

## ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE LES XANTHINES ET LA NORADRENALINE $^3\text{H}$ , AU NIVEAU DU COEUR ISOLE DE RAT

YVES COHEN, MICHEL LESNE,\* GUILLAUME VALETTE et JACQUES WEPIERRE

Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté de Pharmacie, Paris

(Received 9 December 1969; accepted 9 January 1970)

**Abstract**—The mechanism of the positive inotropic effect of methylxanthines on the isolated heart of the rat was investigated by determining the mechanogram, the electrocardiogram and the cardiac outflow, and relating their modifications to the distribution of tritiated norepinephrine. The drugs had no effect on the uptake of norepinephrine (20 ng/ml) by the cardiac Langendorff preparation.

The results indicated that the positive inotropic effect exercised by methylxanthines was due to a direct action of these drugs on the myocardial cell rather than to an indirect action via the mediator of the sympathetic system.

LES XANTHINES et la théophylline en particulier, sont connues depuis longtemps pour l'effet inotope positif qu'elles exercent sur le cœur tant *in vivo*<sup>1</sup> qu'*in vitro*.<sup>2</sup> Trois hypothèses sont actuellement émises pour interpréter le mécanisme de cette action inotope, qui pourrait être due à :

- (1) une inhibition exercée par les xanthines sur la phosphodiesterase;
- (2) une modification de la captation de la noradrénaline par les terminaisons nerveuses du système sympathique;
- (3) une action directe des purines sur la mobilité du calcium à l'intérieur de la cellule du myocarde.

En effet, les travaux de Butcher *et al.*<sup>3</sup> ont montré que les méthylxanthines exercent un effet inhibiteur sur la phosphodiesterase, enzyme responsable de la transformation du 3,5 AMP cyclique en adénosine 5' monophosphate. Puisque l'AMP cyclique intervient comme médiateur dans l'effet inotope positif exercé par les catécholamines,<sup>4</sup> l'effet inotope redéivable aux xanthines pourrait être dû à cette action enzymatique. Toutefois, les travaux de Hess *et al.*<sup>5</sup> ont montré que les concentrations assez élevées en théophylline qui potentialisent l'action métabolique de la noradrénaline, exercent plutôt un effet inotope négatif sur le cœur isolé.

D'autre part, il existe toute une série de substances capables de modifier la captation (uptake 1) ou la recaptation (reuptake) de la noradrénaline libérée par stimulation des terminaisons nerveuses du sympathique (pour une revue concernant le cœur isolé perfusé, voir Iversen<sup>6</sup>).

Bien que par des arguments indirects, McNeil *et al.*<sup>7</sup> mettent en doute une quelconque action des xanthines sur la captation de la noradrénaline, aucun travail expérimental n'avait démontré jusqu'à présent, de façon directe, la validité d'une telle hypothèse.

\* Aspirant du F.N.R.S. (Belgique) Adresse actuelle: Institut de Pharmacie, Université de Louvain, Louvain (Belgique).

Enfin, les méthylxanthines exercent une action directe sur les propriétés contractiles de la cellule cardiaque (Bianchi<sup>8</sup>). Ainsi, la caféine peut, à faible concentration, mobiliser le calcium stocké ou chélaté, en quantité supérieure à celle qui est requise pour la contraction de la myofibrille; à des concentrations plus élevées, la quantité de calcium mobilisée par la caféine peut être suffisante pour provoquer une contraction spontanée; enfin, à de fortes concentrations, il peut se produire une inhibition irréversible de la captation du calcium par le reticulum sarcoplasmique.

Le but du présent travail a été de mesurer l'effet exercé par les méthylxanthines sur le cœur isolé de rat, et d'examiner si aux doses qui entraînent un effet inotope positif, il y a ou non une modification de la fixation de la noradrénaline.

