

## RECHERCHES DANS LA SÉRIE DES BENZOFURANNES—XXVII.

### INFLUENCE DE L'AMIODARONE SUR LES RÉSERVES ÉNERGÉTIQUES DU MYOCARDE CHEZ LE RAT\*

J. BROEKHUYSEN, R. LARUEL, A. DEBRUCQ-LARUEL et G. DELTOUR

Services de Recherche, LABAZ, Bruxelles 12, Belgique.

(Received 13 June 1967; accepted 17 July 1967)

**Abstract**—Amiodarone (2-*n*-butyl-3',5'-diiodo-4'*N*-diethylaminoethoxy-3 benzoyl benzo-furan) was injected i.v. to rats (10 mg/kg). Myocardial ATP stayed constant, while phospho-creatin increased and inorganic phosphate decreased.

The(ATP + phosphocreatin/inorganic phosphate) ratio (R) increased significantly. These changes appeared one minute after the injection and faded after 30 min. The effects are in sharp contrast with those observed with dinitrophenol-like substances. Amiodarone has no influence on ATP : creatin phosphotransferase *in vitro*. Amiodarone is suggested to have a sparing action on myocardial ATP utilization, but confirmation of this hypothesis is still pending.

L'AMIODARONE [*n*-butyl-2 (diiodo-3',5' *N*-diéthylaminoéthoxy-4')benzoyl-3 benzo-furane] détermine chez le chien une importante diminution de la résistance artérielle coronaire, une diminution modérée du travail cardiaque et une diminution de la consommation d'oxygène qui se traduit par un enrichissement du sang veineux coronaire en oxygène.<sup>1-3</sup> Ces propriétés peuvent chacune relever de différents mécanismes d'action qu'il importe de coordonner afin d'élaborer un modèle cohérent.

Le mécanisme d'action d'une molécule dont on attend un effet thérapeutique se traduit sur le plan biochimique en termes de formation, de stockage et d'utilisation de l'énergie. D'où notre tentative de rapporter à ces notions les modifications hémodynamiques dont l'application en clinique humaine encourage la poursuite.

La diminution de la résistance artérielle coronaire s'observe avec de multiples agents pharmacologiques, encore faut-il que cet effet ne soit pas le corollaire d'une agression contre laquelle le myocarde se défend par un phénomène réflexe souvent paroxystique.

Dans le cas de l'hypoxie et de l'empoisonnement par le cyanure, la diminution de la résistance s'accompagne d'une diminution parallèle de la consommation d'oxygène et du passage au métabolisme anaérobie (glycolyse) qui aboutit à une production intense de lactate.<sup>4</sup> Dans le cas du dinitrophénol, on observe au contraire une augmentation de la consommation d'oxygène.<sup>5</sup> Ces agents déterminent l'effondrement des réserves énergétiques du myocarde, principalement de la phosphocréatine qui constitue la source la plus proche de l'adénosine triphosphate (ATP).<sup>6</sup>

Dans un premier temps, nous avons cherché à établir si l'amiodarone modifiait, chez le rat, la teneur du myocarde en dérivés phosphorylés.

\* Ce travail a été subsidié en partie par le Fonds de Recherche Scientifique Médicale (FRSM).

## METHODES

Des rats mâles (de souche Wistar) de 125–150 g, anesthésiés au nembutal (30 mg/kg) par voie intrapéritonéale, subissent une thoracotomie gauche destinée à dégager le coeur pour un prélèvement ultérieur. Ils reçoivent, par voie veineuse, 30 min après l'injection d'anesthésique, une dose unique de 5 ou 10 mg/kg d'amiodarone dissoute dans l'eau, ou, chez les animaux témoins, une quantité équimolaire de sel d'ammonium (chlorure).

Après des temps variables (1–60 min), le coeur est prélevé avec des pinces refroidies à l'air liquide, et immédiatement immergé dans l'air liquide. Cette opération est réalisée en 3 sec environ.

