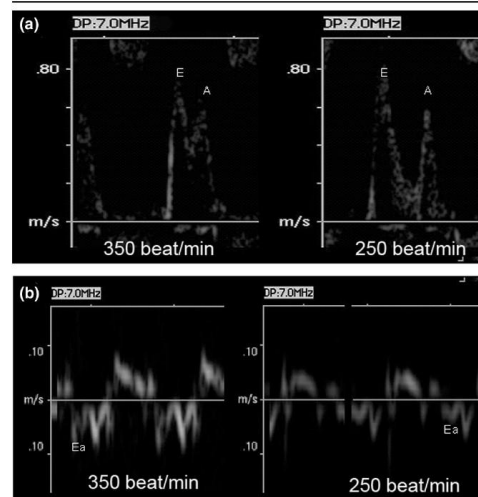
#### Western blot analysis

Ventricular heart tissue was homogenised with a Polytron homogeniser (Glen Mills Inc., Clifton, NJ., USA). Protein extracts from heart tissue (50 µg) were separated by a 4 to 12% bis-Tris HCl-buffered polyacrylamide gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and subjected to Western blotting for SERCA2a, phospholamban, thr17-phospho-phospholamban, CAMKII and phospho-CAMKII antibodies (Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA). Bound antibodies were detected by the use of enhanced chemiluminescence's Plus kit (Amersham, Freiburg, Germany).

#### SR vesicle calcium uptake

Sarcoplasmic reticulum (SR) microsomes were obtained from rat ventricles following ultracentrifugation (100,000 g) proce-

**Figure 1**



Representative spectral recording of blood flow Doppler and tissue Doppler imaging recorded at the spectral mitral annulus. (a) The blood flow Doppler was recorded at the tips of the mitral leaflets and (b) tissue Doppler imaging was recorded at the spectral mitral annulus in a normal rat at heart rate of 350 beats/minute and 250 beats/minute. Note that in the presence of minimal changes in early flow and late flow mitral diastolic wave velocities, early diastolic mitral annulus velocity is lower when heart rate is decreased.

dures [19]. The whole procedure was carried out in a cold room, at 4°C and in the presence of protease inhibitors (0.1 µM aprotinin, 500 µM benzamide, 1 µM leupeptine, 1 µM pepstatin A 200 µM and phenylmethylsulphonyl fluoride). SR preparation was placed in a Teflon chamber equipped with a calcium-selective microelectrode (WPI, Aston, UK) to assess calcium-uptake activity. Changes of medium (ie, extramicrosomal) calcium concentration were recorded continuously. At the end of the preincubation period, the reaction was initiated by addition of 1.5 mmol ATP after which calcium chloride pulse was added. Calcium is then rapidly taken up by the SR vesicles, resulting in a return of extramicrosomal calcium concentration to baseline levels. At the end of the experiments, thapsigargin was added to block SR calcium uptake.

#### SR phosphatase activity assay

SR protein phosphatase activity was assessed in SR vesicles of rat with the Protein Serine/Threonine Phosphatase Assay System (Millipore; Bioscience, St Quentin en Yvelines, France) according to the manufacturer's instructions [20].

#### Statistical analysis

Results were analysed with the SPSS for Windows software, version 11.0.1 (SPSS France, Paris, France). Data represent

means  $\pm$  standard error of the mean. Statistical nonparametric Mann-Whitney test was used to compare unmatched groups (controls and LPS-treated rats). Statistical comparisons between means were made by two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements on frequency effect (main effects; two levels and treatment effect; two levels), and the interactive effects. Post hoc analyses were made using Dunnett's test comparing the variable group with the control group. Statistical significance was assigned to  $p < 0.05$ .

## Results

### Single cardiomyocyte and myocardial function

Shortening of single cardiomyocytes isolated from LPS-challenged rats was reduced compared with controls. Isolated heart-derived contractility and relaxation parameters, such as LVDP and its first maximal derivatives, were also reduced in LPS-challenged rats (Table 1). Echocardiography evaluation shows that LPS challenge induced about a 15% decrease in LV ejection fraction and about a 35% decrease in fractional shortening, compared with controls (Table 1). Decreases in indexes of cardiac performance were accompanied by about a 40% decrease in cardiac output. Ea was reduced in LPS-challenged rats compared with controls, suggesting perturbations of LV relaxation. Early flow (E)/Ea did not change significantly, suggesting minor modification in LV end diastolic pressure (Table 1). Overall, our results suggested that LPS

induced some degree of hypovolaemia which was associated with LV diastolic dysfunction.

### Force-frequency relationship and frequency-dependent acceleration of relaxation

In control cardiomyocytes, increasing rate of pacing from 0.5 to 2 Hz resulted in a positive cell shortening-frequency response, which was inverted in cardiomyocytes isolated from LPS-treated rats (Figure 2a). In contrast, similar positive force-frequency responses were observed in whole heart preparations, that is, isolated heart and echocardiography, from control and LPS-treated rats (Figures 2b,c). Overall, LPS resulted in significantly different force-frequency dependence in cardiomyocytes, but not in isolated hearts or *in vivo*.

In cardiomyocyte and isolated heart preparations, reductions in time constant of relaxation ( $\tau$ ) (Figures 3a,b) and time to 50% relaxation (data not shown) at increasing rate of pacing were lower in LPS-treated rats compared with controls. Echocardiography evaluation at increasing heart rate shown that ratio of Ea change to heart rate change was reduced in LPS-treated rats compared with control rats ( $0.054 \pm 0.026$  versus  $0.035 \pm 0.021$  cm/sec/beat,  $n = 5$  rats;  $p < 0.05$ ). Overall, LPS resulted in significantly different acceleration of relaxation-frequency dependence in cardiomyocytes and isolated hearts.

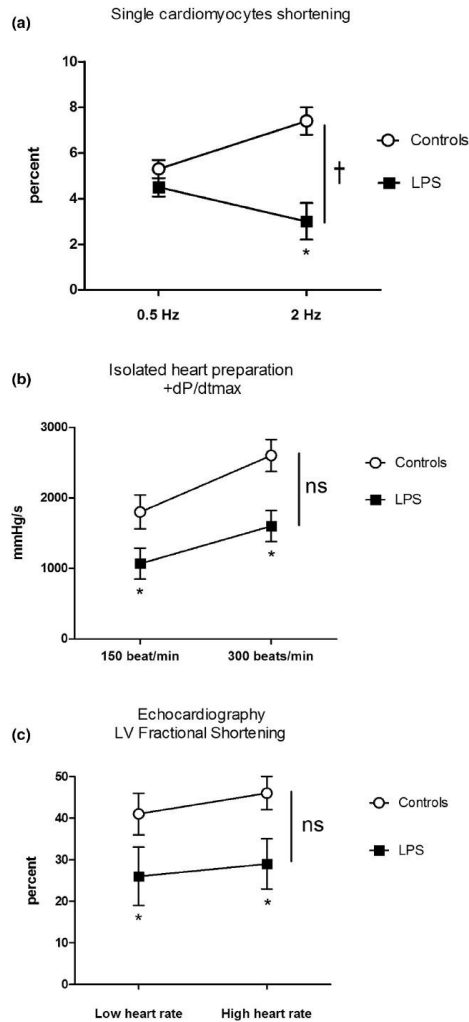
**Table 1**

Haemodynamic characteristics		
	Control	LPS
Cardiomyocyte shortening	6.3 $\pm$ 0.4%	4.5 $\pm$ 0.4%*
LV developed pressure (mmHg)	90 $\pm$ 5	65 $\pm$ 7*
dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/second)	2750 $\pm$ 100	1650 $\pm$ 175*
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/second)	1300 $\pm$ 215	800 $\pm$ 115*
Heart rate (beats/second)	379 $\pm$ 13	350 $\pm$ 21
LV ejection fraction (%)	62 $\pm$ 3	51 $\pm$ 8*
LV fractional shortening (%)	46 $\pm$ 4	29 $\pm$ 6*
Cardiac output (mL/minute)	110 $\pm$ 14	65 $\pm$ 20*
Transmitral E velocity (cm/second)	87 $\pm$ 13	61 $\pm$ 5*
Transmitral A velocity (cm/second)	68 $\pm$ 21	47 $\pm$ 11*
Early diastolic velocity Ea, (cm/second)	8.5 $\pm$ 0.9	5.3 $\pm$ 1.3*
E/Ea	10.1 $\pm$ 2.6	11.5 $\pm$ 2.7

Shortening was measured in single cardiomyocytes (20 cells per cell isolation, 6 rats per group). Left ventricle (LV) developed pressure and its first derivatives were measured in isolated heart preparations (8 rats per group). Heart rate, LV ejection fraction, LV fractional shortening, cardiac output, transmitral and early diastolic velocities were assessed during transthoracic echocardiography (5 rats per group). Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean and analysed by the mean of unpaired t test. \* indicates  $p < 0.05$  vs controls. A = late flow; dP/dt<sub>max</sub> = LV developed pressure first maximal positive derivatives; dP/dt<sub>min</sub> = LV developed pressure first maximal negative derivatives; E = early flow; Ea = early diastolic mitral annulus velocity; LPS = lipopolysaccharide.

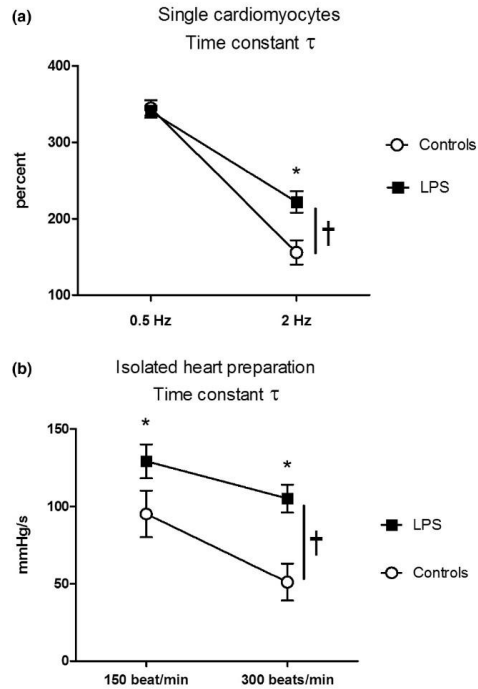


**Figure 2**



Effects of heart rate changes on contractile performance. This was measured in (a) single cardiomyocytes (n = 6 per group), (b) isolated heart (n = 8 per group) and (c) echocardiography (n = 5 per group) studies. Results are mean  $\pm$  standard error of the mean; analysis of variance for repeated measurements on frequency effect, treatment group effect and the interactive effects. \* p < 0.05 between control and lipopolysaccharide (LPS) at each frequency † p < 0.05 between groups across frequency. Overall, LPS resulted in significant different force-frequency dependence in cardiomyocytes, but not in isolated hearts and echocardiography.

**Figure 3**

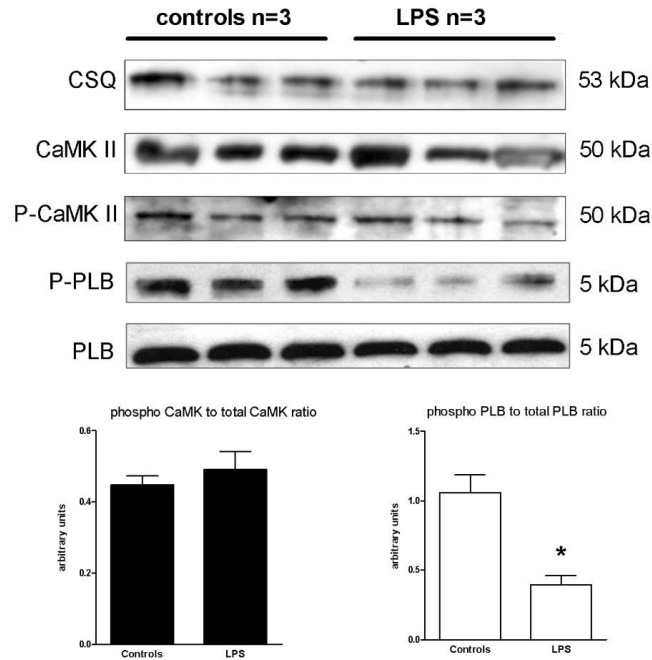


Effects of heart rate changes on frequency-dependent acceleration of relaxation. This was measured in (a) single cardiomyocytes (n = 6 per group) and (b) isolated heart (n = 8 per group) studies. Results are mean  $\pm$  standard error of the mean; analysis of variance for repeated measurements on frequency effect, treatment group effect and the interactive effects. \* p < 0.05 between control and lipopolysaccharide (LPS) at each frequency; † p < 0.05 between groups across frequency. Overall, LPS resulted in significant different force-frequency dependence in cardiomyocytes and isolated hearts.

#### Heart calcium regulatory proteins expression, SR phosphatase activity and SR calcium uptake

LPS treatment was associated with reduction in SR thr17-phosphorylated phospholamban with no changes in total phospholamban protein expression (Figure 4). Compared with controls, LPS challenge did not alter CaMKII activation, that is, phospho-CaMKII to CaMKII ratio (Figure 4). Total protein phosphatase activities were higher in SR vesicles isolated from LPS-treated rats compared with controls rats (Figure 5). Differential phosphatase activities were evaluated by a range of doses of okadaic acid (nM), which inhibits all but PP1 and PP2b phosphatases, and a range of doses of okadaic acid ( $\mu$ M), which inhibits PP1 phosphatases. Incubation of SR samples isolated from LPS-treated rats with okadaic acid at 10 nM had no effects, whereas 1  $\mu$ M okadaic acid partially reduced

Figure 4



Effects of LPS administration on protein expression in heart tissues. Representative Western blots (upper panel) and statistical analysis (bottom panels) of calsequestrin (CSQ), phosphorylated calcium/calmodulin kinase II (P-CaMKII) and total calcium/calmodulin kinase II (CaMKII), thr17-phospho-phospholamban (P-PLP) and total phospholamban (PLP). Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (n = 6 per group). \* p < 0.05 versus controls.

phosphatase activity, suggesting that increases in phosphatase activity were only partially related to PP1 and PP2a activities (Figure 5a). Rate of calcium uptake of SR vesicles isolated from LPS-treated rats was reduced compared with controls rats, whereas *in vitro* incubation with 1  $\mu$ M okadaic acid slightly increased the rate of calcium uptake of SR vesicles isolated from LPS-treated rats (Figure 5b).

#### Effects of phosphatase inhibition on FDAR and phospholamban phosphorylation

To evaluate the effects of phosphatase inhibition on FDAR, we evaluated isolated heart characteristics in a new series of experiments in control and LPS rats treated with tacrolimus, a PP2b inhibitor. Tacrolimus in control rats had no effect on LV contractile function, heart phosphatase activities and phospholamban phosphorylation (data not shown). Compared with LPS-treated hearts, tacrolimus did not alter LV contractile performance ( $dP/dt_{max}$ : 1650  $\pm$  175 mmHg/second in LPS versus 1850  $\pm$  200 mmHg/second in LPS-tacrolimus-treated rats; n = 8 in each group, p > 0.05). Tacrolimus partially

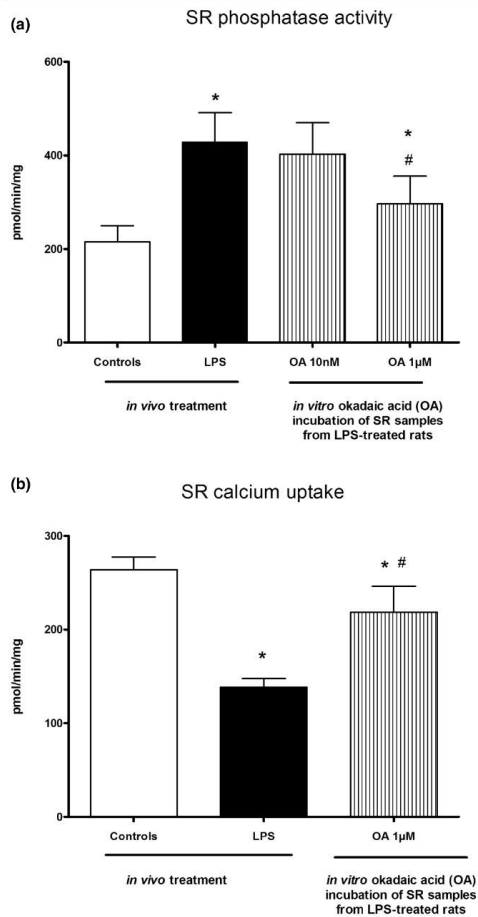
restored FDAR (Figure 6a) and normalised heart phosphatase activities and phospholamban phosphorylation (Figures 6b,c) in LPS-treated rats.

#### Discussion

Consistent with previous studies [21], our results demonstrated that injection of LPS depresses single cardiomyocyte and LV contractile performance. For the first time, we have demonstrated that LPS-induced intrinsic myocardial dysfunction was frequency dependent with disruption of acceleration of LV relaxation at increasing heart rate. Loss of this fundamental adaptive mechanism that ensures optimal LV filling was accompanied by reduced SR calcium uptake, dephosphorylation of phospholamban and serine/threonine phosphatase activity increases.