## METHODES

### 1. *Perfusion des coeurs*

Nous avons utilisé des rats mâles Charles River, de 230 à 275 g, anesthésiés à l'éther et héparinés (3000 U par voie intraveineuse). Le cœur isolé est perfusé suivant la technique de Langendorff, par le liquide de Krebs Henseleit modifié, de composition suivante: NaCl 5.54 g, KCl 0.354 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.164 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.294 g, CaCl<sub>2</sub> anh. 0.282 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.1 g, pyruvate sodique 0.542 g, glucose 2.08 g, acide ascorbique 0.01 g, E.D.T.A. (sel disodique) 0.01 g, eau distillée q.s.p.f. 1000 ml. Ce liquide est aéré vigoureusement par un courant de carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>). La perfusion s'effectue à la température de 37° ± 0.5 et la pression hydrostatique est de 65 cm d'eau. Dans ces conditions, le débit coronarien varie de 5.5 à 7.5 ml/min.

### 2. *Mesure de la fixation de la noradrénaline tritiée*

La noradrénaline (N.A.) utilisée est la *d-l* noradrénaline tritiée en position 7 (New England Nuclear Corporation). Son activité spécifique est de 6.6 Ci/mM. Avant son utilisation on la dilue au 1/100e avec de la noradrénaline non radioactive et on vérifie par une analyse chromatographique sur colonne d'alumine, que le produit n'a pas subit d'autoradiolyse.

Dans notre travail, nous avons utilisé la noradrénaline à la concentration de 20 ng/ml de solution physiologique (soit 1.17 10<sup>-7</sup> M). La fixation de la N.A. par le cœur isolé de rat a été étudiée après 1, 2 et 5 minutes de perfusion en absence, puis en présence de théophylline, de caféine ou de théobromine à la concentration de 10<sup>-4</sup> ou de 5. 10<sup>-3</sup> M.

### 3. *Dosage de la radioactivité totale*

A la fin de la perfusion, les coeurs sont découpés, essuyés rapidement sur du papier filtre, pesés et homogénéisés à l'ultraturax dans 5 ml d'acide perchlorique 0.4 N renfermant 3.75 g d'E.D.T.A. et 3.75 g de NaHSO<sub>3</sub> par litre de solution.

Après centrifugation, une partie aliquote du liquide surnageant est ajoutée dans une fiole pour scintillation liquide contenant 6 ml d'éthanol absolu et 12 ml de liquide scintillant dont la composition est la suivante: POPOP 500 mg, PPO 4 g, toluène 1000 ml.

Après le comptage effectué au moyen de l'appareil automatique Packard 3380, l'autoextinction des échantillons est corrigée par la méthode de l'étoile externe. La valeur obtenue en dpm, est comparée à celle donnée par une quantité exactement mesurée de liquide de perfusion contenant la noradrénaline tritiée, ce qui permet

d'obtenir un résultat final exprimé en ng de produit fixé par gramme de tissu cardiaque humide.

#### 4. Séparation de la noradrénaline et de ses métabolites

En vue de s'assurer de l'identité de la molécule radioactive dosée et de l'absence de métabolites, nous avons procédé, dans nos essais préliminaires, à un second dosage de la N.A. préalablement séparée de ses métabolites; une partie aliquote du liquide surnageant après centrifugation est amenée à pH 8.4, par addition de NaOH N, puis passée sur colonne d'alumine selon la technique de Whitby *et al.*<sup>9</sup> Après lavage de la colonne au moyen de 5 ml d'eau distillée, l'éluition est réalisée par 5 ml d'HCl 0.2 N. Une partie de cet éluat est soumis au comptage par scintillation liquide. Le rendement de l'extraction de la N.A. sur alumine est estimé en traitant dans les mêmes conditions une quantité connue de N.A. tritiée.

La comparaison des résultats obtenus en mesurant la radioactivité totale et la radioactivité de la N.A. extraite sur alumine, a montré que dans nos conditions expérimentales et pour des temps de perfusion ne dépassant pas 5 min, il n'y avait aucune différence significative entre les deux séries de valeurs expérimentales. Les résultats que nous rapporterons dans la suite de ce travail sont obtenus par la mesure de la radioactivité totale.

#### 5. Enregistrement de l'effet de la N.A., de la théophylline ou de leur association, sur le cœur isolé

Nous avons enregistré l'activité contractile à l'aide d'une jauge de contrainte et le débit cardiaque au moyen d'un compte goutte électronique.

Les enregistrements ont été effectués sur un enregistreur Racia type duographe modifié.