Le coeur est ensuite broyé dans un mortier à percussion refroidi de la même manière, et lyophilisé en maintenant la température extérieure à  $-30^{\circ}$ .

L'extraction de la poudre est réalisée dans un tube à homogénéiser du type Potter. Pour chaque coeur (100–150 mg poids sec), on ajoute 0,6 ml  $\text{HClO}_4$  3 M et on travaille pendant 5 min à  $-10^{\circ}$ . On ajoute 2,5 ml d'éthylène-diamine tétraacétate sodique (EDTA)  $10^{-3}$  M et on poursuit l'extraction pendant 10 min à  $0^{\circ}$ . Le mélange est centrifugé à froid. On neutralise 2 ml de surnageant avec 0,66 ml  $\text{KHCO}_3$  2 M et 0,05

TABLEAU 1. INFLUENCE DE L'AMIODARONE SUR LES TENEURS DU MYOCARDE EN DÉRIVES PHOSPHORYLÉS 1 MIN APRÈS L'INJECTION (10 mg/kg i.v.)

	ATP $\mu\text{mole par g poids sec}$	P-Cr	Pi	R
Témoins (8)	17,9	14,4	22,3	1,45
	17,2	9,3	35,3	0,75
	21,0	17,8	22,0	1,76
	18,1	13,1	17,5	1,78
	19,2	14,3	19,9	1,68
	19,4	13,7	18,2	1,82
	15,9	14,2	15,9	1,89
	17,4	13,8	15,1	2,07
moyennes	18,3	13,8	20,7	1,65
écart-type	1,6	2,3	6,4	0,40
Traités (8)	21,4	22,6	14,1	3,12
	20,1	17,4	15,5	2,42
	20,7	17,6	15,6	2,46
	19,3	16,4	16,3	2,19
	19,7	19,6	14,8	2,66
	18,8	18,5	16,4	2,27
	20,3	16,6	23,1	1,60
	16,6	11,5	17,3	1,62
moyennes	19,6	17,5	16,6	2,29
écart-type	1,5	3,1	2,8	0,51

Les rats sont anesthésiés au nembutal (30 mg/kg). Trente minutes plus tard, ils reçoivent en i.v. soit 0,5 ml/kg  $\text{NH}_4 \text{Cl}$  M/30, soit 10 mg/kg d'amiodarone.

Les coeurs sont prélevés une minute après la fin de l'injection. Les animaux témoins alternent avec les animaux traités.

P-Cr = phosphocréatine

$$R = \frac{\text{ATP} + \text{P-Cr}}{\text{Pi}}$$

Pi = phosphate inorganique acido-soluble.

ml de Tris 2 M. Le précipité est éliminé par centrifugation et l'adénosine triphosphate (ATP) est dosé enzymatiquement.<sup>7</sup>

Dans le même milieu réactionnel, après épuisement de l'ATP, on ajoute 0,125 mg de créatine kinase (ATP: créatine phosphotransférase EC 2.7.3.2) pour doser la phosphocréatine.

Le phosphate minéral acido-soluble est mesuré d'après Lowry et Lopez<sup>8</sup> et le phosphate total de l'extrait suivant Fiske et SubbaRow.<sup>9</sup>

## RESULTATS

Les teneurs du myocarde en ATP, phosphocréatine (P-Cr) et phosphate minéral acido-soluble (Pi) ont été mesurées chez des animaux témoins et des animaux traités pendant 1, 30 et 60 min après l'injection d'amiodarone.

Les résultats figurent dans les Tableaux 1, 2 et 3. On a calculé en outre le rapport

$$R = \frac{\text{ATP} + \text{P-Cr}}{\text{Pi}} \text{ pour chaque animal.}$$

TABLEAU 2. INFLUENCE DE L'AMIODARONE SUR LES TENEURS DU MYOCARDE EN DÉRIVÉS PHOSPHORYLÉS 30 MIN APRÈS L'INJECTION D'AMIODARONE (5 mg/kg i.v.)