In LPS-challenged rats, systolic contractile dysfunction was characterised in single cardiomyocytes, isolated hearts and *in vivo* by echocardiography evaluation. Impairment of heart relaxation associated with LPS was also observed in isolated

Figure 5



Effects of lipopolysaccharide (LPS) administration on sarcoplasmic reticulum (SR) protein phosphatase activity and SR calcium uptake. Okadaic acid (OA) was used *in vitro* to evaluate differential phosphatase activity. First, heart SR vesicles of sham and LPS-treated rats were prepared. Then, SR vesicles were incubated with OA in order to study phosphatase activity and calcium uptake. Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n = 6$  per group). \*  $p < 0.05$  versus controls; #  $p < 0.05$  versus LPS.

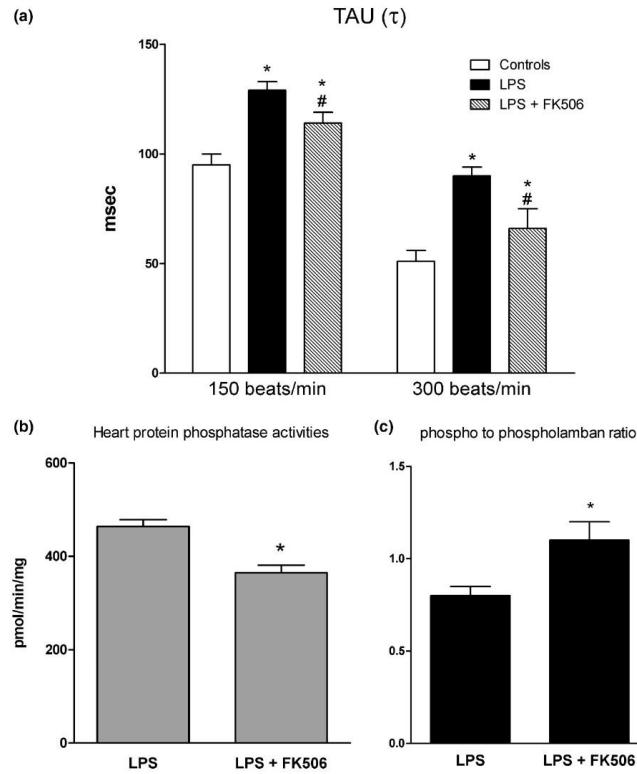
hearts and *in vivo* preparations. Echocardiography studies further documented relaxation abnormalities as reduction of  $E_a$ , a load-independent index of LV relaxation which is impaired in septic patients [22].  $E_a$  reductions in LPS-treated rats were observed in the absence of  $E/E_a$  changes; suggesting only minor modification in end-diastolic pressure. The typical posi-

tive force-frequency relationship was replaced by an inverted relationship in cardiomyocytes isolated from LPS-treated rat hearts. In contrast, LPS did not alter force-frequency relationships in whole preparations, such as isolated heart and echocardiography, although contractile performance was reduced. FDAR was observed in single cardiomyocytes, isolated hearts and *in vivo* in control rats, whereas LPS blunted this adaptive phenomenon. Because calcium uptake by the SR plays a dominant role in clearance of free cytosolic calcium and thus kinetics of relaxation [6,23], we evaluated calcium handling in SR preparations isolated from controls and LPS-treated rats. We found that SERCA-dependent calcium uptake was reduced in SR preparations of LPS rats, which was associated with reduced phospholamban th-17 phosphorylation and increased serine/threonine protein phosphatase activities. Phospholamban th-17 phosphorylation was specifically studied because increasing heart rates mainly implicate phospholamban phosphorylation at the thr-17 site [6,23]. CaMKII activation, that is the phospho-CaMK to CaMK ratio, was virtually unchanged in the hearts of LPS-treated rat compared with controls. Hence, we speculated that phospholamban dephosphorylation and reduced SR calcium uptake were related to increased phosphatase activity rather than reduction in CaMKII activation. This contention was further supported by the results that *in vitro* SR incubation with okadaic acid, a phosphatase inhibitor, partially restored calcium uptake of SR isolated from LPS-treated rat hearts.

Next, we tested whether phosphatase inhibition *in vivo* would prevent phospholamban dephosphorylation and FDAR perturbations. Okadaic acid, a serine/threonine PP1/PP2a phosphatase inhibitor widely used *in vitro* [24,25], induces hypotension and death *in vivo* [26]. Alternatively, non-specific phosphatase inhibition may be achieved by the use of the calcineurin inhibitor tacrolimus [25]. Because we have previously reported that immunosuppressive doses of tacrolimus (1 mg/kg) have deleterious effects on myocardial function in LPS sepsis [27], low tacrolimus doses were used in this study. We found that 0.01 mg/kg tacrolimus had minimal effects on LV systolic performance and partially restored FDAR responsiveness in LPS-treated rats. Interestingly, tacrolimus normalised heart phosphatase activities and phospholamban phosphorylation in LPS-treated rats. These results are consistent with studies showing that calcineurin inhibition stimulates phospholamban phosphorylation and normalises heart blunted  $\beta$ -adrenoceptor responsiveness, cardiomyocyte time constant of relaxation and rate of calcium decrease in spontaneously hypertensive rats [28].

Our study has important limitations. Our experimental conditions can be considered far removed from the *in vivo* situation, that is, use of an experimental LPS model of sepsis and at frequencies well below the *in vivo* spectrum of the species studied. This can be particularly true in our cardiomyocyte studies, in which pacing rates were 0.5 to 2 Hz. Although rates of pac-

Figure 6



Effects of calcineurin inhibition by tacrolimus (0.01 mg/kg). This was measured in hearts isolated from lipopolysaccharide (LPS)-treated rats on (a) time constant of LV relaxation ( $\tau$ ), (b) heart protein phosphatase activity and (c) phospho-phospholamban to total phospholamban ratio. Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (n = 8 per group). \* p < 0.05 versus controls; # p < 0.05 versus LPS.

ing were standardised in cardiomyocytes and isolated hearts, heart frequency changes during echocardiography were achieved by increasing doses of volatile anaesthetics, which may alter calcium cycling and myocardial function [29]. For example, halogenated anaesthetics inhibit the post-rest increase of contractile force by impairing the function of SR. Moreover, halothane, which activates the calcium-release channel, can restore the positive shape of the force-frequency relationship in human myocardium, whereas isoflurane and sevoflurane did not change the force-frequency relationship [29]. Hence, volatile (sevoflurane) anaesthesia concentration that was used to lower heart rate, would also impact on systolic and diastolic function *in vivo*. In the present study, immediate effects of heart rate increases on calcium handling were not evaluated. Instead, we tested whether pre-existing calcium

handling perturbations induced by LPS would have altered FDAR. Hence, systolic and diastolic changes observed at increased heart rates could be due to pre-existing calcium cycling aberrations and abnormal calcium cycling responses to heart rate increases. We studied calcium handling exclusively in SR preparations, which may not reflect cardiac  $Ca^{2+}$  trafficking. In addition to reduced phospholamban th-17 phosphorylation and increased phosphatase activity, sepsis could also alter FDAR through multiple mechanisms, such as altered beta-adrenergic signalling and cAMP-dependent kinase activity, myofibrillar dysfunction and disturbed nitric oxide signalling. Eventually, tacrolimus, which was used to inhibit protein phosphatase activity, has complex and numerous effects on the regulation of calcium cycling in the heart through its binding to its cellular target, the calcineurin binding proteins.

## Conclusions

LPS sepsis impairs LV diastolic function and disrupts LV FDAR. Mechanisms involved in these alterations included reduced SR calcium uptake capacities, which may be related to dephosphorylation of phospholamban and protein phosphatase activity increases. We speculated that disruption of LV FDAR, which normally participates in adequate heart cavity filling, may be particularly detrimental in sepsis, a pathological condition typically associated with elevated heart rates and preload dependency.

### Key messages

- LPS sepsis impairs LV diastolic function and disrupts LV FDAR.
- Loss of this fundamental adaptive mechanism that ensures optimal LV filling was accompanied by reduced SR calcium uptake, dephosphorylation of phospholamban and serine/threonine phosphatase activity increases.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

OJ and SM performed echocardiographic studies, statistical analyses and drafted the manuscript. SH carried out cardiomyocyte studies, SR preparation and phosphatase activity studies. DM performed isolated heart studies and drafted the manuscript. SL and RN conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The authors received funding from EA269 and IMPRT IFR 114 University of Lille, France.

## References

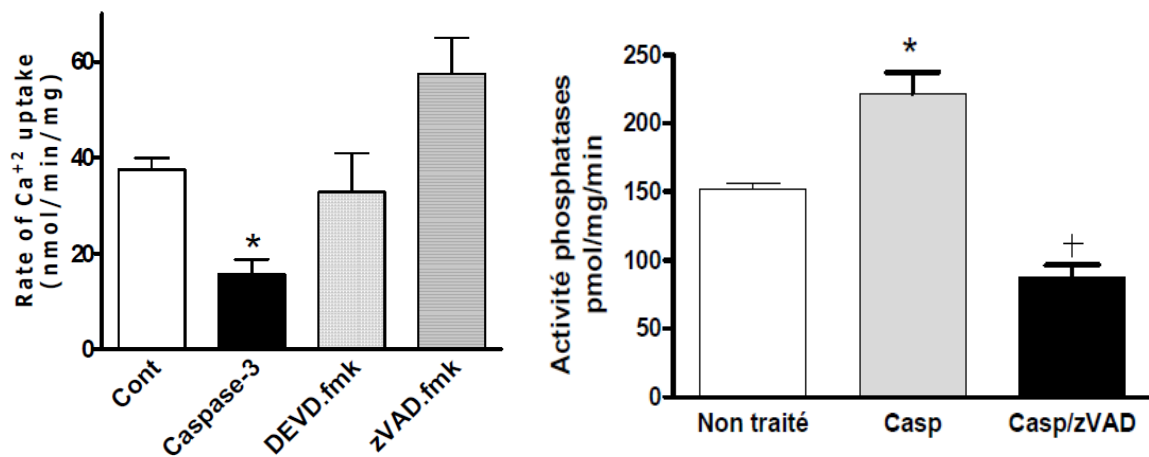
1. Endoh M: **Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance.** *Eur J Pharmacol* 2004, **500**:73-86.
2. Janssen PM, Periasamy M: **Determinants of frequency-dependent contraction and relaxation of mammalian myocardium.** *J Mol Cell Cardiol* 2007, **43**:523-531.
3. Etcheopar-Chevreuil C, François B, Clavel M, Pichon N, Gastinne H, Vignon P: **Cardiac morphological and functional changes during early septic shock: a transesophageal echocardiographic study.** *Intensive Care Med* 2008, **34**:250-256.
4. Parker JL, Adams HR: **Contractile dysfunction of atrial myocardium from endotoxin-shocked guinea pigs.** *Am J Physiol* 1981, **240**:H954-H962.
5. Patel D, Duke K, Light RB, Jacobs H, Mink SN, Bose D: **Impaired sarcoplasmic calcium release inhibits myocardial contraction in experimental sepsis.** *J Crit Care* 2000, **15**:64-72.
6. Bassani RA, Mattiuzzi A, Bers DM: **CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes.** *Am J Physiol* 1995, **268**:H703-H712.
7. DeSantiago J, Maier LS, Bers DM: **Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban.** *J Mol Cell Cardiol* 2002, **34**:975-984.
8. Bers DM: **Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes.** *Annu Rev Physiol* 2008, **70**:23-49.
9. Rudiger A, Singer M: **Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction.** *Crit Care Med* 2007, **35**:1599-1608.
10. Hassoun SM, Marechal X, Montaigne D, Bouazza Y, Decoster B, Lancel S, Neviere R: **Prevention of endotoxin-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak improves mitochondrial and myocardial dysfunction.** *Crit Care Med* 2008, **36**:2590-2596.
11. Ichinose F, Buys ES, Neilan TG, Furutani EM, Morgan JG, Jassal DS, Graveline AR, Searles RJ, Lim CC, Kaneki M, Picard MH, Scherrer-Crosbie M, Janssens S, Liao R, Bloch KD: **Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 prevents myocardial dysfunction in murine models of septic shock.** *Circ Res* 2007, **100**:130-139.
12. Wu LL, Tang C, Dong LW, Liu MS: **Altered phospholamban-calcium ATPase interaction in cardiac sarcoplasmic reticulum during the progression of sepsis.** *Shock* 2002, **17**:389-393.
13. Yokoyama T, Arai M, Sekiguchi K, Tanaka T, Kanda T, Suzuki T, Nagai R: **Tumor necrosis factor-alpha decreases the phosphorylation levels of phospholamban and troponin I in spontaneously beating rat neonatal cardiac myocytes.** *J Mol Cell Cardiol* 1999, **31**:261-273.
14. Krankel N, Adams V, Gielen S, Linke A, Erbs S, Schuler G, Hambrecht R: **Differential gene expression in skeletal muscle after induction of heart failure: impact of cytokines on protein phosphatase 2A expression.** *Mol Genet Metab* 2003, **80**:262-271.
15. Lancel S, Joulin O, Favory R, Goossens JF, Kluzza J, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P, Neviere R: **Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction.** *Circulation* 2005, **111**:2596-2604.
16. Favory R, Lancel S, Tissier S, Mathieu D, Decoster B, Neviere R: **Myocardial dysfunction and potential cardiac hypoxia in rats induced by carbon monoxide inhalation.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **174**:320-325.
17. Yellin EL, Hori M, Yoran C, Sonnenblick EH, Gabbay S, Frater RW: **Left ventricular relaxation in the filling and nonfilling intact canine heart.** *Am J Physiol* 1986, **250**:H620-H629.
18. Slama M, Ahn J, Peltier M, Maizel J, Chemla D, Varagic J, Susic D, Tribouilloy C, Frohlich ED: **Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, **289**:H1131-H1136.
19. Schmidt U, Hajjar RJ, Helm PA, Kim CS, Doye AA, Gwathmey JK: **Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure.** *J Mol Cell Cardiol* 1998, **30**:1929-1937.
20. Deshmukh PA, Blunt BC, Hofmann PA: **Acute modulation of PP2a and troponin I phosphorylation in ventricular myocytes: studies with a novel PP2a peptide inhibitor.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **292**:H792-H799.
21. McDonald TE, Grinnan MN, Carthy CM, Walley KR: **Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000, **279**:H2053-2061.
22. Bouhemad B, Nicolas-Robin A, Arbelot C, Arthaud M, Feger F, Rouby JJ: **Isolated and reversible impairment of ventricular relaxation in patients with septic shock.** *Crit Care Med* 2008, **36**:766-774.
23. Hagemann D, Xiao RP: **Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart.** *Trends Cardiovasc Med* 2002, **12**:51-56.
24. duBell WH, Gigena MS, Guatimosim S, Long X, Lederer WJ, Rogers TB: **Effects of PP1/PP2A inhibitor calyculin A on the E-C coupling cascade in murine ventricular myocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, **282**:H38-H48.
25. Herzig S, Neumann J: **Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes.** *Physiol Rev* 2000, **80**:173-210.
26. Berven G, Saetre F, Halvorsen K, Seglen PO: **Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells.** *Toxicol* 2001, **39**:349-362.
27. Fauvel H, Marchetti P, Obert G, Joulain O, Chopin C, Formstecher P, Neviere R: **Protective effects of cyclosporin A from endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis in rats.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**:449-455.
28. MacDonnell SM, Kubo H, Harris DM, Chen X, Berretta R, Barbe MF, Kolwicz S, Reger PO, Eckhart A, Renna BF, Koch WJ, Houser

- SR, Libonati JR: **Calcineurin inhibition normalizes beta-adrenergic responsiveness in the spontaneously hypertensive rat.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **293**:H3122-H3129.
29. Schotten U, Greiser M, Braun V, Karlein C, Schoendube F, Hanrath P: **Effect of volatile anesthetics on the force-frequency relation in human ventricular myocardium: the role of the sarcoplasmic reticulum calcium-release channel.** *Anesthesiology* 2001, **95**:1160-1168.

### 8.3.1 Résultats non publiés

Des expérimentations faites parallèlement à ce travail nous donnent quelques éléments de réponse à l'augmentation de l'activité phosphatase qui est constaté dans ce travail et qui pourrait participer à l'altération de la recapture calcique donc à l'altération de la relaxation et à la diminution de FDAR.