### RESULTATS

#### 1. Mesure de l'effet exercé par la N.A., la Théophylline, ou leur association, utilisées en perfusion continue, sur l'activité du cœur isolé de rat

(a) *Noradrénaline*. La perfusion continue de N.A., à la concentration de 20 ng/ml, exerce sur le cœur isolé de rat, un effet inotrope positif dont l'optimum est atteint vers la 15<sup>e</sup> sec de perfusion et qui diminue progressivement par la suite. L'effet chronotrope positif apparaît plus tardivement et n'atteint sa valeur maximale qu'entre la 3<sup>e</sup> et la 4<sup>e</sup> min. Enfin, à la concentration de 20 ng/ml, la N.A. n'exerce pas d'effet notable sur le débit cardiaque.

Nous avons présenté l'ensemble des résultats dans la Fig. 1.

(b) *Théophylline*. La perfusion continue de théophylline aux concentrations de  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  ou  $10^{-3}$  M, n'engendre qu'un effet inotrope négatif d'autant plus prononcé que la concentration en purine est élevée. Par contre, à la concentration de  $5 \cdot 10^{-3}$  M, un effet inotrope positif initial apparaît rapidement, entre la 5<sup>e</sup> et la 10<sup>e</sup> sec de perfusion. A cet effet inotrope positif, succède un effet inotrope négatif. A cette concentration, l'effet chronotrope positif se manifeste postérieurement à l'effet inotrope et atteint sa valeur maximale entre la première et la troisième minute de perfusion.

Le débit cardiaque augmente rapidement pour atteindre une valeur maximale vers la première minute de perfusion. Cette valeur se maintient constante jusque vers la troisième minute et régresse très lentement par la suite (cf. Fig. 1).

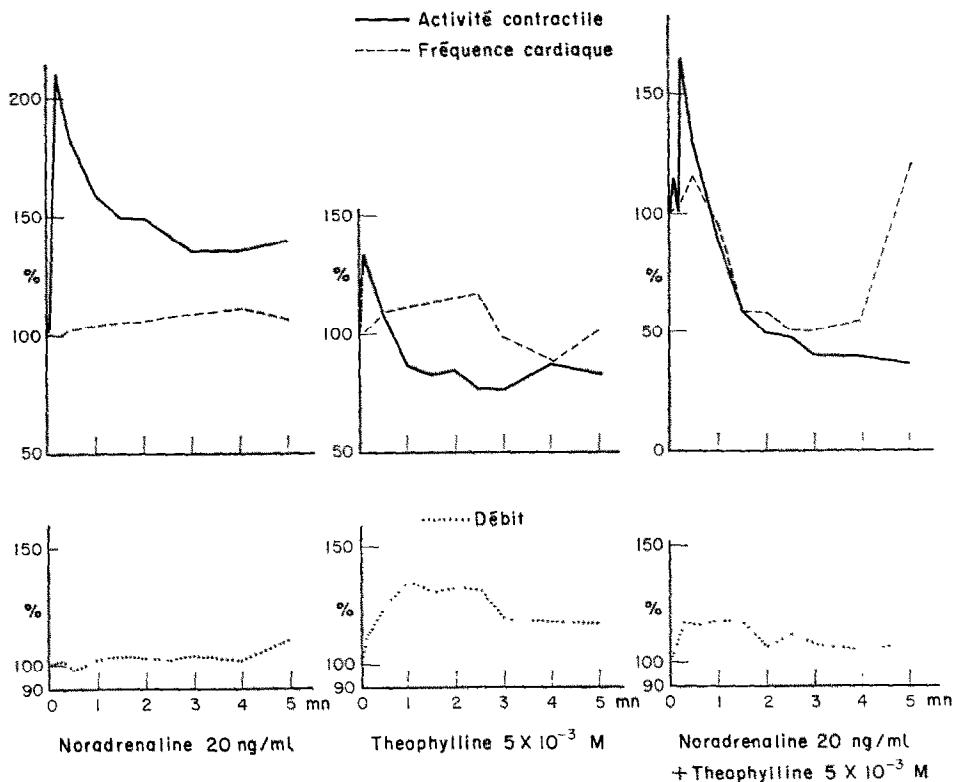


FIG. 1. Activité contractile, fréquence et débit d'un cœur isolé de rat perfusé durant 5 min par du soluté physiologique contenant 20 ng/ml de noradrénaline,  $5 \times 10^{-3}$  M/l. théophylline ou l'association de ces deux substances.