	ATP μmole par g poids sec	P-Cr	Pi	R
Témoins (7)	18,0	13,9	17,4	1,83
	20,5	19,7	15,2	2,64
	19,9	17,8	15,5	2,43
	19,5	15,5	18,2	1,92
	20,4	14,4	15,0	2,32
	17,4	16,0	17,0	1,96
	19,6	16,8	16,3	2,23
moyennes	19,3	16,3	16,4	2,19
écart-type	1,2	2,0	1,2	0,30
Traités (8)	18,7	17,9	13,5	2,71
	19,6	17,7	16,0	2,33
	19,5	15,0	11,8	2,92
	20,0	20,4	12,8	3,17
	17,4	16,7	13,5	2,53
	20,7	18,2	15,6	2,49
	21,0	15,7	11,8	3,11
moyennes	19,5	17,1	13,4	2,77
écart-type	1,2	1,8	1,7	0,30

Les rats sont anesthésiés au nembutal (30 mg/kg). Trente minutes plus tard, ils reçoivent en i.v. soit 0,5 ml/kg NH<sub>4</sub> Cl M/30, soit 5 mg/kg d'amiodarone.

Les cœurs sont prélevés 30 min après la fin de l'injection. Les animaux témoins alternent avec les animaux traités.

P-Cr = phosphocréatine

$$R = \frac{\text{ATP} + \text{P-Cr}}{\text{Pi}}$$

Pi = phosphate inorganique acido-soluble.

TABLEAU 3. INFLUENCE DE L'AMIODARONE SUR LES TENEURS DU MYOCARDE EN DÉRIVÉS PHOSPHORYLÉS 60 MIN APRÈS L'INJECTION (10 mg/kg i.v.)

	ATP μmole par g poids sec	P-Cr	Pi	R
Témoins (8)	19,0	13,1	20,5	1,57
	18,5	19,8	13,0	2,95
	21,6	20,5	21,7	1,94
	18,1	15,5	18,1	1,86
	15,9	16,6	16,4	1,98
	16,8	17,8	19,3	1,79
	18,9	20,7	15,9	2,49
	16,5	14,4	20,6	1,50
moyennes	18,2	17,3	18,2	2,01
écart-type	2,0	2,6	3,2	0,48
Traités (8)	17,7	19,4	20,9	1,78
	19,1	18,8	14,5	2,61
	15,5	13,8	13,3	2,20
	19,0	18,0	11,5	3,22
	17,0	18,8	12,4	2,89
	20,4	19,4	16,2	2,46
	20,6	17,8	16,9	2,27
	17,4	14,5	16,8	1,90
moyennes	18,3	17,6	15,3	2,42
écart-type	1,8	2,2	3,0	0,48

Les rats sont anesthésiés au nembital (30 mg/kg). Trente minutes plus tard, ils reçoivent en i.v. soit 0,5 ml/kg  $\text{NH}_4\text{Cl}$  M/30, soit 10 mg/kg d'amiodarone.

Les cœurs sont prélevés 60 min après la fin de l'injection. Les animaux témoins alternent avec les animaux traités.

P-Cr = phosphocréatine

$$R = \frac{\text{ATP} + \text{P-Cr}}{\text{Pi}}$$

Pi = phosphate inorganique acido-soluble.

Les teneurs en ATP sont remarquablement constantes d'un animal à l'autre et d'une expérience à la suivante. Par contre, les concentrations en phosphocréatine et en phosphate minéral subissent d'importantes variations. Nous avons donc comparé entre eux les animaux d'une même expérience où les témoins et les traités alternent régulièrement.

Après 1 min d'amiodarone, on constate une augmentation en ATP (7%) et en phosphocréatine (27%), et une chute de phosphate inorganique (20%). Le rapport R s'élève significativement de 39 pour cent ( $0,01 < P < 0,02$ , test *t*).