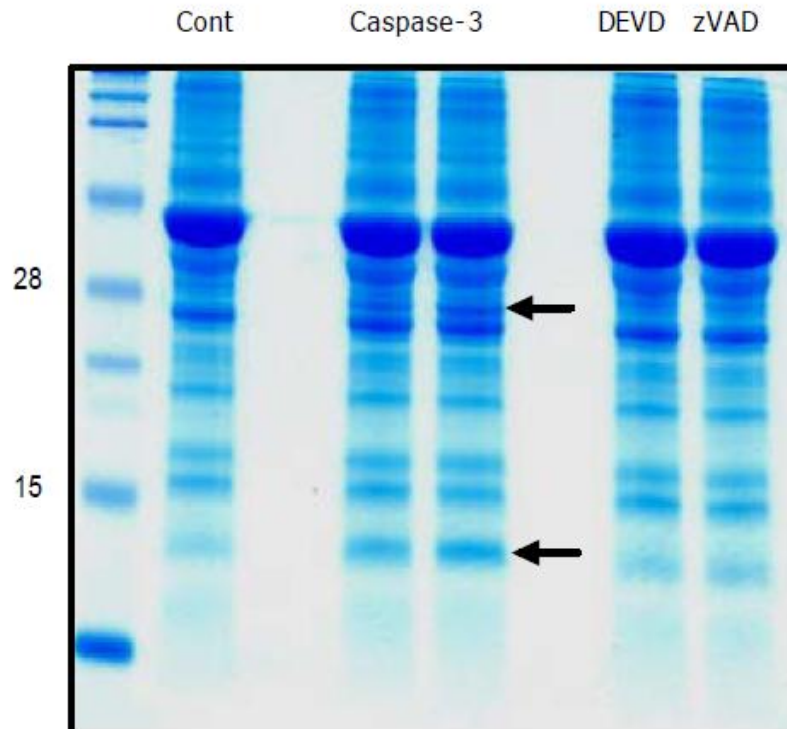
En effet, sur les préparations de vésicules sarcoplasmiques de rats contrôle, nous avons observé que l'adjonction de caspase-3 active entraîne une diminution de la recapture calcique et une augmentation de l'activité phosphatase (figure 53). Cette augmentation peut être inhibée par l'adjonction d'inhibiteurs de caspases.



**Figure 53 : Recapture calcique par le réticulum, activité phosphatase et effet de caspase-3**

L'adjonction de caspase-3 active à des préparations de vésicules de réticulum sarcoplasmique entraîne une diminution de la recapture calcique par le réticulum et une augmentation de l'activité phosphatase. Les effets de caspase-3 sont prévenus par l'administration d'inhibiteur de caspase (DEVD.fmk, zVAD.fmk).

De plus l'adjonction de caspase-3 sur des préparations de vésicules de réticulum sarcoplasmique entraîne un clivage protéique à leur niveau (figure 54).

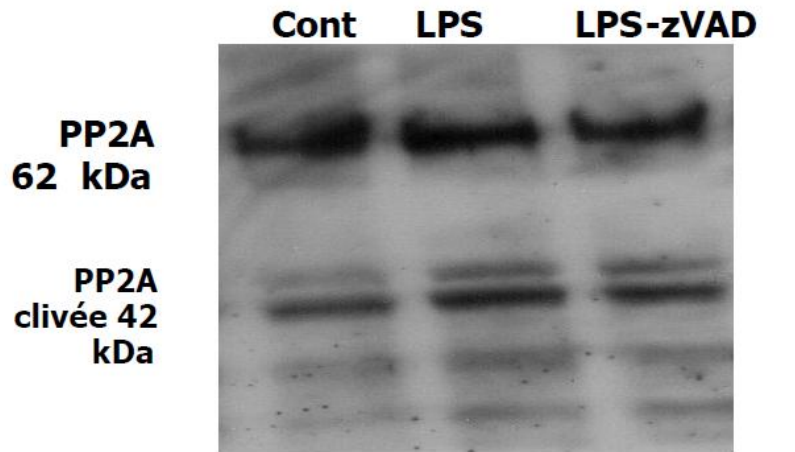


**Figure 54 : Clivage des protéines du réticulum par caspase-3**

Coloration en bleu de coomassie du gel SDS-PAGE (12%). Des vésicules du RS cardiaque provenant de rats non traités ont été utilisées pour ces expériences. 50 µg de protéines ont été incubés pendant 60 min avec 10 µg/mL de caspase-3 active en présence ou non de 25 µM DEVD.fmk ou de 25 µM zVAD.fmk. Les flèches montrent deux fragments de protéines clivées par la caspase-3 : un fragment majeur à 28 kDa et un deuxième à 15 kDa. Ce clivage est prévenu par DEVD.fmk et zVAD.fmk.

En effet de nombreuses protéines sont susceptibles d'être la cible de l'activité protéase de la caspase-3. PP2A est une phosphatase qui comprend une séquence cible reconnue par caspase-3. Nous avons observé que le clivage PP2A apparait lors de l'endotoxémie (Figure 55). PP2A est une enzyme composée de plusieurs sous-unités, on pourrait imaginer que ce clivage augmente l'activité phosphatasique de la protéine ainsi modifiée.





**PP2A clivée / PP2A total**      **0.53±0.06**    **0.71±0.05 \***    **0.55±0.07**

**Figure 55 : Clivage de PP2A au cours de l'endotoxémie**

Expression par Western Blot de la phosphatase PP2A (sous unité régulatrice de PP2A). Des protéines (50 µg) ont été déposées sur gel SDS-PAGE de 12%, préparées à partir des vésicules de réticulum sarcoplasmique de rats non traités (Cont), rats endotoxémiques (LPS) et des rats endotoxinémiques traités par un inhibiteur de caspases zVAD.fmk (LPS-zVAD). Un fragment important de clivage de PP2A apparaît à environ 42 kDa chez le rat endotoxinique (LPS). \* indique P < 0.05 versus Cont. (n=3 isollements par groupe).

Ainsi la recapture calcique pourrait être altérée dans le sepsis par un mécanisme en partie dépendant de l'activation des caspases. Et entrainer ainsi des troubles de la contractilité, de la relaxation et de FDAR.

## 9 DISCUSSION

Nous avons montré que dans notre modèle d'endotoxémie chez le rat les fonctions contractiles et de relaxation myocardiques sont altérées. L'effet d'accélération de la relaxation par l'augmentation de fréquence (FDAR) est également diminué au cours de l'endotoxémie. Ces effets sont inductibles par des médiateurs sériques, possiblement des cytokines telles que TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  et IL6. Nous avons également montré que l'activation de la voie des caspases joue un rôle important dans la survenue de la dysfonction myocardique septique. L'activation des caspases entraîne une altération structurelle de l'appareil contractile (désorganisation des sarcomères, clivage de la troponine T). De plus les caspases activées entraînent une diminution de la sensibilité des myofibrilles au calcium et une diminution des flux calciques intracardiomyocytaires avec une accumulation diastolique de calcium. Enfin au cours de l'endotoxémie, les altérations de phosphorylation de phospholamban, une protéine qui participe à la régulation de FDAR, pourraient être liées à une augmentation de l'activité phosphatase qui pourrait être favorisée par l'activation des caspases.

### 9.1 Altération fonctionnelles myocardiques

L'altération de la contractilité myocardique au cours du sepsis est décrite depuis de nombreuses années tant dans des modèles expérimentaux que chez les patients [6, 7]. Nous avons retrouvé une altération de la fonction contractile myocardique tant à l'échelon cellulaire qu'à un niveau plus intégré sur le cœur isolé ou in vivo. Les cardiomyocytes isolés à partir de rats endotoxiques présentent une diminution de la fraction de raccourcissement et de la vitesse de raccourcissement cardiomyocytaire. Ceci est à mettre en relation directe avec la diminution des transitoires calciques observés et la diminution de sensibilité au calcium des myofibrilles que nous avons confirmé.

L'intérêt pour la fonction diastolique du myocarde septique est plus récent [6, 448]. L'apport de l'échocardiographie et du doppler dans l'évaluation cardiaque du sepsis grandement fait avancer l'évaluation de cette dysfonction chez les patients de réanimation. En effet les altérations de la relaxation ventriculaire semblent très fréquentes au cours du sepsis et il semble exister une continuité entre l'apparition de ces troubles diastoliques et l'apparition de la dysfonction contractile qui ne touche quand a elle qu'une partie des patients en choc septique [8, 9]. Dans les travaux que nous avons présentés nous avons retrouvé une constante altération de la relaxation myocardique chez les rats endotoxémiques. Nous l'avons observé sur des cardiomyocytes isolés, sur le cœur isolé perfusé ou chez l'animal vivant à l'aide d'évaluation échographiques et doppler. Nous avons constaté que le calcium cytoplasmique diastolique des cardiomyocyte de rats endotoxémiques est plus élevé que pour les rats contrôle. Cela peut participer à l'altération de la relaxation cardiomyocytaire en maintenant un certain degré de contraction de la cellule.

## **9.2 Médiateurs circulants de la dysfonction myocardique septique**

Depuis les travaux de Parillo et al. en 1985 [261], l'identité du ou des facteurs dépresseurs myocardiques circulants (MDF) n'a pas été élucidé. Mais ce médiateur n'est sans doute pas une unique molécule capable de générer a elle seule la dysfonction myocardique. En effet il semble que différentes cytokines, dont le taux circulant est augmenté au cours du sepsis, soient à même d'induire la dysfonction contractile. TNF-a, IL-1b et IL-6 ont déjà été identifiées comme de potentiels médiateurs pouvant entrainer l'apparition de la défaillance myocardique. De plus leur action est sans doute potentialisée lorsque la cellule est exposé à plusieurs d'entre elles comme l'a montré Kumar et al. [266] en observant un effet synergique de TNF-a et IL-1b ou Maas et al. [270] en observant une potentialisation de l'effet de TNF-a par IL-1b et IL6.

Un des autres candidats au « titre » de MDF est le NO. En effet l'action de celui-ci peut participer à la dysfonction myocardique. Mais sa grande instabilité entraine une

demi-vie plasmatique très brève et son action est probablement le fait d'une action paracrine des cellules myocardiques entre-elles ou des cellules endothéliales ou circulantes sur les cardiomyocytes qui les entourent. En effet dans notre travail nous n'avons pas retrouvé dans le sérum des patients en choc septique d'augmentation des métabolites du NO.

Notre travail ne permet pas d'identifier plus précisément le ou les médiateurs de cette dysfonction mais il nous montre que le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou le NO ne sont pas indispensables à l'induction de cette dysfonction.

TNF- $\alpha$  en étant impliqué dans l'induction de la défaillance myocardique et dans l'induction des voies de l'apoptose dans le cardiomyocyte présente un rôle néanmoins particulièrement intéressant dans le choc septique.

Dans les années 90 l'administration d'anticorps anti-TNF a été proposé comme traitement dans le choc septique. Une étude pilote avait été réalisée par Vincent et al. et retrouvait une amélioration de la fonction ventriculaire sur une population de dix patients traités <sup>[449]</sup>. Un essai multicentrique international a été réalisé et n'a quand à lui montré aucune amélioration du pronostic des patients. De même deux études multicentriques internationales utilisant un antagoniste du récepteur de l'IL-1 <sup>[450, 451]</sup> n'ont pas retrouvé de bénéfice sur la mortalité des patients en choc septique.

Mais la voie TNF- $\alpha$  dépendante n'est pas aussi caricaturale qu'on aurait pu le croire <sup>[452]</sup> : le TNF- $\alpha$  active des voies à la fois pro- et anti-apoptotiques. En effet, certaines études attribuent un rôle tout à fait bénéfique au TNF- $\alpha$ . L'étude de Nakano <sup>[453]</sup> montre que le TNF- $\alpha$  augmente le niveau d'expression des HSP 70, rendant ainsi les cardiomyocytes de rats adultes résistants au stress hypoxique. D'autres rapportent que le préconditionnement cardiaque par le TNF- $\alpha$  protège le cœur lors d'épisode d'ischémie/reperfusion <sup>[454]</sup>. La modulation des cytokines inflammatoire est donc particulièrement complexe à réaliser et l'application en clinique humaine dans le choc septique n'est plus d'actualité.

### 9.3 Mécanismes impliqués dans la dysfonction myocardique

Nous avons mis en évidence l'activation de mécanismes pro-apoptotiques dans les cardiomyocytes de rats endotoxiniques. Nous avons montré une augmentation de l'activation des caspases par les voies dépendante des récepteurs de mort et par la voie mitochondriale. Nous avons montré que l'activation des caspases participe à la dysfonction myocardique septique. En d'autres publications ont déjà montré que l'activation des caspases pouvait altérer la fonction contractile [455-457].

Nous avons retrouvé cette activation au niveau de cardiomyocytes de rats endotoxémiques mais également au niveau de cardiomyocytes exposés à du sérum de rat endotoxémique montrant qu'un facteur circulant pourrait être à l'origine de cette activation, possiblement le ou les mêmes que les MDF. Cela est d'autant plus probable que le TNF- $\alpha$  peut induire l'activation des caspases par l'intermédiaire des « récepteurs de mort ».

L'activation des caspases entraîne une dépression contractile, une diminution des transitoires calciques, une augmentation du calcium cytosolique diastolique, une désorganisation sarcomérique et un clivage de la troponine T. Nous avons prévenu l'ensemble de ces phénomènes par l'utilisation d'inhibiteur de caspase non spécifique (zVAD.fmk) ou par un inhibiteur spécifique de caspase-3 (zDEVD.cmk). Ces résultats confortent nos observations et nous permettent d'affirmer le rôle de l'activation des caspases dans la survenue des troubles contractiles myocardiques du sepsis.

Le mécanisme d'action de l'activation des caspases sur la fonction contractile des cardiomyocyte est multiple. Les caspases sont capables de cliver de nombreuses protéines au niveau de séquence cible d'acide aminés après un résidu aspartate. Des protéines de l'appareil contractile peuvent être clivées in vitro par caspase-3. Dans l'insuffisance cardiaque il a été montré un clivage par caspase-3 de la chaîne légère de la myosine au niveau myocardique [458]. Nous avons retrouvé un clivage de la troponine T dans notre modèle. Communal et al. avaient en effet montré que caspase-3 était capable de cliver la troponine T en un fragment de 25kDa [455]. De

plus nous avons montré un clivage protéique au niveau du réticulum sarcoplasmique. A ce jour l'identité des cibles des caspases sur le SR ne sont pas connues. Des publications montrent un possible clivage du récepteur à l'inositol-triphosphate sarcoplasmique au niveau neuronal <sup>[459, 460]</sup> or ce récepteur n'est que très peu présent dans le myocarde. Le RyR comprend plus de 10 sites de clivage potentiel pour caspase 3 (motif DXXD). Mais il n'y a, à ce jour aucune publication faisant part d'une clivage de RyR par une caspase. Il est possible que la structure tertiaire du RyR empêche l'accès de ces sites aux caspases. L'étude de l'effet des caspases sur le RyR ou sur les protéines qui en régulent l'activité (calmoduline, kinase, phosphatase...) semble une perspective d'étude intéressante qui permettra d'expliquer la fuite calcique sarcoplasmique que nous avons constaté dans notre modèle.

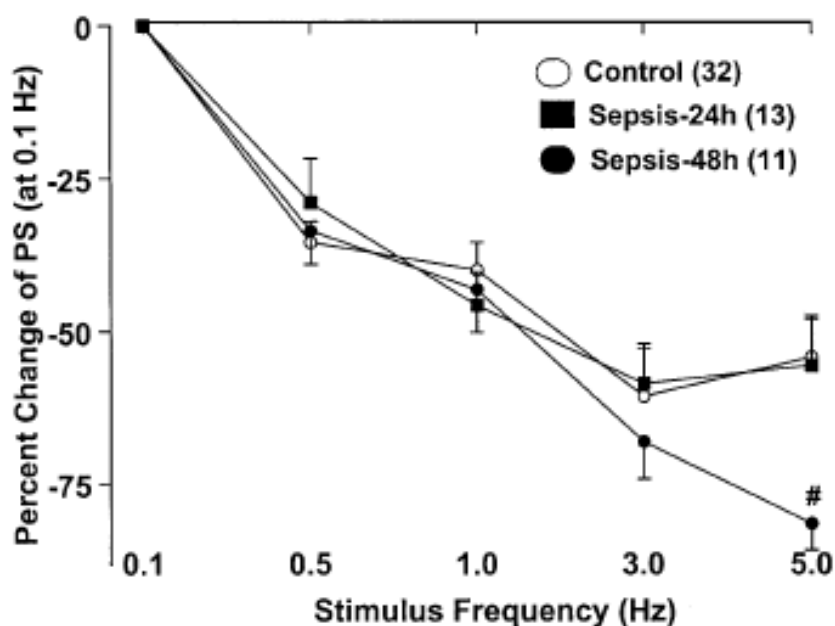
Un clivage caspase dépendant de PP2A a été décrit par Santoro et al. <sup>[461]</sup>. Nous avons également retrouvé un clivage de PP2A dans notre modèle d'endotoxémie. Celui-ci concerne la sous-unité régulatrice de PP2A de 62 kDa et génère un fragment de 42 kDa. On peut ainsi expliquer l'augmentation constatée de l'activité phosphatase. Cette activité est capable de déphosphoryler le phospholamban qui exercera alors son effet inhibiteur sur SERCA2A et entrainera ainsi une diminution de la recapture calcique par le SR.