Les résultats sont exprimés en pourcentage, prenant pour 100 l'activité ou le débit cardiaque avant le début de la perfusion par ces drogues. La valeur moyenne est représentée, accompagnée de l'estimation de son écart-type. Le nombre d'expériences est égal ou supérieur à 8.

(c) *Noradrénaline et théophylline.* La perfusion de N.A. (20 ng/ml) et de théophylline à une concentration inférieure à  $5 \times 10^{-3}$  M n'engendre pas de potentiation par la Théophylline de l'effet inotrope de la noradrenaline.

La perfusion de N.A. (20 ng/ml) et de théophylline à la concentration de  $5 \times 10^{-3}$  M provoque l'apparition de deux effets inotropes positifs décalés dans le temps (cf. Fig. 1). Un effet inotrope négatif extrêmement important succède à ces effets initiaux. La fréquence cardiaque augmente légèrement durant les 30 premières secondes de la perfusion, tandis qu'elle diminue par la suite pour se stabiliser à environ la moitié de sa valeur initiale.

L'augmentation du débit cardiaque reste inférieure à celle qui est observée lors des essais avec le théophylline seule (cf. Fig. 1).

## 2. Mesure de la fixation de la N.A. tritiée (20 ng/ml) par le cœur isolé de rat en absence, puis en présence de théophylline, de caféine ou de théobromine, à la concentration de $10^{-4}$ et de $5 \cdot 10^{-3}$ M

Nous avons dosé la noradrénaline fixée par le cœur isolé de rat, celui-ci étant

perfusé par la solution de Krebs Henseleit contenant 20 ng de N.A. tritiée par ml, durant 1, 2 et 5 min. Les résultats de ces dosages sont exprimés sous la forme d'un rapport entre la concentration tissulaire en N.A. (en ng/g de tissu humide) et sa concentration dans le liquide de perfusion (en ng/ml). Ce rapport sera désigné par l'abréviation T/M dans la suite de l'exposé. Nous avons mesuré aussi le volume de liquide perfusé durant 1, 2 ou 5 min. Ces résultats sont exprimés en ml pour un temps donné de perfusion.

Pour les deux séries de valeurs expérimentales, nous avons calculé la valeur moyenne et son écart-type. Ces valeurs sont illustrées sous forme d'histogrammes dans les Fig. 2 et 3.

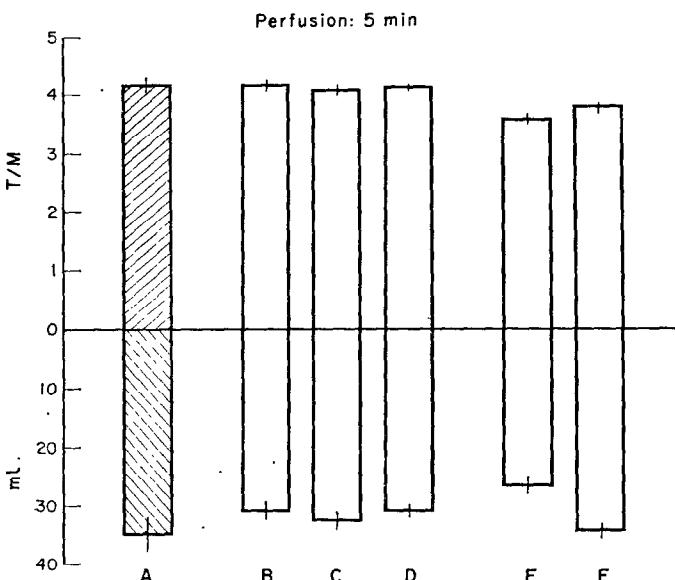


FIG. 2. Histogramme représentant la fixation de la noradrénaline par le cœur isolé de rat perfusé durant 5 min en absence (A) ou en présence de Caféine  $10^{-4}$  M (B), de théophylline  $10^{-4}$  M (C), de théobromine  $10^{-4}$  M (D), de caféine  $5 \cdot 10^{-3}$  M (E) ou de théophylline  $5 \cdot 10^{-3}$  M (F). Les volumes de soluté physiologique qui ont perfusé dans ces conditions, sont représentés en dessous de l'abscisse.