Dans l'expérience de 30 min, les taux d'ATP et de phosphocréatine sont à peine modifiés, mais le phosphate inorganique accuse une diminution de 18 pour cent. Le rapport R s'élève significativement de 26 pour cent ( $P < 0,01$ ).

Après 60 min enfin, la teneur en dérivés riches en énergie n'est pas modifiée, mais ici aussi le phosphate inorganique décroît (16%). Le rapport R s'élève de 20 pour cent, mais d'une manière non significative ( $0,1 < P < 0,2$ ).

Le 2,4-dinitrophénol, découplant des phosphorylations oxydatives, détermine, à la dose de 10 mg/kg (i.v.), une chute discrète de l'ATP (7%), une diminution importante de phosphocréatine (46%) et une augmentation de phosphate inorganique (55%). Le rapport R diminue significativement de 50 pour cent ( $P < 0,01$ ) (Tableau 4).

TABLEAU 4. INFLUENCE DU 2,4-DINITROPHÉNOL SUR LES TENEURS DU MYOCARDE EN DÉRIVÉS PHOSPHORYLÉS 20 MIN APRÈS L'INJECTION (10 mg/kg i.v.)

	ATP $\mu$ mole par g poids sec.	P-Cr	Pi	R
Témoins (7)	16,1	12,6	21,4	1,34
	19,3	16,5	12,0	2,17
	16,7	13,0	20,0	1,49
	18,6	15,5	15,0	2,27
	18,1	14,2	14,6	2,21
	21,8	19,5	15,6	2,65
	16,3	12,6	13,9	2,08
moyennes	18,1	14,8	16,1	2,03
écart-type	2,0	2,5	3,4	0,46
traités (8)	15,9	7,9	27,3	0,87
	19,6	13,7	22,9	1,45
	17,9	6,8	25,1	0,98
	16,6	6,2	18,3	1,25
	14,7	4,2	24,6	0,77
	17,4	7,2	29,7	0,83
	16,0	7,5	27,3	0,86
	16,5	10,4	25,1	1,07
moyennes	16,8	8,0	25,0	1,01
écart-type	1,5	2,9	3,4	0,24

Les rats sont anesthésiés au nembutal (30 mg/kg). Dix minutes plus tard, ils reçoivent en i.v. soit 0,5 ml/kg  $\text{NH}_4\text{Cl}$  M/30, soit 10 mg/kg de 2,4- dinitrophénol.

Les cœurs sont prélevés 20 min après la fin de l'injection. Les animaux témoins alternent avec les animaux traités.

P-Cr = phosphocréatine

$$R = \frac{\text{ATP} + \text{P-Cr}}{\text{Pi}}$$

Pi = phosphate inorganique acido-soluble.

Il apparaît que dans les conditions expérimentales décrites, les taux d'ATP ne varient pratiquement pas autour de la valeur moyenne de 18,7  $\mu$ mole/g de poids sec. Par contre, la phosphocréatine et le phosphate minéral varient individuellement et en fonction du traitement.

Chez les animaux témoins, la valeur moyenne de la phosphocréatine s'élève à 16  $\mu$ mole/g poids sec, celle du phosphate minéral à 18  $\mu$ mole/g poids sec. La somme de ces deux valeurs reste pratiquement constante (34  $\mu$ eq P/g poids sec) quel que soit le traitement, ce qui démontre que les variations de la phosphocréatine sont directement reliées à celles du phosphate minéral. De plus, la somme ATP + phosphocréatine + phosphate inorganique est constante elle aussi (moyenne: 89  $\mu$ eq P/g poids sec), ce

qui indique une extraction sinon quantitative, du moins reproductible. Le phosphore ainsi dosé représente en moyenne 78 % du phosphate total déterminé après hydrolyse (moyenne: 114  $\mu$ mole P/g poids sec). Ces valeurs confirment assez bien celles de Gercken et Hürter<sup>10</sup> obtenues chez le lapin (mais où la proportion de phosphocréatine est plus élevée) et celles de Reinauer et Hollmann,<sup>11</sup>