## **9.4 FFR et sepsis**

Nous n'avons retrouvé de modification de FFR que sur les préparations de cardiomyocytes avec une inversion de la relation pour les cardiomyocytes de rats endotoxémiques. Par contre sur les cœurs isolés ou in vivo nous n'avons pas observé de perte ou d'inversion de FFR. La possibilité d'un effet du sepsis sur la FFR est probable car de nombreux mécanismes impliqués dans la FFR sont modifié au cours du sepsis. L'inversion de FFR que nous avons observé pourrait ainsi être le témoin d'une altération de ce mécanisme physiologique. Il ne faut pas négliger la possibilité d'un artéfact expérimental ai exagéré cette observation. En effet comme nous l'avons vu précédemment la FFR est particulièrement sensible aux conditions

expérimentales (température, milieu...). Cependant nos préparations contrôles ont été étudiées dans les mêmes conditions. Les différences observées entre les préparations de cardiomyocytes et le cœur isolé ou l'échographie *in vivo* restent donc à confirmer et/ou à expliciter.

Nous n'avons retrouvé qu'une publication faisant état de la relation force-fréquence dans le sepsis <sup>[462]</sup>. Dans ce travail Ren et al. ont mesuré le raccourcissement de cardiomyocytes isolés à partir de rats septiques par inoculation de matière fécale en intra-abdominal. Il ont fait varier la fréquence de 0.1 Hz à 5Hz. Ils retrouvent une FFR négative pour les animaux contrôles ainsi que pour les animaux septiques bien qu'elle soit significativement plus négative entre 3 et 5 Hz pour le groupe septique à 48h de l'inoculation (Figure 56). Ces résultats posent un problème d'interprétation, en effet, habituellement les études retrouvent chez le rat une FFR positive sur cette gamme de fréquence <sup>[28, 29, 41, 42]</sup> (figure 8), mais il est vrai que la plupart de ces études n'étaient pas réalisées sur des cardiomyocytes mais plutôt sur des fibres musculaires ou sur cœur isolé.



**Figure 56 : Relation force-fréquence et sepsis d'après Ren et al.**

Représentation en fonction de la fréquence de stimulation des raccourcissements maximaux (*Peak Shortening : PS*) de cardiomyocytes isolés à partir d'animaux contrôle ou à 24 ou 48 h d'une inoculation de matière septique en intra-abdominal. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur à 0,1 Hz. Les raccourcissements de base à 0,1Hz sont  $8.26\% \pm 0.65\%$ ,  $6.66\% \pm 0.65\%$ , et  $5.77\% \pm 0.97\%$ , pour les groupes contrôle, sepsis-24 h, et sepsis-48 h, respectivement. Moyenne  $\pm$  SEM, #  $p < 0.05$  vs. groupe contrôle. D'après <sup>[462]</sup>.

## 9.5 FDAR et sepsis

Pour la première fois, nous avons montré une altération de FDAR dans un modèle de choc septique. Les altérations de la relaxation myocardique dans le sepsis étaient déjà connues <sup>[8, 9]</sup> mais nous apportons ici un élément qui permet de mieux comprendre sa survenue. En effet avec un FDAR diminué le cœur se relâche moins vite, en résulte une réduction du temps de remplissage diastolique qui est déjà réduit par la diminution de la durée du cycle lors de la tachycardie. De plus peut survenir pour les fréquences les plus élevées un relâchement incomplet avec la survenue de la systole suivante avant la complète relaxation du myocarde cela abouti non seulement à une réduction du remplissage mais également à une réduction de la force contractile, le sarcomère n'ayant pas repris sa position optimale.

L'altération de la relation relaxation-fréquence est déjà connue dans d'autres pathologies comme l'insuffisance cardiaque systolique ou diastolique <sup>[463]</sup>. Dans ces pathologies un certain nombre de patients ont besoin d'une stimulation électrique artificielle (Pacemaker) cela permet dans le cadre d'un protocole expérimental de faire varier la fréquence cardiaque et donc d'évaluer FFR et FDAR in vivo chez le patient. Dans le cadre du choc septique la mise en place d'un protocole de d'évaluation de FFR et FDAR semble beaucoup plus complexe. En effet le caractère invasif et le risque de trouble du rythme grave de l'électro-entraînement artificiel ne semble pas sans risque pour le patient. Dans les services de réanimation, la plupart des patients à la phase aigue du choc septique sont sous sédatifs et nous avons envisagé la réalisation d'une investigation semblable à celle que nous avons effectué chez l'animal en variant les posologies de sédatif. Cette modification pourrait avoir lieu lors de périodes d'augmentation de sédation nécessaires à réalisation de soins désagréables ou lors de la diminution de la sédation, par exemple lors des arrêts quotidiens de sédation qui sont actuellement recommandés. Mais une telle procédure modifierait la fréquence cardiaque par une voie dépendante de la réponse sympathique, de plus la tachycardie que l'on retrouve au cours du choc septique persiste souvent même sous sédation, il n'est donc pas certain que ce type de procédé permette l'évaluation de FDAR.

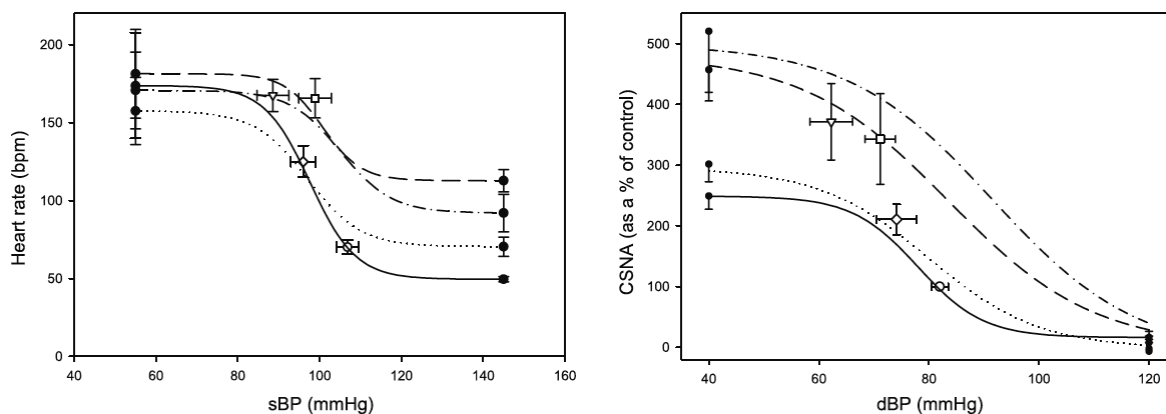


## 9.6 Mécanismes de la tachycardie septique

La tachycardie est un facteur de risque de mortalité en soit dans le contexte de sepsis <sup>[464]</sup>, de même il fait partie des items retenus comme étant des facteurs indépendants de mortalité dans le score APACHE, un des score de prédiction de mortalité le plus utilisé au monde <sup>[465]</sup>.

Peu de publications s'intéressent aux mécanismes de la tachycardie lors du choc septique, alors que celle-ci est quasi constante. On considère habituellement qu'elle est liée à l'augmentation du tonus adrénergique lié au sepsis et à la fièvre. On la rapporte également à une régulation sympathique liée au baroréflexe qui stimule la fréquence myocardique lors de l'hypovolémie et l'hypovolémie relative, qui survient suite à la vasoplégie périphérique, est une des caractéristiques du choc septique.

Dans une étude chez le mouton de l'activité du nerf sympathique cardiaque Ramchandra et al. montrent une augmentation d'activité sympathique lors du sepsis <sup>[466]</sup>. Cette activité semble rester dépendante du baroreflexe puisqu'elle augmente si la pression artérielle diminue. Par contre la régulation de la fréquence cardiaque par le baroreflexe est atténuée (figure 57). Des résultats similaires ont été retrouvés expérimentalement chez le rat par Vayssettes-Courchay et al. <sup>[467]</sup> qui de plus constatent que l'augmentation de fréquence peut être inhibée par des antagonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, mais que les antagonistes  $\alpha$  sont sans effet sur l'augmentation de fréquence cardiaque.



**Figure 57 : Effet du baroreflex sur la fréquence cardiaque et l'activité du nerf sympathique cardiaque et modifications par le sepsis.**

Mesure chez des moutons de la fréquence cardiaque (à gauche) et de l'activité du nerf sympathique cardiaque (CSNA) (à droite). Les lignes pleines représentent la réponse contrôlée avant l'injection d'E. coli, les lignes sous forme de tirets les données 8h après l'injection, les lignes alternant point et tiret les données 15h après l'injection et les lignes pointillées les données 32h après l'injection. Les variations de pression artérielle sont obtenues par l'administration de substance vaso-actives (phényléphrine et nitroprussiate de sodium). Les symboles représentent la position au repos des animaux au repos avec les SE respectives. ○, position de repos avant E. coli ; ▽, 8h après E. coli ; □, 15h après ; ◇, 32h après E. coli. La diminution de l'étendue en fréquence de la relation à 8h après E. coli montre la diminution de régulation de la fréquence par le baroréflexe dans ce groupe. On observe dans le groupe 8h et 15h une augmentation de CSNA. D'après <sup>[466]</sup>.

Chez les patients en choc septique, Annane et al. ont réalisé des évaluations du tonus sympathique par analyse spectrale de la variabilité de la fréquence cardiaque ainsi qu'une mesure des taux de catécholamines circulantes <sup>[319]</sup>. Ils retrouvent une diminution de la régulation sympathique de la fréquence cardiaque et du tonus vasculaire chez les patients septiques mais n'excluent pas qu'elles aient pu être augmentées initialement comme nous l'avons vu dans les études animales précédentes. De plus ils constatent des taux élevés de catécholamines circulantes. Ils évoquent la possibilité que les taux élevés de catécholamines circulantes diminuent la régulation centrale de ces mécanismes.

Ces différents éléments plaident pour une altération des mécanismes habituels de régulation de la fréquence cardiaque qui serait principalement accélérée par l'action des catécholamines circulantes via l'activation des récepteurs  $\beta$  malgré la réponse adrénergique diminuée au cours du choc septique <sup>[468]</sup>.

## 9.7 Evaluation de la fonction diastolique myocardique

Comme nous l'avons exposé plus haut : la tachycardie au cours du sepsis n'est pas régulée pour s'adapter à la chute de pression artérielle, de plus cette tachycardie est associée à une altération de FDAR qui va majorer les troubles de la relaxation myocardique lors du sepsis.

Il semble donc particulièrement nécessaire de suivre la fonction diastolique des patients en choc septique. L'outil de choix pour l'évaluation de la fonction diastolique au lit du malade est l'échocardiographie-Doppler. Elle permet de réaliser des examens répétés en fonction de l'évolution du patient ou des modifications des thérapeutiques et elle est non-invasive (ou peu-invasive s'il s'agit d'échographie trans-oesophagienne). Cependant ce n'est pas un outil de monitoring à proprement parler puisque l'examen échographique ne peut être maintenu en permanence. L'échographie est à associer à d'autres outils qui permettent le suivi en continu du patient.

A côté de la surveillance des paramètres de base que sont l'électrocardiogramme, la pression artérielle et la saturation par oxymètre de pouls. De nouveaux outils ont fait leur apparition depuis la perte de confiance dans le cathétérisme artériel pulmonaire que l'étude (très discutable) de Connors avait entraîné en 1996 <sup>[469]</sup>. Dans le but de remplacer le monitoring invasif que représente le cathétérisme de Swan-Ganz sont apparus des méthodes moins invasives de mesure du volume d'éjection systolique telles que l'analyse de l'onde de pouls qui peut être réalisée à l'aide d'un cathéter artériel périphérique et pour laquelle des techniques non-invasives sont en cours de développement. La surveillance de la saturation veineuse en oxygène s'est également largement répandue depuis l'étude de Rivers montrant qu'une réanimation précoce et dirigée sur un objectif d'adéquation entre les besoins métaboliques et les apports circulatoires permet une réduction de la mortalité des patients en choc septique.

L'intégration de l'évaluation de la fonction contractile et diastolique myocardique par échocardiographie s'intègre à cette stratégie d'adaptation individuelle de la thérapeutique visant à optimiser la circulation du patient, afin de minimiser les effets

délétères de l'hypoperfusion et ainsi laisser aux thérapeutiques anti-infectieuses et à l'organisme le temps de remplir leur rôle de lutte contre l'agent infectieux.

Le levosimendan est un médicament particulièrement intéressant dans notre problématique en effet il a montré avoir des effets de sensibilisation des myofibrilles au calcium. Il a des propriétés inotropes mais également lusitropes dans l'insuffisance cardiaque <sup>[470]</sup>. Son utilisation dans un modèle d'endotoxémie chez le lapin a également entraîné une amélioration de la contractilité et de la relaxation myocardique <sup>[360]</sup>. De plus il a un effet d'amélioration de la perfusion régionale <sup>[471]</sup> et pourrait avoir des effets protecteurs vis-à-vis de l'apoptose <sup>[472]</sup>. Son utilisation chez 28 patients présentant une défaillance contractile septique persistante malgré l'administration de dobutamine a permis une amélioration de la contractilité, de la délivrance en oxygène et de la perfusion régionale <sup>[359]</sup>. A ce jour, aucune étude de grande envergure sur l'utilisation du levosimendan dans le choc septique n'a été publiée.

## 10 CONCLUSION

Nous avons montré dans nos modèles *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* que la fonction contractile et la relaxation myocardique est altérée au cours du sepsis. Nous avons également pour la première fois montré une altération de l'accélération fréquence dépendante de la relaxation (FDAR) au cours de l'endotoxémie. Les résultats que nous obtenons sur l'altération de la relation force fréquence sont ambivalents et demandent à être approfondis.

Nous rapportons également des éléments permettant de comprendre la survenue de ces altérations fonctionnelles. Nos résultats sur le myocarde septique tendent à montrer que l'activation des caspases, protéases de la voie de l'apoptose, participe aux modifications des flux calciques, diminue la sensibilité des myofibrilles au calcium et entraîne des atteintes structurelles de l'appareil contractile. De plus les modifications observées de FDAR pourraient passer par l'augmentation induite par les caspases de l'activité de phosphatases qui participent à la régulation de la recapture calcique par le réticulum.

Malgré l'avancée importante dans le domaine thérapeutique du choc septique (réanimation hémodynamique précoce et optimisée, protéine c activée, corticoïdes) qui ont permis d'améliorer sensiblement le pronostic vital des patients septiques, le pronostic du choc septique reste sévère. De nouvelles stratégies thérapeutiques telles que l'optimisation de la relaxation ventriculaire ou la neutralisation du processus apoptotique par l'inhibition des caspases, pourrait s'avérer des stratégies particulièrement intéressantes dans le traitement de la défaillance cardiaque septique.

# 11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* Apr 2003;29(4):530-538.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* Jul 2001;29(7):1303-1310.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* Apr 17 2003;348(16):1546-1554.
4. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med.* Jul 15 2003;168(2):165-172.
5. Martin C, Riou B, Vallet B. *Physiologie Humaine Appliquée*. Rueil-Malmaison: Arnette; 2006.
6. Rabuel C, Mebazaa A. Septic shock: a heart story since the 1960s. *Intensive Care Med.* Jun 2006;32(6):799-807.
7. Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med.* Jun 2007;35(6):1599-1608.
8. Poelaert J, Declerck C, Vogelaers D, Colardyn F, Visser CA. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. *Intensive Care Med.* May 1997;23(5):553-560.
9. Bouhemad B, Nicolas-Robin A, Arbelot C, Arthaud M, Feger F, Rouby JJ. Isolated and reversible impairment of ventricular relaxation in patients with septic shock. *Crit Care Med.* Mar 2008;36(3):766-774.
10. Janssen PM, Periasamy M. Determinants of frequency-dependent contraction and relaxation of mammalian myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Nov 2007;43(5):523-531.
11. Opie LH. *Heart Physiology : from cell to circulation / 4th ed*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
12. Fabiato A, Fabiato F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann N Y Acad Sci.* Apr 28 1978;307:491-522.
13. Marx SO, Gaburjakova J, Gaburjakova M, Henrikson C, Ondrias K, Marks AR. Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ Res.* Jun 8 2001;88(11):1151-1158.
14. Shoshan-Barmatz V, Ashley RH. The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channels. *Int Rev Cytol.* 1998;183:185-270.

15. Sarkozi S, Szegedi C, Szentesi P, Csernoch L, Kovacs L, Jona I. Regulation of the rat sarcoplasmic reticulum calcium release channel by calcium. *J Muscle Res Cell Motil.* Feb 2000;21(2):131-138.
16. Balshaw DM, Xu L, Yamaguchi N, Pasek DA, Meissner G. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem.* Jun 8 2001;276(23):20144-20153.
17. Nabel EG. Cardiovascular disease. *N Engl J Med.* Jul 3 2003;349(1):60-72.
18. Stern MD, Cheng H. Putting out the fire: what terminates calcium-induced calcium release in cardiac muscle? *Cell Calcium.* Jun 2004;35(6):591-601.
19. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* Jan 10 2002;415(6868):198-205.
20. Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev.* Mar 1997;49(1):1-51.
21. Gaburjakova J, Gaburjakova M. Comparison of the effects exerted by luminal Ca<sup>2+</sup> on the sensitivity of the cardiac ryanodine receptor to caffeine and cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *J Membr Biol.* 2006;212(1):17-28.
22. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol.* Apr 15 1994;476(2):279-293.
23. Hove-Madsen L, Bers DM. Passive Ca buffering and SR Ca uptake in permeabilized rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol.* Mar 1993;264(3 Pt 1):C677-686.
24. Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol.* Apr 1998;274(4 Pt 2):H1335-1347.
25. Bowditch HP. Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber. Verh. Saechs. Akad. Wiss.* 1871;23:652-689.
26. Endoh M. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol.* Oct 1 2004;500(1-3):73-86.
27. Woodworth RS. Maximal contraction, "staircase" contraction, refractory period, and compensatory pause, of the heart. *Am. J. Physiol.* 1902;8:213-249.
28. Taylor DG, Parilak LD, LeWinter MM, Knot HJ. Quantification of the rat left ventricle force and Ca<sup>2+</sup> -frequency relationships: similarities to dog and human. *Cardiovasc Res.* Jan 1 2004;61(1):77-86.
29. Narayan P, McCune SA, Robitaille PM, Hohl CM, Altschuld RA. Mechanical alternans and the force-frequency relationship in failing rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* Jan 1995;27(1):523-530.
30. Bluhm WF, Kranias EG, Dillmann WH, Meyer M. Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jan 2000;278(1):H249-255.
31. Higginbotham MB, Morris KG, Williams RS, McHale PA, Coleman RE, Cobb FR. Regulation of stroke volume during submaximal and maximal upright exercise in normal man. *Circ Res.* Feb 1986;58(2):281-291.