La captation de la N.A. est exprimée sous la forme du rapport T/M. Le débit cardiaque est indiqué en ml. Les moyennes sont affectées de leurs écarts-types (traits verticaux) ( $n \geq 5$ ).

Nous avons ensuite mesuré la fixation de la N.A. perfusée en même temps que la théophylline, la caféine ou la théobromine, aux concentrations de  $10^{-4}$  et  $5 \cdot 10^{-3}$  M. Comme le montre la lecture des histogrammes de la Fig. 2, il n'y a, après 5 min de perfusion, aucune différence significative entre les quantités de N.A. fixées en absence de xanthines (T/M:  $4.17 \pm 0.11$  ( $n = 8$ )), ou en présence de théophylline  $10^{-4}$  M (T/M:  $4.16 \pm 0.07$  ( $n = 5$ )), de caféine  $10^{-4}$  M (T/M:  $4.10 \pm 0.15$  ( $n = 5$ )), de théobromine  $10^{-4}$  M (T/M:  $4.12 \pm 0.19$  ( $n = 5$ )), ou de théophylline  $5 \cdot 10^{-3}$  M (T/M:  $3.80 \pm 0.12$  ( $n = 13$ )).

De même, il n'y a pas de différence significative entre les volumes de solution perfusée avec la N.A. seule ( $34.7 \text{ ml} \pm 2.7$  ( $n = 8$ )) ou additionnée de théophylline,

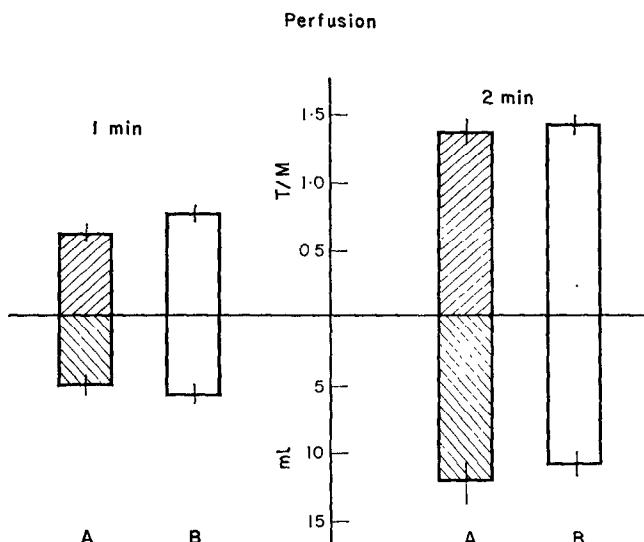


FIG. 3. Histogramme représentant la fixation de la noradrénaline (20 ng/ml) par le cœur isolé de rat perfusé durant 1 ou 2 min en absence (A) ou en présence (B) de théophylline  $5 \cdot 10^{-3}$  M.  
Les volumes de soluté physiologique qui ont perfusé le cœur dans ces conditions, sont représentés en-dessous de l'abscisse.

de caféine ou de théobromine  $10^{-4}$  M (soit respectivement  $30.9 \text{ ml} \pm 1.7$  ( $n = 5$ ),  $32.2 \text{ ml} \pm 2.4$  ( $n = 5$ ) et  $30.6 \text{ ml} \pm 1.0$  ( $n = 5$ ) ) ou de théophylline  $5 \cdot 10^{-3}$  M ( $33.9 \text{ ml} \pm 1.4$  ( $n = 13$ ) ).

Il existe toutefois une différence significative tant dans les volumes perfusés que dans les valeurs de T/M, dans le cas de la perfusion simultanée de N.A. et de caféine  $5 \cdot 10^{-3}$  M (volume perfusé:  $26.5 \text{ ml} \pm 3.7$  ( $n = 7$ ); T/M  $3.6 \pm 0.4$  ( $n = 7$ )).