## DISCUSSION

Toute l'énergie dont dispose le myocarde pour son activité contractile passe obligatoirement par la synthèse d'ATP.<sup>12</sup> Néanmoins, la concentration moyenne en ATP varie très peu en fonction des conditions: elle est maintenue constante grâce au contrôle qu'exerce par contre-réaction l'utilisation sur la synthèse.

Pool *et al.*<sup>13</sup> ont montré que sous hypoxie et même lors de la défaillance cardiaque, la concentration d'ATP ne se modifiait pas, alors que le taux de phosphocréatine s'effondre. A moins de troubles extrêmes ou d'inhibition spécifique, seule la phosphocréatine reflète l'état des réserves énergétiques utilisables immédiatement.

La perfusion, sans aucun substrat, d'une préparation coeur-poumon de lapin,<sup>10</sup> provoque une chute de phosphocréatine beaucoup plus importante (86 %) que celle de l'ATP (32 %) qui semble due en grande partie à la diminution de l'ensemble des nucléotides ( $ATP + ADP + AMP = 80\%$  de la valeur des témoins). Le phosphate inorganique croît de 80 % dans ces conditions. On n'observe de variations de la teneur en ATP que dans le cas où la créatine kinase est inhibée sélectivement comme avec le fluoro-1-dinitro-2,4-benzène.<sup>14</sup>

L'augmentation de la concentration du myocarde en phosphocréatine sous amiodarone peut s'expliquer suivant trois modèles:

- (a) On peut penser que l'amiodarone détermine une épargne dans l'utilisation de l'ATP; le métabolisme oxydatif amène alors le taux de phosphocréatine à un niveau d'équilibre plus élevé. Ce phénomène s'observe effectivement avec une préparation coeur-poumon<sup>10</sup> abondamment oxygénée, le myocarde n'exécutant qu'un travail très faible. Comparés au coeur *in situ*, les taux d'ATP et de phosphocréatine augmentent de 6,7 % et 68 %. Le phosphate inorganique diminue de 30 %. Le rapport R passe de 2,1 à 4,3.
- (b) L'épargne apparente dans l'utilisation de l'ATP peut être considérée comme la conséquence d'une inhibition du système contractile de la fibre myocardique. Fleckenstein<sup>15</sup> a montré que l'insuffisance myocardique induite par le traitement par les inhibiteurs  $\beta$  ou par l'EDTA s'accompagnait d'une augmentation du rapport R.
- (c) Enfin, si l'amiodarone inhibe la créatine kinase, il est normal que, comme on peut le démontrer pour le fluoro-1-dinitro-2,4-benzène,<sup>14</sup> le taux de phosphocréatine soit insensible aux variations du métabolisme énergétique.

Les hypothèses (b) et (c) peuvent être exclues sur la base des observations suivantes: le débit cardiaque moyen ne se modifie pas chez le chien aux doses utilisées chez le rat dans ce travail;<sup>3</sup> d'autre part, la force de la contraction cardiaque ne se modifie pas non plus.<sup>16</sup> Il est probable que, dans ces conditions, l'amiodarone n'inhibe pas l'utilisation énergétique de l'ATP par le myocarde comme on l'observe avec les inhibiteurs  $\beta$ .<sup>15</sup> Enfin, des essais réalisés *in vitro* ont montré que la créatine kinase n'est pas inhibée par l'amiodarone. Il reste néanmoins que l'amiodarone pourrait

influencer le système ATPasique actine-myosine. Des essais sont actuellement en cours pour vérifier cette hypothèse.