32. Finkel MS, Oddis CV, Mayer OH, Hattler BG, Simmons RL. Nitric oxide synthase inhibitor alters papillary muscle force-frequency relationship. *J Pharmacol Exp Ther.* Feb 1995;272(2):945-952.
33. Bohm M, La Rosee K, Schmidt U, Schulz C, Schwinger RH, Erdmann E. Force-frequency relationship and inotropic stimulation in the nonfailing and failing human myocardium: implications for the medical treatment of heart failure. *Clin Investig.* May 1992;70(5):421-425.
34. Buckley NM, Penefsky ZJ, Litwak RS. Comparative force-frequency relationships in human and other mammalian ventricular myocardium. *Pflugers Arch.* 1972;332(4):259-270.
35. Penefsky ZJ, Buckley NM, Litwak RS. Effect of temperature and calcium on force-frequency relationships in mammalian ventricular myocardium. *Pflugers Arch.* 1972;332(4):271-282.
36. Schouten VJ, ter Keurs HE. The force-frequency relationship in rat myocardium. The influence of muscle dimensions. *Pflugers Arch.* Jul 1986;407(1):14-17.
37. Redel A, Baumgartner W, Golenhofen K, Drenckhahn D, Golenhofen N. Mechanical activity and force-frequency relationship of isolated mouse papillary muscle: effects of extracellular calcium concentration, temperature and contraction type. *Pflugers Arch.* Nov 2002;445(2):297-304.
38. Stull LB, Leppo MK, Marban E, Janssen PM. Physiological determinants of contractile force generation and calcium handling in mouse myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Oct 2002;34(10):1367-1376.
39. Tanaka H, Namekata I, Takeda K, et al. Unique excitation-contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jun 2005;371(6):526-534.
40. Litwin SE, Morgan JP. Effects of stimulation frequency on calcium transients in noninfarcted myocardium: modulation by chronic captopril treatment. *J Card Fail.* Sep 1999;5(3):224-235.
41. Schouten VJ, ter Keurs HE. Role of I<sub>Ca</sub> and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in the force-frequency relationship of rat heart muscle. *J Mol Cell Cardiol.* Sep 1991;23(9):1039-1050.
42. Vornanen M. Force-frequency relationship, contraction duration and recirculating fraction of calcium in postnatally developing rat heart ventricles: correlation with heart rate. *Acta Physiol Scand.* Aug 1992;145(4):311-321.
43. Mubagwa K, Lin W, Sipido K, Bosteels S, Flameng W. Monensin-induced reversal of positive force-frequency relationship in cardiac muscle: role of intracellular sodium in rest-dependent potentiation of contraction. *J Mol Cell Cardiol.* Mar 1997;29(3):977-989.
44. Endoh M. Frequency-dependent inhibition of the intracellular calcium transients by calmodulin antagonists in the aequorin-injected rabbit papillary muscle. *Adv Exp Med Biol.* 1989;255:461-470.
45. Koch-Weser J, Blinks JR. The Influence of the Interval between Beats on Myocardial Contractility. *Pharmacol Rev.* Sep 1963;15:601-652.
46. Allen DG, Blinks JR. Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature.* Jun 15 1978;273(5663):509-513.



47. Blinks JR, Wier WG, Hess P, Prendergast FG. Measurement of Ca<sup>2+</sup> concentrations in living cells. *Prog Biophys Mol Biol*. 1982;40(1-2):1-114.
48. Baudet S, Do E, Noireaud J, Le Marec H. Alterations in the force-frequency relationship by tert-butylbenzohydroquinone, a putative SR Ca<sup>2+</sup> pump inhibitor, in rabbit and rat ventricular muscle. *Br J Pharmacol*. Jan 1996;117(2):258-267.
49. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d' experimentation (2ème édition)*. Vol 1. Ottawa, Canada: Conseil Canadien de Protection des Animaux; 1993.
50. Gao WD, Perez NG, Marban E. Calcium cycling and contractile activation in intact mouse cardiac muscle. *J Physiol*. Feb 15 1998;507 ( Pt 1):175-184.
51. Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. Jul 9 1999;85(1):38-46.
52. Schmidt U, Hajjar RJ, Helm PA, Kim CS, Doye AA, Gwathmey JK. Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. Oct 1998;30(10):1929-1937.
53. Hashimoto K, Perez NG, Kusuoka H, Baker DL, Periasamy M, Marban E. Frequency-dependent changes in calcium cycling and contractile activation in SERCA2a transgenic mice. *Basic Res Cardiol*. Apr 2000;95(2):144-151.
54. Munch G, Bolck B, Brixius K, et al. SERCA2a activity correlates with the force-frequency relationship in human myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun 2000;278(6):H1924-1932.
55. Hagemann D, Xiao RP. Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart. *Trends Cardiovasc Med*. Feb 2002;12(2):51-56.
56. Isoda T, Paolucci N, Haghghi K, et al. Novel regulation of cardiac force-frequency relation by CREM (cAMP response element modulator). *FASEB J*. Feb 2003;17(2):144-151.
57. Meyer M, Bluhm WF, He H, et al. Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. *Am J Physiol*. Mar 1999;276(3 Pt 2):H779-785.
58. Schwinger RH, Brixius K, Bavendiek U, et al. Effect of cyclopiazonic acid on the force-frequency relationship in human nonfailing myocardium. *J Pharmacol Exp Ther*. Oct 1997;283(1):286-292.
59. Money-Kyrle AR, Davies CH, Ranu HK, et al. The role of cAMP in the frequency-dependent changes in contraction of guinea-pig cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. Feb 1998;37(2):532-540.
60. Stemmer P, Akera T. Concealed positive force-frequency relationships in rat and mouse cardiac muscle revealed by ryanodine. *Am J Physiol*. Dec 1986;251(6 Pt 2):H1106-1110.
61. Schlotthauer K, Schattmann J, Bers DM, et al. Frequency-dependent changes in contribution of SR Ca<sup>2+</sup> to Ca<sup>2+</sup> transients in failing human myocardium assessed with ryanodine. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 1998;30(7):1285-1294.
62. Layland J, Kentish JC. Positive force- and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am J Physiol*. Jan 1999;276(1 Pt 2):H9-H18.

63. Maier LS, Bers DM, Pieske B. Differences in Ca(2+)-handling and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Dec 2000;32(12):2249-2258.
64. Morii I, Kihara Y, Konishi T, Inubushi T, Sasayama S. Mechanism of the negative force-frequency relationship in physiologically intact rat ventricular myocardium--studies by intracellular Ca<sup>2+</sup> monitor with indo-1 and by <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Jpn Circ J.* Aug 1996;60(8):593-603.
65. Rossman EI, Petre RE, Chaudhary KW, et al. Abnormal frequency-dependent responses represent the pathophysiologic signature of contractile failure in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Jan 2004;36(1):33-42.
66. Reuter H, Zobel C, Brixius K, Bolck B, Schwinger RH. The force-frequency relationship is dependent on Ca(2+)-influx via L-type- and SR-Ca(2+)-channels in human heart. *Basic Res Cardiol.* Jun 1999;94(3):159-170.
67. Cohen CJ, Fozzard HA, Sheu SS. Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle. *Circ Res.* May 1982;50(5):651-662.
68. Boyett MR, Hart G, Levi AJ, Roberts A. Effects of repetitive activity on developed force and intracellular sodium in isolated sheep and dog Purkinje fibres. *J Physiol.* Jul 1987;388:295-322.
69. Wang DY, Chae SW, Gong QY, Lee CO. Role of aiNa in positive force-frequency staircase in guinea pig papillary muscle. *Am J Physiol.* Dec 1988;255(6 Pt 1):C798-807.
70. Frampton JE, Harrison SM, Boyett MR, Orchard CH. Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> in rat myocytes showing different force-frequency relationships. *Am J Physiol.* Nov 1991;261(5 Pt 1):C739-750.
71. Muller-Ehmsen J, Brixius K, Schulze C, Schwinger RH. Na<sup>+</sup> channel modulation and force-frequency relationship in human myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jun 1997;355(6):727-732.
72. Pieske B, Maier LS, Piacentino V, 3rd, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S. Rate dependence of [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and contractility in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation.* Jul 23 2002;106(4):447-453.
73. Flesch M, Schwinger RH, Schiffer F, et al. Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger in failing human myocardium. *Circulation.* Sep 1 1996;94(5):992-1002.
74. Namekata I, Takeda K, Moriwaki R, et al. Role of the sodium-calcium exchanger in excitation-contraction coupling of mouse myocardium. *J Pharmacol. Sci.* 2004;94((Suppl. I)):272P.
75. Bolck B, Munch G, Mackenstein P, et al. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger overexpression impairs frequency- and ouabain-dependent cell shortening in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Oct 2004;287(4):H1435-1445.
76. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol.* Aug 2002;34(8):919-939.
77. Schaub MC, Heizmann CW. Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: from myocardial basics to new therapeutic strategies. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 25 2008;369(1):247-264.

78. Crivici A, Ikura M. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1995;24:85-116.
79. Meissner G. Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front Biosci.* Nov 1 2002;7:d2072-2080.
80. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:417-445.
81. De Koninck P, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science.* Jan 9 1998;279(5348):227-230.
82. Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta.* Mar 10 1994;1221(1):89-101.
83. Kennedy MB, Greengard P. Two calcium/calmodulin-dependent protein kinases, which are highly concentrated in brain, phosphorylate protein I at distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 1981;78(2):1293-1297.
84. Jett MF, Schworer CM, Bass M, Soderling TR. Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Arch Biochem Biophys.* Jun 1987;255(2):354-360.
85. Uemura A, Okazaki K, Takesue H, Matsubara T, Hidaka H. A novel Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase lacking autophosphorylation activity in the rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 15 1995;211(2):562-569.
86. Hook SS, Means AR. Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:471-505.
87. Anderson ME. Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. *Pharmacol Ther.* Apr 2005;106(1):39-55.
88. Kolodziej SJ, Hudmon A, Waxham MN, Stoops JK. Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase IIalpha and truncated CaM kinase IIalpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains. *J Biol Chem.* May 12 2000;275(19):14354-14359.
89. Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem.* Oct 25 1989;264(30):17907-17912.
90. Srinivasan M, Edman CF, Schulman H. Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol.* Aug 1994;126(4):839-852.
91. Colbran RJ, Soderling TR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Curr Top Cell Regul.* 1990;31:181-221.
92. Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H. Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1986;83(24):9497-9501.
93. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science.* May 22 1992;256(5060):1199-1202.

94. Hashimoto Y, Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR. Autophosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. Effects on total and Ca<sup>2+</sup>-independent activities and kinetic parameters. *J Biol Chem*. Jun 15 1987;262(17):8051-8055.
95. Lai Y, Nairn AC, Greengard P. Autophosphorylation reversibly regulates the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependence of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 1986;83(12):4253-4257.
96. Miller SG, Kennedy MB. Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch. *Cell*. Mar 28 1986;44(6):861-870.
97. Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR. Reversible generation of a Ca<sup>2+</sup>-independent form of Ca<sup>2+</sup>(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem*. Jul 5 1986;261(19):8581-8584.
98. Putney JW, Jr. Calcium signaling: up, down, up, down...what's the point? *Science*. Jan 9 1998;279(5348):191-192.
99. Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balser JR, Anderson ME. Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol*. Mar 2000;2(3):173-177.
100. Currie S, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J*. Jan 15 2004;377(Pt 2):357-366.
101. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res*. Apr 2 2004;94(6):e61-70.
102. Kranias EG, Gupta RC, Jakab G, Kim HW, Steenaart NA, Rapundalo ST. The role of protein kinases and protein phosphatases in the regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum function. *Mol Cell Biochem*. Jul-Aug 1988;82(1-2):37-44.
103. Tanaka T, Ohmura T, Yamakado T, Hidaka H. Two types of calcium-dependent protein phosphorylations modulated by calmodulin antagonists. Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol*. Sep 1982;22(2):408-412.
104. Babu A, Gulati J. Trifluoperazine inhibition of contraction in permeabilized skeletal, cardiac and smooth muscles. *Biochem Biophys Res Commun*. Feb 14 1990;166(3):1421-1428.
105. Yuan W, Bers DM. Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol*. Sep 1994;267(3 Pt 2):H982-993.
106. Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*. May 13 1999;399(6732):159-162.
107. Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA. Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca<sup>2+</sup>-induced enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res*. Nov 1994;75(5):854-861.

108. Xiao RP, Cheng H, Lederer WJ, Suzuki T, Lakatta EG. Dual regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 27 1994;91(20):9659-9663.
109. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res*. May 2 2003;92(8):904-911.
110. Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, et al. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res*. Feb 3 2006;98(2):235-244.
111. Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS. CaMKII tethers to L-type Ca<sup>2+</sup> channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca<sup>2+</sup> signals for facilitation. *J Cell Biol*. Nov 7 2005;171(3):537-547.
112. Grueter CE, Abiria SA, Dzshura I, et al. L-type Ca<sup>2+</sup> channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Mol Cell*. Sep 1 2006;23(5):641-650.
113. Lokuta AJ, Rogers TB, Lederer WJ, Valdivia HH. Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Physiol*. Sep 15 1995;487 ( Pt 3):609-622.
114. Delgado C, Artiles A, Gomez AM, Vassort G. Frequency-dependent increase in cardiac Ca<sup>2+</sup> current is due to reduced Ca<sup>2+</sup> release by the sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*. Oct 1999;31(10):1783-1793.
115. Wu LL, Ji Y, Dong LW, Liu MS. Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum is impaired during the hypodynamic phase of sepsis in the rat heart. *Shock*. Jan 2001;15(1):49-55.
116. Takamatsu H, Nagao T, Ichijo H, Adachi-Akahane S. L-type Ca<sup>2+</sup> channels serve as a sensor of the SR Ca<sup>2+</sup> for tuning the efficacy of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. Oct 15 2003;552(Pt 2):415-424.
117. Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM. The effect of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol*. May 15 1997;501 ( Pt 1):17-31.
118. Guo T, Zhang T, Mestril R, Bers DM. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res*. Aug 18 2006;99(4):398-406.
119. Bers DM, Li L, Satoh H, McCall E. Factors that control sarcoplasmic reticulum calcium release in intact ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. Sep 16 1998;853:157-177.
120. Suematsu N, Satoh S, Ueda Y, Makino N. Effects of calmodulin and okadaic acid on myofibrillar Ca<sup>2+</sup> sensitivity in cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol*. Mar 2002;97(2):137-144.
121. Janssen PM, Stull LB, Marban E. Myofilament properties comprise the rate-limiting step for cardiac relaxation at body temperature in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb 2002;282(2):H499-507.
122. Hiranandani N, Varian KD, Monasky MM, Janssen PM. Frequency-dependent contractile response of isolated cardiac trabeculae under hypo-, normo-, and hyperthermic conditions. *J Appl Physiol*. May 2006;100(5):1727-1732.