Nous avons enfin comparé la fixation de la noradrénaline (20 ng/ml) en présence et en absence de théophylline  $5 \cdot 10^{-3}$  M durant 1 et 2 min de perfusion. Comme l'illustrent les histogrammes de la Fig. 3, il existe une différence significative, après 1 min de perfusion, tant dans les volumes perfusés que dans les valeurs de T/M pour la N.A. fixée en présence ou en absence de théophylline (T/M respectivement de  $0.76 \pm 0.02$  ( $n = 8$ ) et  $0.61 \pm 0.01$  ( $n = 9$ ); volumes perfusés:  $6.0 \text{ ml} \pm 0.22$  ( $n = 8$ ) et  $5.30 \text{ ml} \pm 0.19$  ( $n = 9$ )). Par contre, après une perfusion de deux minutes, il n'y a plus aucune différence significative. (T/M:  $1.36 \pm 0.08$  ( $n = 8$ ) et  $1.38 \pm 0.01$  ( $n = 8$ ); volumes perfusés:  $12.5 \text{ ml} \pm 1.2$  ( $n = 8$ ) et  $11.35 \text{ ml} \pm 0.47$  ( $n = 8$ )).

## DISCUSSION

### 1. L'effet inotrope positif des xanthines

Ainsi que l'illustre la Fig. 1, les méthylxanthines n'exercent un effet inotrope positif sur le cœur isolé de rat, qu'à de fortes concentrations ( $5 \cdot 10^{-3}$  M). Ces concentrations correspondent à des doses plus élevées que les doses actives chez l'animal entier (200 mg/kg). D'autre part, cet effet inotrope positif est transitoire, puisqu'un effet inotrope négatif lui succède immédiatement et persiste tant que se prolonge la perfusion. On peut en conclure qu'*in vitro*, la théophylline n'améliore pas les performances contractiles du cœur isolé, mais au contraire, en réduit l'activité. Nos observations

confirment ainsi les conclusions des travaux de Hess *et al.*<sup>5</sup> et de Vincent et Ellis<sup>10</sup> selon lesquelles les fortes doses de théophylline utilisées pour potentialiser l'effet métabolique de la noradrénaline, ou pour induire la glycogénolyse, exercent plutôt un effet inotrope négatif sur le cœur isolé.

## 2. *L'association Théophylline-noradrénaline*

Ainsi qu'il ressort des résultats rapportés à la Fig. 1, la théophylline ne potentialise pas les effets de la noradrénaline sur le cœur isolé. Au contraire, il semble exister un certain antagonisme entre les effets propres de la noradrénaline et ceux de la théophylline: lors de l'association des deux substances, on observe une diminution de l'optimum de l'effet inotrope positif exercé par chacune des drogues, une diminution de leur effet chronotrope et enfin, une réduction de l'accroissement du débit observé lors de la perfusion de théophylline seule.

D'autre part, l'observation de deux effets inotropes positifs lors de la perfusion simultanée de la théophylline et de la noradrenaline, permet d'entrevoir une différence dans le mécanisme de production de l'effet inotrope positif exercé par ces deux substances.

L'effet chronotrope observé lors de la perfusion simultanée des deux substances, ne présente pas la même dissociation que l'effet inotrope. Pour Strubelt,<sup>11</sup> la tachycardie provoquée par la théophylline ou la caféine, est due, *in vitro*, à l'effet chronotrope direct des méthylxanthines, tandis qu'*in vivo*, elle est causée, au moins partiellement, par une libération des catécholamines endogènes.

## 3. *Interaction des xanthines sur la captation de la noradrénaline*

Les résultats rapportés dans les histogrammes des Figs. 2 et 3, montrent que la captation de la N.A. tritiée par le cœur isolé de rat n'est pas modifiée par les méthylxanthines après 1, 2 ou 5 min de perfusion. Dans les deux seuls cas où se présente une différence significative ( $P < 0.05$ ), les variations constatées entre les valeurs de T/M pourraient s'expliquer par une modification des volumes de soluté physiologique perfusés dans les mêmes conditions.