En conclusion, on peut penser que l'amiodarone exerce *in vivo*, sur le myocarde de rat, une action d'épargne vis-à-vis de l'utilisation énergétique de l'ATP. Cette propriété qui se manifeste alors que la consommation d'oxygène diminue, signe une augmentation du rendement métabolique. Ce résultat est tout-à-fait opposé à celui des agents qui diminuent la résistance artérielle coronaire, que ce soit par manque de substrats,<sup>10</sup> par hypoxie, par inhibition des chaînes respiratoires (cyanure), des phosphorylations oxydatives (dinitrophénol) ou de la glycolyse (fluorure).

Des expériences sont actuellement en cours pour confirmer la validité de ce modèle, qui confère à l'amiodarone des propriétés métaboliques intéressantes.

### RÉSUMÉ

1. L'amiodarone, injectée par voie i.v. à la dose de 10 mg/kg chez le rat, détermine une augmentation du taux de phosphocréatine et une diminution de phosphate inorganique dans le myocarde. Les taux d'ATP ne sont jamais modifiés.
2. L'amiodarone provoque une augmentation significative du rapport  $\frac{\text{ATP} + \text{phosphocréatine}}{\text{phosphate inorganique}}$  (rapport R).
3. Ces effets se manifestent dès la première minute qui suit l'injection et persistent pendant au moins 30 min.
4. Le dinitrophénol détermine une chute de phosphocréatine, une augmentation du phosphate inorganique, et, par conséquent, une chute du rapport R. Le taux d'ATP ne se modifie pas.
5. L'amiodarone n'a aucune influence sur l'activité de la créatine kinase *in vitro*.
6. L'amiodarone pourrait exercer sur le coeur *in vivo* une certaine épargne dans l'utilisation de l'ATP

### BIBLIOGRAPHIE

1. G. DELTOUR, F. BINON, R. TONDEUR, C. GOLDENBERG, F. HENAU, R. SION, E. DERAY et R. CHARLIER, *Archs int. Pharmacodyn. Thé.* **139**, 247 (1962).
2. R. CHARLIER, G. DELTOUR, R. TONDEUR et F. BINON, *Archs int. Pharmacodyn. Thé.* **139**, 255 (1962).
3. a) R. CHARLIER, A. BAUDINE, F. CHAILLET et G. DELTOUR, *Acta cardiol.* sous presse (1967).  
b) R. CHARLIER, G. DELTOUR et A. BAUDINE, *Arch. int. Physiol.* **75**, 508 (1967).
4. R. J. BING, *Physiol. Rev.* **45**, 171 (1965).
5. W. LOCHNER et M. NASSERI, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **271**, 405 (1960).
6. R. M. BERNE, *Physiol. Rev.* **44**, 1 (1964).
7. H. ADAM, *Biochem. Z.* **335**, 25 (1961).
8. O. H. LOWRY et J. A. LOPEZ, *J. biol. Chem.* **162**, 421 (1946).
9. C. H. FISKE et Y. SUBBAROW, *J. biol. Chem.* **66**, 375 (1925).
10. G. GERCKEN et P. HÜRTER, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **292**, 100 (1966).
11. H. REINAUER et S. HOLLMANN, *Anaesthesist* **15**, 327 (1966).
12. H. H. WEBER et H. PORTZEHL, *Ergebn. Physiol.* **47**, 369 (1952).
13. P. E. POOL, J. W. COVELL, C. A. CHIDSEY et E. BRAUNWALD, *Circulation Res.* **19**, 221 (1966).
14. D. F. CAIN, A. A. INFANTE et R. E. DAVIES, *Nature, Lond.* **196**, 214 (1962).
15. A. FLECKENSTEIN, J. DÖRING et H. KAMMERMEIER, *Arzneimittel-Forsch* **21**, 1 (1967).
16. A. BAUDINE, F. CHAILLET, R. CHARLIER et A. HOSSLET, *Archs. int. Pharmacodyn. Thé.* sous presse (1967).