123. Raman S, Kelley MA, Janssen PM. Effect of muscle dimensions on trabecular contractile performance under physiological conditions. *Pflugers Arch*. Feb 2006;451(5):625-630.
124. Yellin EL, Hori M, Yoran C, Sonnenblick EH, Gabbay S, Frater RW. Left ventricular relaxation in the filling and nonfilling intact canine heart. *Am J Physiol*. Apr 1986;250(4 Pt 2):H620-629.
125. Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest*. Sep 1976;58(3):751-760.
126. Buckberg G, Hoffman JI, Mahajan A, Saleh S, Coghlan C. Cardiac mechanics revisited: the relationship of cardiac architecture to ventricular function. *Circulation*. Dec 9 2008;118(24):2571-2587.
127. Slama M, Ahn J, Peltier M, et al. Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 2005;289(3):H1131-1136.
128. Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM. CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*. Feb 1995;268(2 Pt 2):H703-712.
129. Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*. Nov-Dec 2002;32(5-6):279-305.
130. Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, et al. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res*. Jul 1987;61(1):70-76.
131. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Kruger C, Erdmann E. Altered diastolic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> handling in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Am Heart J*. Apr 1995;129(4):684-689.
132. Schouten VJ. Interval dependence of force and twitch duration in rat heart explained by Ca<sup>2+</sup> pump inactivation in sarcoplasmic reticulum. *J Physiol*. Dec 1990;431:427-444.
133. Valverde CA, Mundina-Weilenmann C, Said M, et al. Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: a property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation. *J Physiol*. Feb 1 2005;562(Pt 3):801-813.
134. Hussain M, Drago GA, Colyer J, Orchard CH. Rate-dependent abbreviation of Ca<sup>2+</sup> transient in rat heart is independent of phospholamban phosphorylation. *Am J Physiol*. Aug 1997;273(2 Pt 2):H695-706.
135. Tada M, Toyofuku T. Molecular regulation of phospholamban function and expression. *Trends Cardiovasc Med*. Nov 1998;8(8):330-340.
136. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jul 2003;4(7):566-577.
137. Paterlini MG, Thomas DD. The alpha-helical propensity of the cytoplasmic domain of phospholamban: a molecular dynamics simulation of the effect of phosphorylation and mutation. *Biophys J*. May 2005;88(5):3243-3251.
138. Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol*. Dec 2000;32(12):2131-2139.
139. Colyer J, Wang JH. Dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump activity on the phosphorylation status of phospholamban. *J Biol Chem*. Sep 15 1991;266(26):17486-17493.

140. Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM, et al. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J Clin Invest.* Jan 15 1996;97(2):533-539.
141. Asahi M, McKenna E, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Physical interactions between phospholamban and sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases are dissociated by elevated Ca<sup>2+</sup>, but not by phospholamban phosphorylation, vanadate, or thapsigargin, and are enhanced by ATP. *J Biol Chem.* May 19 2000;275(20):15034-15038.
142. Chu G, Kranias EG. Functional interplay between dual site phospholamban phosphorylation: insights from genetically altered mouse models. *Basic Res Cardiol.* 2002;97 Suppl 1:143-48.
143. Kimura Y, Asahi M, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Phospholamban domain Ib mutations influence functional interactions with the Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* Jun 5 1998;273(23):14238-14241.
144. Odermatt A, Kurzydowski K, MacLennan DH. The v<sub>max</sub> of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban. *J Biol Chem.* Jun 14 1996;271(24):14206-14213.
145. MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem.* Mar 28 1991;196(3):725-734.
146. Napolitano R, Vittone L, Mundina C, Chiappe de Cingolani G, Mattiazzi A. Phosphorylation of phospholamban in the intact heart. A study on the physiological role of the Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase system. *J Mol Cell Cardiol.* Apr 1992;24(4):387-396.
147. Luo W, Grupp IL, Harrer J, et al. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res.* Sep 1994;75(3):401-409.
148. Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Mar 2000;278(3):H769-779.
149. Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP. Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* Jul 21 2000;275(29):22532-22536.
150. Werdich AA, Lima EA, Dzura I, et al. Differential effects of phospholamban and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients in cardiac myocytes at physiological stimulation frequencies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* May 2008;294(5):H2352-2362.
151. DeSantiago J, Maier LS, Bers DM. Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* Aug 2002;34(8):975-984.
152. Zhao W, Uehara Y, Chu G, et al. Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol.* Aug 2004;37(2):607-612.

153. Kassiri Z, Myers R, Kaprielian R, Banijamali HS, Backx PH. Rate-dependent changes of twitch force duration in rat cardiac trabeculae: a property of the contractile system. *J Physiol*. Apr 1 2000;524 Pt 1:221-231.
154. Huke S, Bers DM. Temporal dissociation of frequency-dependent acceleration of relaxation and protein phosphorylation by CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*. Mar 2007;42(3):590-599.
155. Depaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, et al. Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv Enzyme Regul*. 1994;34:199-224.
156. Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev*. Jan 2000;80(1):173-210.
157. Gombosova I, Boknik P, Kirchhefer U, et al. Postnatal changes in contractile time parameters, calcium regulatory proteins, and phosphatases. *Am J Physiol*. Jun 1998;274(6 Pt 2):H2123-2132.
158. Schillinger W, Lehnart SE, Prestle J, et al. Influence of SR Ca(2+)-ATPase and Na(+)-Ca(2+)-exchanger on the force-frequency relation. *Basic Res Cardiol*. 1998;93 Suppl 1:38-45.
159. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, et al. Relationship between Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*. Feb 9 1999;99(5):641-648.
160. Rodriguez EK, Hunter WC, Royce MJ, Leppo MK, Douglas AS, Weisman HF. A method to reconstruct myocardial sarcomere lengths and orientations at transmural sites in beating canine hearts. *Am J Physiol*. Jul 1992;263(1 Pt 2):H293-306.
161. Kentish JC, ter Keurs HE, Ricciardi L, Bucx JJ, Noble MI. Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of calcium concentrations on these relations. *Circ Res*. Jun 1986;58(6):755-768.
162. Edman KA. The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres. *J Physiol*. Jun 1979;291:143-159.
163. ter Keurs HE, de Tombe PP. Determinants of velocity of sarcomere shortening in mammalian myocardium. *Adv Exp Med Biol*. 1993;332:649-664; discussion 664-645.
164. Picht E, DeSantiago J, Huke S, Kaetzel MA, Dedman JR, Bers DM. CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits frequency-dependent acceleration of relaxation and Ca<sup>2+</sup> current facilitation. *J Mol Cell Cardiol*. Jan 2007;42(1):196-205.
165. Janssen PM, Hunter WC. Force, not sarcomere length, correlates with prolongation of isosarcometric contraction. *Am J Physiol*. Aug 1995;269(2 Pt 2):H676-685.
166. Varian KD, Janssen PM. Frequency-dependent acceleration of relaxation involves decreased myofilament calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May 2007;292(5):H2212-2219.
167. Kranias EG, Solaro RJ. Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. *Nature*. Jul 8 1982;298(5870):182-184.



168. Varian KD, Raman S, Janssen PM. Measurement of myofilament calcium sensitivity at physiological temperature in intact cardiac trabeculae. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* May 2006;290(5):H2092-2097.
169. Bilchick KC, Duncan JG, Ravi R, et al. Heart failure-associated alterations in troponin I phosphorylation impair ventricular relaxation-afterload and force-frequency responses and systolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jan 2007;292(1):H318-325.
170. Takimoto E, Soergel DG, Janssen PM, Stull LB, Kass DA, Murphy AM. Frequency- and afterload-dependent cardiac modulation in vivo by troponin I with constitutively active protein kinase A phosphorylation sites. *Circ Res.* Mar 5 2004;94(4):496-504.
171. Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD. Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res.* Jun 1995;76(6):1028-1035.
172. Silver PJ, Buja LM, Stull JT. Frequency-dependent myosin light chain phosphorylation in isolated myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Jan 1986;18(1):31-37.
173. Dias FA, Walker LA, Arteaga GM, et al. The effect of myosin regulatory light chain phosphorylation on the frequency-dependent regulation of cardiac function. *J Mol Cell Cardiol.* Aug 2006;41(2):330-339.
174. Morano I, Hofmann F, Zimmer M, Ruegg JC. The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres. *FEBS Lett.* Sep 23 1985;189(2):221-224.
175. Langley JN, Orbeli LA. Observations on the sympathetic and sacral autonomic system of the frog. *J Physiol.* Dec 31 1910;41(5):450-482.
176. Ackerknecht EH. The history of the discovery of the vegetative (autonomic) nervous system. *Med Hist.* Jan 1974;18(1):1-8.
177. Dalens B. *Traité d'anesthésie générale.* Rueil-Malmaison: Arnette; 2001.
178. Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* Jun 1948;153(3):586-600.
179. Bylund DB. Alpha- and beta-adrenergic receptors: Ahlquist's landmark hypothesis of a single mediator with two receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Dec 2007;293(6):E1479-1481.
180. Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel SM. Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev.* Jun 1993;45(2):147-175.
181. Lacolley P, Babuty D, Boulanger C, et al. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux.* Montrouge: John Libbey Eurotext; 2007.
182. Gauthier C, Seze-Goismier C, Rozec B. Beta 3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007;37(1-2):193-204.
183. Brodde OE, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol.* Nov 2001;96(6):528-538.
184. Steinberg SF, Brunton LL. Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:751-773.
185. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, et al. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res.* Oct 13 2006;99(8):816-828.

186. Zhou YY, Cheng H, Bogdanov KY, et al. Localized cAMP-dependent signaling mediates beta 2-adrenergic modulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Am J Physiol*. Sep 1997;273(3 Pt 2):H1611-1618.
187. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, et al. Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci*. Jun 2006;27(6):330-337.
188. Wang W, Zhu W, Wang S, et al. Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res*. Oct 15 2004;95(8):798-806.
189. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, et al. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest*. Oct 1 1998;102(7):1377-1384.
190. DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol*. Aug 1986;377:61-88.
191. Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature*. Feb 17-23 1983;301(5901):569-574.
192. Barbuti A, DiFrancesco D. Control of cardiac rate by "funny" channels in health and disease. *Ann N Y Acad Sci*. Mar 2008;1123:213-223.
193. Yanagihara K, Noma A, Irisawa H. Reconstruction of sino-atrial node pacemaker potential based on the voltage clamp experiments. *Jpn J Physiol*. 1980;30(6):841-857.
194. Chakraborti S, Chakraborti T, Shaw G. beta-adrenergic mechanisms in cardiac diseases: a perspective. *Cell Signal*. Aug 2000;12(8):499-513.
195. Wang H, Han H, Zhang L, et al. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol Pharmacol*. May 2001;59(5):1029-1036.
196. Wang H, Lu Y, Wang Z. Function of cardiac M3 receptors. *Auton Autacoid Pharmacol*. Jan 2007;27(1):1-11.
197. Wang Z, Shi H, Wang H. Functional M3 muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts. *Br J Pharmacol*. Jun 2004;142(3):395-408.
198. Gomeza J, Shannon H, Kostenis E, et al. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 16 1999;96(4):1692-1697.
199. Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev*. Dec 1998;50(4):723-760.
200. DiFrancesco D, Ducouret P, Robinson RB. Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science*. Feb 3 1989;243(4891):669-671.
201. MacLean LD, Mulligan WG, McLean AP, Duff JH. Patterns of septic shock in man--a detailed study of 56 patients. *Ann Surg*. Oct 1967;166(4):543-562.
202. Clowes GH, Jr., Vucinic M, Weidner MG. Circulatory and metabolic alterations associated with survival or death in peritonitis: clinical analysis of 25 cases. *Ann Surg*. Jun 1966;163(6):866-885.
203. Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C, Alling DW, Parrillo JE. Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med*. Oct 1987;15(10):923-929.

204. Parker MM, Suffredini AF, Natanson C, Ognibene FP, Shelhamer JH, Parrillo JE. Responses of left ventricular function in survivors and nonsurvivors of septic shock. *Journal of Critical Care*. 1989;4(1):19-25.
205. Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*. Apr 1984;100(4):483-490.
206. Vieillard-Baron A, Caille V, Charron C, Belliard G, Page B, Jardin F. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. *Crit Care Med*. Jun 2008;36(6):1701-1706.
207. Nishijima H, Weil MH, Shubin H, Cavanilles J. Hemodynamic and metabolic studies on shock associated with gram negative bacteremia. *Medicine (Baltimore)*. Jul 1973;52(4):287-294.
208. Packman MI, Rackow EC. Optimum left heart filling pressure during fluid resuscitation of patients with hypovolemic and septic shock. *Crit Care Med*. Mar 1983;11(3):165-169.
209. Michard F, Teboul JL. Using heart-lung interactions to assess fluid responsiveness during mechanical ventilation. *Crit Care*. 2000;4(5):282-289.
210. Vieillard Baron A, Schmitt JM, Beauchet A, et al. Early preload adaptation in septic shock? A transesophageal echocardiographic study. *Anesthesiology*. Mar 2001;94(3):400-406.
211. Ognibene FP, Parker MM, Natanson C, Shelhamer JH, Parrillo JE. Depressed left ventricular performance. Response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest*. May 1988;93(5):903-910.
212. Ozier Y, Gueret P, Jardin F, Farcot JC, Bourdarias JP, Margairaz A. Two-dimensional echocardiographic demonstration of acute myocardial depression in septic shock. *Crit Care Med*. Jul 1984;12(7):596-599.
213. Jardin F, Fourme T, Page B, et al. Persistent preload defect in severe sepsis despite fluid loading: A longitudinal echocardiographic study in patients with septic shock. *Chest*. Nov 1999;116(5):1354-1359.
214. Vieillard-Baron A, Prin S, Chergui K, Dubourg O, Jardin F. Hemodynamic instability in sepsis: bedside assessment by Doppler echocardiography. *Am J Respir Crit Care Med*. Dec 1 2003;168(11):1270-1276.
215. Parker MM, McCarthy KE, Ognibene FP, Parrillo JE. Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest*. Jan 1990;97(1):126-131.
216. Jardin F, Brun-Ney D, Auvert B, Beauchet A, Bourdarias JP. Sepsis-related cardiogenic shock. *Crit Care Med*. Oct 1990;18(10):1055-1060.
217. Kimchi A, Ellrodt AG, Berman DS, Riedinger MS, Swan HJ, Murata GH. Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study. *J Am Coll Cardiol*. Nov 1984;4(5):945-951.
218. Jardin F, Vieillard-Baron A. Acute cor pulmonale. *Curr Opin Crit Care*. Feb 2009;15(1):67-70.
219. Vieillard-Baron A, Prin S, Chergui K, Dubourg O, Jardin F. Echo-Doppler demonstration of acute cor pulmonale at the bedside in the medical intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med*. Nov 15 2002;166(10):1310-1319.
220. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of

- Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. Sep 2000;36(3):959-969.
221. Fernandes CJ, Jr., Akamine N, Knobel E. Cardiac troponin: a new serum marker of myocardial injury in sepsis. *Intensive Care Med*. Oct 1999;25(10):1165-1168.
  222. Turner A, Tsamitros M, Bellomo R. Myocardial cell injury in septic shock. *Crit Care Med*. Sep 1999;27(9):1775-1780.
  223. Thiru Y, Pathan N, Bignall S, Habibi P, Levin M. A myocardial cytotoxic process is involved in the cardiac dysfunction of meningococcal septic shock. *Crit Care Med*. Aug 2000;28(8):2979-2983.
  224. Hardman JM, Earle KM. Myocarditis in 200 fatal meningococcal infections. *Arch Pathol*. Mar 1969;87(3):318-325.
  225. de Kleijn ED, Hazelzet JA, Kornelisse RF, de Groot R. Pathophysiology of meningococcal sepsis in children. *Eur J Pediatr*. Nov 1998;157(11):869-880.
  226. Kirsch EA, Barton RP, Kitchen L, Giroir BP. Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr Infect Dis J*. Nov 1996;15(11):967-978; quiz 979.
  227. Spies C, Haude V, Fitzner R, et al. Serum cardiac troponin T as a prognostic marker in early sepsis. *Chest*. Apr 1998;113(4):1055-1063.
  228. ver Elst KM, Spapen HD, Nguyen DN, Garbar C, Huyghens LP, Gorus FK. Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. *Clin Chem*. May 2000;46(5):650-657.
  229. Dhainaut JF, Huyghebaert MF, Monsallier JF, et al. Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation*. Mar 1987;75(3):533-541.
  230. Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation*. Apr 1986;73(4):637-644.
  231. Fernandes Junior CJ, Iervolino M, Neves RA, Sampaio EL, Knobel E. Interstitial myocarditis in sepsis. *Am J Cardiol*. Nov 1 1994;74(9):958.
  232. Wu AH. Increased troponin in patients with sepsis and septic shock: myocardial necrosis or reversible myocardial depression? *Intensive Care Med*. Jun 2001;27(6):959-961.
  233. Suleiman MS, Lucchetti V, Caputo M, Angelini GD. Short periods of regional ischaemia and reperfusion provoke release of troponin I from the human hearts. *Clin Chim Acta*. Jun 15 1999;284(1):25-30.
  234. Wu AH, Ford L. Release of cardiac troponin in acute coronary syndromes: ischemia or necrosis? *Clin Chim Acta*. Jun 30 1999;284(2):161-174.
  235. Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, et al. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. *N Engl J Med*. Jul 16 1992;327(3):146-150.
  236. Favory R, Neviere R. Significance and interpretation of elevated troponin in septic patients. *Crit Care*. 2006;10(4):224.
  237. Favory R, Nevière R. Les marqueurs biologiques en réanimation cardiovasculaire : du nouveau en 2008 ? *Réanimation*. 2008;17(2):171-176.
  238. Bersten AD, Sibbald WJ, Hersch M, Cheung H, Rutledge FS. Interaction of sepsis and sepsis plus sympathomimetics on myocardial oxygen availability. *Am J Physiol*. Apr 1992;262(4 Pt 2):H1164-1173.