L'absence d'effet des méthylxanthines sur la captation de la noradrénaline, observée tant aux doses où ces substances exercent un effet inotrope positif, qu'à des doses inférieures, constitue une confirmation de l'hypothèse avancée par McNeil *et al.*<sup>7</sup>

Pour ces auteurs en effet, il n'y aurait pas d'inhibition de la captation des catécholamines par la théophylline puisque celle-ci déplace vers la gauche les courbes dose-réponse de la noradrénaline, de la tyramine et de l'isoprotérénol, alors même que ces deux dernières substances ne sont pas soumises au processus de captation "active" des catécholamines.

Etant donné que l'action inotrope de la Théophylline ne requiert pas au départ la formation de nouvel ATP à partir de la glycolyse ou de la chaîne respiratoire<sup>12</sup> et que cette action se produit sans modification de la captation des catécholamines et sans intervention du récepteur  $\beta$ <sup>13</sup>, il semble que ce soit dès lors la troisième hypothèse généralement admise qui permette d'expliquer le mieux le mécanisme de production de cette action inotrope.

En effet, à la dose de  $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ , la Théophylline, en inhibant la fixation du calcium dans le reticulum sarcoplasmique pourrait, dans un premier temps, mobiliser une quantité de calcium supérieure à la normale, dans la cellule contractile, ce qui se

traduirait par un effet inotrope positif. Par la suite, la fuite de calcium non refixé par le reticulum sarcoplasmique hors de la cellule, diminuerait la quantité de calcium échangeable intervenant dans la contraction; il s'en suivrait un effet inotrope négatif. Des expériences ultérieures combinées à des dosages de calcium échangé devraient permettre de vérifier cette hypothèse.

**Résumé**—Afin de tenter d'expliquer l'effet inotrope des xanthines nous avons cherché à analyser le mécanisme biochimique de captation de la noradrénaline par le cœur, en présence de ces substances, par des techniques pharmacologiques.

- (1) Par enregistrement du mécanogramme et du débit cardiaque, nous avons mis en évidence sur le cœur isolé de rat perfusé suivant la technique de Langendorff, un effet inotrope positif de la théophylline à la concentration de  $5 \cdot 10^{-8}$  M.
- (2) L'association de théophylline et de noradrénaline entraîne l'apparition de deux effets inotropes décalés dans le temps.
- (3) Le débit cardiaque est augmenté par la théophylline à un degré supérieur à celui qui est observé lors de la perfusion de l'association théophylline-noradrénaline.
- (4) La théophylline, la caféine et la théobromine, aux doses modifiant expérimentalement le fonctionnement du cœur isolé de rat, n'ont aucune action sur la captation de la noradrénaline tritée administrée par perfusion, en association avec les xanthines.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. A. QUEVAUVILLER, *Actualités Pharmacol.* **8**, 107 (1955).
2. S. SHIBATA et P. B. HOLLANDER, *Experientia* **23**, 559 (1967).
3. R. M. BUTCHER et E. E. SUTHERLAND, *J. biol. Chem.* **237**, 1244 (1962).
4. E. E. SUTHERLAND, G. A. ROBINSON et R. W. BUTCHER, *Circulation* **37**, 279 (1968).
5. M. E. HESS, D. HOTTENSTEIN, J. SHANFIELD et N. HOUGAARD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **141**, 274 (1963).
6. L. L. IVERSEN, *Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves*. Cambridge University Press, Cambridge (1967).
7. N. H. MCNEIL, M. NASSAR et T. M. BRODY, *J. Pharmac. exp. Ther.* **165**, 234 (1969).
8. C. P. BIANCHI, *Cell Calcium*, p. 59. Butterworths, London (1968).
9. L. G. WHITBY, J. AXELROD et H. WEIL-MALHERBE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **132**, 193 (1961).
10. N. H. VINCENT et S. ELLIS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **139**, 160 (1963).
11. O. STRUBELT, *Arch. Pharmak. exp. Path.* **261**, 176 (1968).
12. R. S. HORN, R. LEVIN, et N. HAUGAARD, *Biochem. Pharmac.* **18**, 503 (1969).
13. Y COHEN, M. LESNE, G. VALETTE et J. WEPIERRE, *Archs. Int. Pharmacodyn.* **183**, 258, (1970).