239. Solomon MA, Correa R, Alexander HR, et al. Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis. *Am J Physiol*. Feb 1994;266(2 Pt 2):H757-768.
240. Avontuur JA, Bruining HA, Ince C. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ Res*. Mar 1995;76(3):418-425.
241. Goddard CM, Allard MF, Hogg JC, Herbertson MJ, Walley KR. Prolonged leukocyte transit time in coronary microcirculation of endotoxemic pigs. *Am J Physiol*. Oct 1995;269(4 Pt 2):H1389-1397.
242. Groeneveld AB, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Bronsveld W, Nauta JJ, Thijs LG. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc Res*. Jan 1991;25(1):80-88.
243. Pohl U, Lamontagne D, Bassenge E, Busse R. Attenuation of coronary autoregulation in the isolated rabbit heart by endothelium derived nitric oxide. *Cardiovasc Res*. Mar 1994;28(3):414-419.
244. Ueeda M, Silvia SK, Olsson RA. Nitric oxide modulates coronary autoregulation in the guinea pig. *Circ Res*. Jun 1992;70(6):1296-1303.
245. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*. Jan 1-7 2005;365(9453):63-78.
246. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*. Sep 2002;323(1-2):59-72.
247. Lynn WA. Anti-endotoxin therapeutic options for the treatment of sepsis. *J Antimicrob Chemother*. Jan 1998;41 Suppl A:71-80.
248. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*. Apr 2004;12(4):186-192.
249. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. Oct 2004;113(2):153-162.
250. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. Jan 2005;17(1):1-14.
251. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J*. Sep 1 2004;382(Pt 2):393-409.
252. Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, et al. Overexpression of cardiac I-kappaBalpha prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2001;280(3):H962-968.
253. Dawn B, Xuan YT, Marian M, et al. Cardiac-specific abrogation of NF-kappa B activation in mice by transdominant expression of a mutant I kappa B alpha. *J Mol Cell Cardiol*. Jan 2001;33(1):161-173.
254. Murphy K, Haudek SB, Thompson M, Giroir BP. Molecular biology of septic shock. *New Horiz*. May 1998;6(2):181-193.
255. Colonna M. TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol*. Jun 2003;3(6):445-453.
256. Seydel U, Scheel O, Muller M, Brandenburg K, Blunck R. A K+ channel is involved in LPS signaling. *J Endotoxin Res*. 2001;7(3):243-247.
257. Lowry MA, Goldberg JI, Belosevic M. Induction of nitric oxide (NO) synthesis in murine macrophages requires potassium channel activity. *Clin Exp Immunol*. Mar 1998;111(3):597-603.

258. Haslberger A, Romanin C, Koerber R. Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Mol Biol Cell*. Apr 1992;3(4):451-460.
259. Blunck R, Scheel O, Muller M, Brandenburg K, Seitzer U, Seydel U. New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K<sup>+</sup> channel in transmembrane signaling. *J Immunol*. Jan 15 2001;166(2):1009-1015.
260. Wiggers CJ. Myocardial depression in shock. A survey of cardiodynamic studies. *Am Heart J*. 1947;33:633-650.
261. Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. 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*. Oct 1985;76(4):1539-1553.
262. Reilly JM, Cunnion RE, Burch-Whitman C, Parker MM, Shelhamer JH, Parrillo JE. A circulating myocardial depressant substance is associated with cardiac dysfunction and peripheral hypoperfusion (lactic acidemia) in patients with septic shock. *Chest*. May 1989;95(5):1072-1080.
263. Benassayag C, Christeff N, Auclair MC, et al. Early released lipid-soluble cardiodepressant factor and elevated oestrogenic substances in human septic shock. *Eur J Clin Invest*. Aug 1984;14(4):288-294.
264. Pathan N, Sandiford C, Harding SE, Levin M. Characterization of a myocardial depressant factor in meningococcal septicemia. *Crit Care Med*. Oct 2002;30(10):2191-2198.
265. Sagher U, Rosen H, Sarel O, Becker Y. Studies on a pancreatic cardiodepressant factor. *Circ Shock*. 1986;19(3):319-327.
266. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*. Mar 1 1996;183(3):949-958.
267. Genaud P, Vinsonneau C, Cariou A. Dysfonction myocardique et sepsis : physiopathologie et perspectives thérapeutiques Myocardial dysfunction and sepsis: physiopathology and therapeutic perspectives. *Réanimation*. 2001;10(2):153-161.
268. Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res*. Dec 10 2004;95(12):1140-1153.
269. Tio RA, Nieken J, de Vries EG, et al. Negative inotropic effects of recombinant interleukin 2 in patients without left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail*. Jun 2000;2(2):167-173.
270. Maass DL, White J, Horton JW. IL-1beta and IL-6 act synergistically with TNF-alpha to alter cardiac contractile function after burn trauma. *Shock*. Oct 2002;18(4):360-366.
271. Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, et al. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet*. Jan 17 2004;363(9404):203-209.
272. Garner LB, Willis MS, Carlson DL, et al. Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Dec 2003;285(6):H2500-2509.

273. Chagnon F, Metz CN, Bucala R, Lesur O. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization. *Circ Res.* May 27 2005;96(10):1095-1102.
274. Pagani FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner MS. Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs. *J Clin Invest.* Aug 1992;90(2):389-398.
275. Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol.* Aug 1996;28(8):1631-1639.
276. Schulz R, Panas DL, Catena R, Moncada S, Olley PM, Lopaschuk GD. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Pharmacol.* Jan 1995;114(1):27-34.
277. Amadou A, Nawrocki A, Best-Belpomme M, Pavoine C, Pecker F. Arachidonic acid mediates dual effect of TNF-alpha on Ca<sup>2+</sup> transients and contraction of adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* Jun 2002;282(6):C1339-1347.
278. Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, et al. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> current and Ca<sup>2+</sup> transients. *FEBS Lett.* Nov 27 1995;376(1-2):24-30.
279. Schreur KD, Liu S. Involvement of ceramide in inhibitory effect of IL-1 beta on L-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* Jun 1997;272(6 Pt 2):H2591-2598.
280. Cao CM, Xia Q, Bruce IC, et al. Influence of interleukin-2 on Ca<sup>2+</sup> handling in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* Dec 2003;35(12):1491-1503.
281. Cao CM, Xia Q, Bruce IC, Zhang X, Fu C, Chen JZ. Interleukin-2 increases activity of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, but decreases its sensitivity to calcium in rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* Aug 2003;306(2):572-580.
282. Yu XW, Chen Q, Kennedy RH, Liu SJ. Inhibition of sarcoplasmic reticular function by chronic interleukin-6 exposure via iNOS in adult ventricular myocytes. *J Physiol.* Jul 15 2005;566(Pt 2):327-340.
283. Yu XW, Liu MY, Kennedy RH, Liu SJ. Both cGMP and peroxynitrite mediate chronic interleukin-6-induced negative inotropy in adult rat ventricular myocytes. *J Physiol.* Jul 15 2005;566(Pt 2):341-353.
284. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* Jul 17 1992;257(5068):387-389.
285. Kumar A, Brar R, Wang P, et al. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol.* Jan 1999;276(1 Pt 2):R265-276.
286. Sugishita K, Kinugawa K, Shimizu T, et al. Cellular basis for the acute inhibitory effects of IL-6 and TNF- alpha on excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* Aug 1999;31(8):1457-1467.
287. Oral H, Dorn GW, 2nd, Mann DL. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem.* Feb 21 1997;272(8):4836-4842.

288. Krown KA, Page MT, Nguyen C, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest.* Dec 15 1996;98(12):2854-2865.
289. Segui B, Cuvillier O, Adam-Klages S, et al. Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest.* Jul 2001;108(1):143-151.
290. Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* Dec 30 2002;1585(2-3):193-201.
291. Liu SJ, McHowat J. Stimulation of different phospholipase A2 isoforms by TNF-alpha and IL-1beta in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* Oct 1998;275(4 Pt 2):H1462-1472.
292. McHowat J, Liu S. Interleukin-1beta stimulates phospholipase A2 activity in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* Feb 1997;272(2 Pt 1):C450-456.
293. Jayadev S, Linardic CM, Hannun YA. Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem.* Feb 25 1994;269(8):5757-5763.
294. Sabbadini RA, Betto R, Teresi A, Fachechi-Cassano G, Salviati G. The effects of sphingosine on sarcoplasmic reticulum membrane calcium release. *J Biol Chem.* Aug 5 1992;267(22):15475-15484.
295. Henaff M, Antoine S, Mercadier JJ, Coulombe A, Hatem SN. The voltage-independent B-type Ca<sup>2+</sup> channel modulates apoptosis of cardiac myocytes. *FASEB J.* Jan 2002;16(1):99-101.
296. O'Brien NW, Gellings NM, Guo M, Barlow SB, Glembotski CC, Sabbadini RA. Factor associated with neutral sphingomyelinase activation and its role in cardiac cell death. *Circ Res.* Apr 4 2003;92(6):589-591.
297. Di Paola M, Zaccagnino P, Montedoro G, Cocco T, Lorusso M. Ceramide induces release of pro-apoptotic proteins from mitochondria by either a Ca<sup>2+</sup> -dependent or a Ca<sup>2+</sup> -independent mechanism. *J Bioenerg Biomembr.* Apr 2004;36(2):165-170.
298. Delogo G, Famularo G, Amati F, et al. Ceramide concentrations in septic patients: a possible marker of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.* Nov 1999;27(11):2413-2417.
299. Drobnik W, Liebisch G, Audebert FX, et al. Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *J Lipid Res.* Apr 2003;44(4):754-761.
300. Meng X, Ao L, Meldrum DR, et al. TNF-alpha and myocardial depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship. *Am J Physiol.* Aug 1998;275(2 Pt 2):R502-508.
301. Pinsky DJ, Cai B, Yang X, Rodriguez C, Sciacca RR, Cannon PJ. The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta. *J Clin Invest.* Feb 1995;95(2):677-685.
302. Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest.* Mar 2005;115(3):509-517.
303. Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr.* Aug 2004;36(4):341-346.



304. Batandier C, Fontaine E, Keriél C, Leverve XM. Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *J Cell Mol Med.* Apr-Jun 2002;6(2):175-187.
305. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res.* Aug 4 2000;87(3):241-247.
306. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res.* May 14 1999;84(9):1020-1031.
307. Preiser JC, Zhang H, Vray B, Hrabak A, Vincent JL. Time course of inducible nitric oxide synthase activity following endotoxin administration in dogs. *Nitric Oxide.* Apr 2001;5(2):208-211.
308. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res.* Sep 1996;79(3):363-380.
309. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med.* Dec 1 2002;33(11):1440-1450.
310. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 23 1998;95(13):7631-7636.
311. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett.* Apr 11 2003;140-141:105-112.
312. Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, et al. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Sep 2002;283(3):H1108-1115.
313. Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* Aug 1 1997;100(3):723-735.
314. Szabo C, Zingarelli B, Salzman AL. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res.* Jun 1996;78(6):1051-1063.
315. Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem.* Mar-Apr 2002;383(3-4):401-409.
316. Ishida H, Ichimori K, Hirota Y, Fukahori M, Nakazawa H. Peroxynitrite-induced cardiac myocyte injury. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):343-350.
317. Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res.* Oct 29 1999;85(9):829-840.
318. Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet.* Nov 29 2003;362(9398):1799-1805.
319. Annane D, Trabold F, Sharshar T, et al. Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. *Am J Respir Crit Care Med.* Aug 1999;160(2):458-465.
320. Schmidt HB, Werdan K, Muller-Werdan U. Autonomic dysfunction in the ICU patient. *Curr Opin Crit Care.* Oct 2001;7(5):314-322.

321. Opie LH. Cellular basis for therapeutic choices in heart failure. *Circulation*. Oct 26 2004;110(17):2559-2561.
322. Bocking JK, Sibbald WJ, Holliday RL, Scott S, Viidik T. Plasma catecholamine levels and pulmonary dysfunction in sepsis. *Surg Gynecol Obstet*. May 1979;148(5):715-719.
323. Bernardin G, Tiger F, Fouche R, Mattei M. Continuous noninvasive measurement of aortic blood flow in critically ill patients with a new esophageal echo-Doppler system. *J Crit Care*. Dec 1998;13(4):177-183.
324. Iwase M, Yokota M, Kitaichi K, et al. Cardiac functional and structural alterations induced by endotoxin in rats: importance of platelet-activating factor. *Crit Care Med*. Mar 2001;29(3):609-617.
325. Hahn PY, Wang P, Tait SM, Ba ZF, Reich SS, Chaudry IH. Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. *Shock*. Oct 1995;4(4):269-273.
326. Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 15 2000;97(17):9753-9758.
327. Tang C, Liu MS. Initial externalization followed by internalization of beta-adrenergic receptors in rat heart during sepsis. *Am J Physiol*. Jan 1996;270(1 Pt 2):R254-263.
328. Shepherd RE, Lang CH, McDonough KH. Myocardial adrenergic responsiveness after lethal and nonlethal doses of endotoxin. *Am J Physiol*. Feb 1987;252(2 Pt 2):H410-416.
329. Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1989;86(17):6753-6757.
330. Chung MK, Gulick TS, Rotondo RE, Schreiner GF, Lange LG. Mechanism of cytokine inhibition of beta-adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. Impairment of signal transduction. *Circ Res*. Sep 1990;67(3):753-763.
331. Matsuda N, Hattori Y, Akaishi Y, Suzuki Y, Kemmotsu O, Gando S. Impairment of cardiac beta-adrenoceptor cellular signaling by decreased expression of G(s alpha) in septic rabbits. *Anesthesiology*. Dec 2000;93(6):1465-1473.
332. Bohm M, Kirchmayr R, Gierschik P, Erdmann E. Increase of myocardial inhibitory G-proteins in catecholamine-refractory septic shock or in septic multiorgan failure. *Am J Med*. Feb 1995;98(2):183-186.
333. Wu LL, Yang SL, Yang RC, et al. G protein and adenylate cyclase complex-mediated signal transduction in the rat heart during sepsis. *Shock*. Jun 2003;19(6):533-537.
334. Hare JM, Loh E, Creager MA, Colucci WS. Nitric oxide inhibits the positive inotropic response to beta-adrenergic stimulation in humans with left ventricular dysfunction. *Circulation*. Oct 15 1995;92(8):2198-2203.
335. Barth E, Radermacher P, Thiemermann C, Weber S, Georgieff M, Albuszies G. Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Crit Care Med*. Feb 2006;34(2):307-313.

336. Ismail NH, Cohn EJ, Jr., Mollitt DL. Nitric oxide synthase inhibition negates septic-induced alterations in cytoplasmic calcium homeostasis and membrane dynamics. *Am Surg.* Jan 1997;63(1):20-23.
337. Abi-Gerges N, Tavernier B, Mebazaa A, et al. Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat. *Am J Respir Crit Care Med.* Oct 1999;160(4):1196-1204.
338. Zhong J, Adams HR, Rubin LJ. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and contraction-relaxation properties of ventricular myocytes from *Escherichia coli* endotoxemic guinea pigs: effect of fluid resuscitation. *Shock.* May 1997;7(5):383-388.
339. Zhong J, Hwang TC, Adams HR, Rubin LJ. Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from endotoxemic guinea pigs. *Am J Physiol.* Nov 1997;273(5 Pt 2):H2312-2324.
340. Liu S, Schreur KD. G protein-mediated suppression of L-type Ca<sup>2+</sup> current by interleukin-1 beta in cultured rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* Feb 1995;268(2 Pt 1):C339-349.
341. Lew WY, Yasuda S, Yuan T, Hammond HK. Endotoxin-induced cardiac depression is associated with decreased cardiac dihydropyridine receptors in rabbits. *J Mol Cell Cardiol.* Jun 1996;28(6):1367-1371.
342. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest.* Nov 1993;92(5):2303-2312.
343. Grandel U, Fink L, Blum A, et al. Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation.* Nov 28 2000;102(22):2758-2764.
344. Favory R, Lancel S, Marchetti P, et al. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: evidence for a role of sphingosine production. *Crit Care Med.* Feb 2004;32(2):495-501.
345. Dong LW, Wu LL, Ji Y, Liu MS. Impairment of the ryanodine-sensitive calcium release channels in the cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism during the hypodynamic phase of sepsis. *Shock.* Jul 2001;16(1):33-39.
346. Wu LL, Liu MS. Altered ryanodine receptor of canine cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism in endotoxin shock. *J Surg Res.* Jul 1992;53(1):82-90.
347. Cohen RI, Wilson D, Liu SF. 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.* Jan 2006;34(1):173-181.
348. Wu LL, Tang C, Dong LW, Liu MS. Altered phospholamban-calcium ATPase interaction in cardiac sarcoplasmic reticulum during the progression of sepsis. *Shock.* May 2002;17(5):389-393.
349. Zhu X, Bernecker OY, Manohar NS, et al. Increased leakage of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> contributes to abnormal myocyte Ca<sup>2+</sup> handling and shortening in sepsis. *Crit Care Med.* Mar 2005;33(3):598-604.

350. Hassoun SM, Marechal X, Montaigne D, et al. Prevention of endotoxin-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak improves mitochondrial and myocardial dysfunction. *Crit Care Med*. Sep 2008;36(9):2590-2596.
351. Buckley JF, Singer M, Clapp LH. Role of KATP channels in sepsis. *Cardiovasc Res*. Nov 1 2006;72(2):220-230.
352. Liu MS, Ghosh S. Myocardial sodium pump activity in endotoxin shock. *Circ Shock*. 1986;19(2):177-184.
353. Cao CM, Xia Q, Chen YY, Zhang X, Shen YL. Opioid receptor-mediated effects of interleukin-2 on the  $[Ca^{2+}]_i$  transient and contraction in isolated ventricular myocytes of the rat. *Pflugers Arch*. Feb 2002;443(4):635-642.
354. Wu LL, Tang C, Liu MS. Altered phosphorylation and calcium sensitivity of cardiac myofibrillar proteins during sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Aug 2001;281(2):R408-416.
355. Takeuchi K, del Nido PJ, Ibrahim AE, et al. Increased myocardial calcium cycling and reduced myofilament calcium sensitivity in early endotoxemia. *Surgery*. Aug 1999;126(2):231-238.
356. Tavernier B, Mebazaa A, Mateo P, Sys S, Ventura-Clapier R, Veksler V. Phosphorylation-dependent alteration in myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart. *Am J Respir Crit Care Med*. Feb 2001;163(2):362-367.
357. Shah AM, Grocott-Mason RM, Pepper CB, et al. The cardiac endothelium: cardioactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis*. Nov-Dec 1996;39(3):263-284.
358. Faivre V, Kaskos H, Callebert J, et al. Cardiac and renal effects of levosimendan, arginine vasopressin, and norepinephrine in lipopolysaccharide-treated rabbits. *Anesthesiology*. Sep 2005;103(3):514-521.
359. Morelli A, De Castro S, Teboul JL, et al. Effects of levosimendan on systemic and regional hemodynamics in septic myocardial depression. *Intensive Care Med*. May 2005;31(5):638-644.
360. Barraud D, Faivre V, Damy T, et al. Levosimendan restores both systolic and diastolic cardiac performance in lipopolysaccharide-treated rabbits: comparison with dobutamine and milrinone. *Crit Care Med*. May 2007;35(5):1376-1382.
361. Williams AB, Decourten-Myers GM, Fischer JE, Luo G, Sun X, Hasselgren PO. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *FASEB J*. Aug 1999;13(11):1435-1443.
362. Rossi MA, Celes MR, Prado CM, Saggioro FP. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. *Shock*. Jan 2007;27(1):10-18.
363. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation*. Sep 17 2002;106(12):1543-1549.
364. Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res*. Feb 2003;57(2):426-433.
365. Yang Q, Wu LL, Tang X, Tang CS. [Alteration of phospholamban phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum during sepsis in rats]. *Sheng Li Xue Bao*. Aug 1995;47(4):357-365.

366. Sayeed MM, Baue AE. Mitochondrial metabolism of succinate, beta-hydroxybutyrate, and alpha-ketoglutarate in hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* May 1971;220(5):1275-1281.
367. White RR, Mela L, Bacalzo LV, Jr., Olofsson K, Miller LD. Hepatic ultrastructure in endotoxemia, hemorrhage, and hypoxia: emphasis on mitochondrial changes. *Surgery.* Apr 1973;73(4):525-534.
368. Moss GS, Erve PP, Schumer W. Effect of endotoxin on mitochondrial respiration. *Surg Forum.* 1969;20:24-25.
369. Broder G, Weil MH. Excess Lactate: An Index of Reversibility of Shock in Human Patients. *Science.* Mar 27 1964;143:1457-1459.
370. Hodgins UG, Sanford JP. Gram-negative rod bacteremia. An analysis of 100 patients. *Am J Med.* Dec 1965;39(6):952-960.
371. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care.* 2005;9 Suppl 4:S13-19.
372. Hayes MA, Timmins AC, Yau EH, Palazzo M, Hinds CJ, Watson D. Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *N Engl J Med.* Jun 16 1994;330(24):1717-1722.
373. Gattinoni L, Brazzi L, Pelosi P, et al. A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. SvO<sub>2</sub> Collaborative Group. *N Engl J Med.* Oct 19 1995;333(16):1025-1032.
374. Hayes MA, Timmins AC, Yau EH, Palazzo M, Watson D, Hinds CJ. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: influence of treatment and relationship to outcome. *Crit Care Med.* Jun 1997;25(6):926-936.
375. VanderMeer TJ, Wang H, Fink MP. Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock. *Crit Care Med.* Jul 1995;23(7):1217-1226.
376. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys.* Sep 15 1997;345(2):278-288.
377. Singer M, Brealey D. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochem Soc Symp.* 1999;66:149-166.
378. Crouser ED, Dorinsky PM. Metabolic consequences of sepsis. Correlation with altered intracellular calcium homeostasis. *Clin Chest Med.* Jun 1996;17(2):249-261.
379. Fink MP. Cytopathic hypoxia. Is oxygen use impaired in sepsis as a result of an acquired intrinsic derangement in cellular respiration? *Crit Care Clin.* Jan 2002;18(1):165-175.
380. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* Sep 2006;91(5):807-819.
381. Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion.* Sep 2004;4(5-6):729-741.
382. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, et al. Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci Rep.* Feb 2002;22(1):99-113.

383. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. Jul 20 2002;360(9328):219-223.
384. Watts JA, Kline JA, Thornton LR, Grattan RM, Brar SS. Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats. *J Mol Cell Cardiol*. Jan 2004;36(1):141-150.
385. Suliman HB, Welty-Wolf KE, Carraway M, Tatro L, Piantadosi CA. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovasc Res*. Nov 1 2004;64(2):279-288.
386. Schumer W, Erve PR, Obernolte RP. Endotoxemic effect on cardiac and skeletal muscle mitochondria. *Surg Gynecol Obstet*. Sep 1971;133(3):433-436.
387. Hersch M, Gnidec AA, Bersten AD, Troster M, Rutledge FS, Sibbald WJ. Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. *Surgery*. Apr 1990;107(4):397-410.
388. Cowley RA, Mergner WJ, Fisher RS, Jones RT, Trump BF. The subcellular pathology of shock in trauma patients: studies using the immediate autopsy. *Am Surg*. Apr 1979;45(4):255-269.
389. Soriano FG, Nogueira AC, Caldini EG, et al. 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*. Apr 2006;34(4):1073-1079.
390. Tavener SA, Long EM, Robbins SM, McRae KM, Van Remmen H, Kubes P. Immune cell Toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res*. Oct 1 2004;95(7):700-707.
391. Levy RJ, Vijayasathy C, Raj NR, Avadhani NG, Deutschman CS. Competitive and noncompetitive inhibition of myocardial cytochrome C oxidase in sepsis. *Shock*. Feb 2004;21(2):110-114.
392. Trumbeckaite S, Opalka JR, Neuhofer C, Zierz S, Gellerich FN. Different sensitivity of rabbit heart and skeletal muscle to endotoxin-induced impairment of mitochondrial function. *Eur J Biochem*. Mar 2001;268(5):1422-1429.
393. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Hertel K, et al. Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. *Shock*. May 1999;11(5):336-341.
394. Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med*. Feb 15 2003;167(4):570-579.
395. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mar 2005;6(3):248-261.
396. Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*. Aug 2005;2(2):85-93.
397. Murray AJ, Anderson RE, Watson GC, Radda GK, Clarke K. Uncoupling proteins in human heart. *Lancet*. Nov 13-19 2004;364(9447):1786-1788.
398. Roshon MJ, Kline JA, Thornton LR, Watts JA. Cardiac UCP2 expression and myocardial oxidative metabolism during acute septic shock in the rat. *Shock*. Jun 2003;19(6):570-576.
399. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*. Jan 3 2002;415(6867):96-99.

400. Christians ES, Yan LJ, Benjamin IJ. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med*. Jan 2002;30(1 Supp):S43-S50.
401. Chen HW, Hsu C, Lu TS, Wang SJ, Yang RC. Heat shock pretreatment prevents cardiac mitochondrial dysfunction during sepsis. *Shock*. Sep 2003;20(3):274-279.
402. Hotchkiss R, Nunnally I, Lindquist S, Taulien J, Perdrizet G, Karl I. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin. *Am J Physiol*. Dec 1993;265(6 Pt 2):R1447-1457.
403. Larche J, Lancel S, Hassoun SM, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *J Am Coll Cardiol*. Jul 18 2006;48(2):377-385.
404. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. Aug 1972;26(4):239-257.
405. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*. Oct 1997;81(4):627-635.
406. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. Jan 1996;74(1):86-107.
407. Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, et al. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest*. Sep 15 1997;100(6):1363-1372.
408. Olivetti G, Quaini F, Sala R, et al. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol*. Sep 1996;28(9):2005-2016.
409. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*. Jan 21 1997;95(2):320-323.
410. Saraste A, Arola A, Vuorinen T, et al. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol*. Sep-Oct 2003;12(5):255-262.
411. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med*. Oct 17 1996;335(16):1190-1196.
412. Fauvel H, Marchetti P, Chopin C, Formstecher P, Neviere R. Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Apr 2001;280(4):H1608-1614.
413. Neviere R, Fauvel H, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P. Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. Jan 2001;163(1):218-225.
414. McDonald TE, Grinman MN, Carthy CM, Walley KR. Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Nov 2000;279(5):H2053-2061.
415. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*. Nov 12 2004;95(10):957-970.

416. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. Nov 2005;37(11):719-727.
417. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. Jul 30 2004;305(5684):626-629.
418. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. Nov 1 2002;111(3):331-342.
419. Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. Jul 25 2003;301(5632):513-517.
420. Yan L, Miao Q, Sun Y, Yang F. tBid forms a pore in the liposome membrane. *FEBS Lett*. Dec 18 2003;555(3):545-550.
421. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:87-106.
422. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. Feb 2002;9(2):423-432.
423. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. Aug 21 2000;150(4):887-894.
424. Chen M, Won DJ, Krajewski S, Gottlieb RA. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem*. Aug 9 2002;277(32):29181-29186.
425. Sandmann S, Prenzel F, Shaw L, Schauer R, Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium--influence of the calpain inhibitor CAL 9961. *Br J Pharmacol*. Apr 2002;135(8):1951-1958.
426. Lorenzo HK, Susin SA. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Lett*. Jan 16 2004;557(1-3):14-20.
427. Kim GT, Chun YS, Park JW, Kim MS. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 26 2003;309(3):619-624.
428. Porter AG, Ng P, Janicke RU. Death substrates come alive. *Bioessays*. Jun 1997;19(6):501-507.
429. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. Aug 28 1998;281(5381):1312-1316.
430. Clerk A, Cole SM, Cullingford TE, Harrison JG, Jormakka M, Valks DM. Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharmacol Ther*. Mar 2003;97(3):223-261.
431. Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene*. Nov 22 2001;20(53):7779-7786.
432. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. Nov 13 1998;282(5392):1318-1321.
433. Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin AS, Jr., Mayo MW. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*. Mar 2000;20(5):1626-1638.
434. Pugazhenti S, Nesterova A, Sable C, et al. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem*. Apr 14 2000;275(15):10761-10766.



435. Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, et al. In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation*. Oct 23 2001;104(17):2088-2094.
436. Valks DM, Cook SA, Pham FH, Morrison PR, Clerk A, Sugden PH. Phenylephrine promotes phosphorylation of Bad in cardiac myocytes through the extracellular signal-regulated kinases 1/2 and protein kinase A. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 2002;34(7):749-763.
437. Communal C, Colucci WS. The control of cardiomyocyte apoptosis via the beta-adrenergic signaling pathways. *Arch Mal Coeur Vaiss*. Mar 2005;98(3):236-241.
438. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation*. Sep 29 1998;98(13):1329-1334.
439. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation*. Nov 30 1999;100(22):2210-2212.
440. Maeda K, Abello PA, Abraham MR, Wetzel RC, Robotham JL, Buchman TG. Endotoxin induces organ-specific endothelial cell injury. *Shock*. Jan 1995;3(1):46-50.
441. Tian B, Liu J, Bitterman P, Bache RJ. Angiotensin II modulates nitric oxide-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of AKT/PKB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 2003;285(3):H1105-1112.
442. Tian B, Liu J, Bitterman PB, Bache RJ. Mechanisms of cytokine induced NO-mediated cardiac fibroblast apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Nov 2002;283(5):H1958-1967.
443. Comstock KL, Krown KA, Page MT, et al. LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol*. Dec 1998;30(12):2761-2775.
444. Li HL, Suzuki J, Bayna E, et al. Lipopolysaccharide induces apoptosis in adult rat ventricular myocytes via cardiac AT(1) receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Aug 2002;283(2):H461-467.
445. Tissier S, Lancel S, Marechal X, et al. Calpain inhibitors improve myocardial dysfunction and inflammation induced by endotoxin in rats. *Shock*. Apr 2004;21(4):352-357.
446. Fauvel H, Marchetti P, Obert G, et al. Protective effects of cyclosporin A from endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. Feb 15 2002;165(4):449-455.
447. Lancel S, Petillot P, Favory R, et al. Expression of apoptosis regulatory factors during myocardial dysfunction in endotoxemic rats. *Crit Care Med*. Mar 2005;33(3):492-496.
448. Jafri SM, Lavine S, Field BE, Bahorozian MT, Carlson RW. Left ventricular diastolic function in sepsis. *Crit Care Med*. Jul 1990;18(7):709-714.
449. Vincent JL, Bakker J, Marecaux G, Schandene L, Kahn RJ, Dupont E. Administration of anti-TNF antibody improves left ventricular function in septic shock patients. Results of a pilot study. *Chest*. Mar 1992;101(3):810-815.

450. Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Opal SM, et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA*. Jun 15 1994;271(23):1836-1843.
451. Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med*. Jul 1997;25(7):1115-1124.
452. Kubota T, Miyagishima M, Frye CS, et al. Overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$  activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 2001;33(7):1331-1344.
453. Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation*. Apr 14 1998;97(14):1392-1400.
454. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, et al. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 9 2000;97(10):5456-5461.
455. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 30 2002;99(9):6252-6256.
456. Laugwitz KL, Moretti A, Weig HJ, et al. Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium. *Hum Gene Ther*. Nov 20 2001;12(17):2051-2063.
457. Ruetten H, Badorff C, Ihling C, Zeiher AM, Dimmeler S. Inhibition of caspase-3 improves contractile recovery of stunned myocardium, independent of apoptosis-inhibitory effects. *J Am Coll Cardiol*. Dec 2001;38(7):2063-2070.
458. Moretti A, Weig HJ, Ott T, et al. Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 3 2002;99(18):11860-11865.
459. Hirota J, Furuichi T, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is a substrate for caspase-3 and is cleaved during apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *J Biol Chem*. Nov 26 1999;274(48):34433-34437.
460. Assefa Z, Bultynck G, Szlufcik K, et al. Caspase-3-induced truncation of type 1 inositol trisphosphate receptor accelerates apoptotic cell death and induces inositol trisphosphate-independent calcium release during apoptosis. *J Biol Chem*. Oct 8 2004;279(41):43227-43236.
461. Santoro MF, Annand RR, Robertson MM, et al. Regulation of protein phosphatase 2A activity by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem*. May 22 1998;273(21):13119-13128.
462. Ren J, Ren BH, Sharma AC. Sepsis-induced depressed contractile function of isolated ventricular myocytes is due to altered calcium transient properties. *Shock*. Sep 2002;18(3):285-288.
463. Yamanaka T, Onishi K, Tanabe M, et al. Force- and relaxation-frequency relations in patients with diastolic heart failure. *Am Heart J*. Nov 2006;152(5):966 e961-967.

464. Leibovici L, Gafter-Gvili A, Paul M, et al. Relative tachycardia in patients with sepsis: an independent risk factor for mortality. *QJM*. Oct 2007;100(10):629-634.
465. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, et al. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest*. Dec 1991;100(6):1619-1636.
466. Ramchandra R, Wan L, Hood SG, Frithiof R, Bellomo R, May CN. Septic shock induces distinct changes in sympathetic nerve activity to the heart and kidney in conscious sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Nov 2009;297(5):R1247-1253.
467. Vayssettes-Courchay C, Bouysset F, Verbeuren TJ. Sympathetic activation and tachycardia in lipopolysaccharide treated rats are temporally correlated and unrelated to the baroreflex. *Auton Neurosci*. Jun 15 2005;120(1-2):35-45.
468. Cariou A, Pinsky MR, Monchi M, et al. Is myocardial adrenergic responsiveness depressed in human septic shock? *Intensive Care Med*. May 2008;34(5):917-922.
469. Connors AF, Jr., Speroff T, Dawson NV, et al. The effectiveness of right heart catheterization in the initial care of critically ill patients. SUPPORT Investigators. *JAMA*. Sep 18 1996;276(11):889-897.
470. Givertz MM, Andreou C, Conrad CH, Colucci WS. Direct myocardial effects of levosimendan in humans with left ventricular dysfunction: alteration of force-frequency and relaxation-frequency relationships. *Circulation*. Mar 13 2007;115(10):1218-1224.
471. Fries M, Ince C, Rossaint R, et al. Levosimendan but not norepinephrine improves microvascular oxygenation during experimental septic shock. *Crit Care Med*. Jun 2008;36(6):1886-1891.
472. Morelli A, Ertmer C, Westphal M. Calcium sensitizing in sepsis: is levosimendan on the right path? *Crit Care Med*. Jun 2008;36(6):1981-1982.