



27 février 2002

Modèle expérimental de fourbure : effet des endotoxines sur La relaxation vasculaire

M. Y. MALLEM, M. GOGNY, V. BUCAS
F. GAUTIER, J-C. DESFONTIS

Unité de Pharmacologie Fonctionnelle UPSP DGER
Ecole Nationale Vétérinaire, Atlanpôle, BP 40706, 44307 Nantes, France

Cette étude a pour but de rechercher l'expression fonctionnelle des récepteurs β_3 -adrénergiques (β_3 -AR) dans les veines digitées de cheval (VDC) et de déterminer le rôle de l'endotoxine d'*Escherichia Coli* dans la réponse induite par la stimulation β_3 -AR. Sur des anneaux de VDC intacts montés dans des cuves à organes isolés, l'isoprénaline (agoniste β -AR non sélectif), le SR 58611 et le ZD 2079 (agonistes β_3 -AR préférentiels) produisent une relaxation dépendante de la concentration. En présence de nadolol (antagoniste β_1 et β_2 -AR), les relaxations induites par l'isoprénaline et le SR 58611A sont respectivement diminuées ou inchangées. Sur des anneaux intacts de VDC, le ZM 215001 (antagoniste β_3 -AR à 2 μ M) diminue significativement la relaxation au SR 58611A. Sur des anneaux de VDC désendothélialisés ou incubés en présence d'un inhibiteur des NO-synthases, L-NMMA, la relaxation induite par le SR 58611A est partiellement mais significativement inhibée. L'incubation des anneaux de VDC en présence d'endotoxine réduit significativement la relaxation au SR 58611A. L'altération de cette relaxation disparaît en présence de ibuprofène, un inhibiteur non sélectif des cyclooxygénases. Ces résultats suggèrent que les récepteurs β_3 -AR sont fonctionnellement exprimés dans les VDC. Leur activation induit une relaxation dépendante en partie de l'endothélium et du NO. L'altération de la relaxation β_3 -AR est associée à l'induction des produits des cyclooxygénases. Cette altération pourrait contribuer à la pathogénie de la fourbure aiguë chez le cheval.

Mots clés : Récepteurs β_3 -adrénergiques, endotoxine, relaxation.

The objectives of this study were to investigate the functional expression of β_3 -adrenoceptor (β_3 -AR) in equine digital veins (EDV) and to determine whether β_3 -AR response was altered in EDV incubated with endotoxin of *Escherichia Coli*. In intact EDV mounted in organ chamber, isoprenaline, (a non selective β -AR agonist), SR 58611A and ZD 2079 (preferential β_3 -AR agonists) produced concentration-dependent relaxation. Isoprenaline and SR58611A-induced relaxations were shifted or unaffected by nadolol (a β_1 and β_2 -AR antagonist) respectively. In intact EDV, SR58611A-induced relaxation was significantly reduced by ZM215001 (a β_3 -AR antagonist at 2 μ M). In denuded EDV or after pretreatment with an NO synthase inhibitor (L-NMMA) SR58611-induced relaxation was partly but significantly decreased. In endotoxin-treated EDV, SR58611-induced relaxation was significantly reduced. The impaired SR58611-induced relaxation by endotoxin was restored by ibuprofen, a non selective cyclooxygenase inhibitor. These findings suggest that β_3 -AR are functionally expressed in EDV. They produce a relaxation through endothelium-dependent and independent pathways. Endotoxin-induced impairment of β_3 -AR relaxation could be associated with the induction of cyclooxygenase products. This may contribute to the pathogenesis of acute laminitis.

Keys-words : β_3 -adrenoceptors, endotoxin, relaxation.

INTRODUCTION

La fourbure est une maladie fondamentalement vasculaire où se produit une ischémie qui frappe les feuillets du pododerme de la troisième phalange. L'hypothèse endotoxinique du syndrome de la fourbure est basée sur l'observation clinique que les chevaux atteints de troubles gastro-intestinaux associés à une endotoxémie évidente développent la maladie (Sprouze et coll. 1997). La vasoconstriction des vaisseaux digités constitue une des causes possibles de l'action des endotoxines dans cette maladie. Certaines études ont suggéré que la constriction veineuse est la cause hémodynamique initiale de la fourbure aiguë (Moore et coll. 1991). De plus, les microthromboses responsables d'occlusion capillaire et l'augmentation des résistances post-capillaires veineuses induites par les endotoxines participent à l'altération de la microcirculation podale. L'ouverture des anastomoses artério-veineuses provoquée par de nombreux agents vasoactifs, (le peptide intestinal vasoactif (VIP), la substance P) interviennent dans la maladie par la redistribution du sang qui pourrait être préjudiciable à la perfusion dans les feuillets du pied. Aussi, les études angiographiques ont révélé la présence d'une diminution de la taille des vaisseaux du pododerme suggérant la présence d'une hypoperfusion tissulaire.

Sur le plan biochimique, les produits dérivés de l'action des cyclooxygénases inductibles (Cox2) sur l'acide arachidonique sont les médiateurs essentiels de la réponse aux endotoxines chez le cheval (Bailey et Elliott 1999). Actuellement, aucun agent n'a été identifié comme un médiateur vasoactif spécifique qui intervient dans le déclenchement de la phase aiguë de la maladie. Le mécanisme précis des altérations hémodynamiques de la maladie reste, cependant à explorer.

La vasodilatation β -adrénergique (β -AR) dans les veines digitées de cheval (VDC) est principalement médiée par les récepteurs β_2 -AR (Elliott et coll. 1995). Jusqu'à présent, les récepteurs β_3 -AR n'ont pas été décrits dans ce territoire vasculaire. Cependant, plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, ont mis en évidence l'expression fonctionnelle des récepteurs β_3 -AR dans de nombreux types de vaisseaux chez plusieurs espèces animales (Brawley et coll. 2000, Gauthier et coll. 2000). L'activation de ces récepteurs induit une vasodilatation via la voie du GMPc (Trochu et coll. 1999).

L'objectif de ce travail est de rechercher l'expression fonctionnelle *in vitro* des récepteurs β_3 -AR dans les VDC et d'examiner l'action de l'endotoxine d'*Escherichia Coli* (*E. Coli*) sur les réponses relaxantes induites par les agonistes β_3 -AR.

MATERIEL ET METHODES

Les VDC sont prélevées au plus près de la bande coronaire sur les membres antérieurs de chevaux sains immédiatement après l'abattage. Elles sont coupées en anneaux de 3 à 4 mm de longueur et suspendues dans des cuves à organes isolés contenant une solution de Krebs (mM) : 118,3 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 20 NaHCO₃, 0,016 EDTA, 11,1 glucose et 2,5 CaCl₂, dont la température est maintenue à 37 °C et le pH est ajusté à 7,4 avec un mélange 95% O₂ / 5% CO₂. Les anneaux de VDC sont étirés à une tension de 2 g et sont équilibrés pendant 1 heure. La présence d'un endothélium fonctionnel est confirmée par l'application d'acétylcholine (1 μ M). Seuls les anneaux qui relaxent à plus de 70 % de la pré-contraction à la phényléphrine sont conservés dans les expériences. Dans le cas de désendothélialisation, la relaxation à l'acétylcholine est absente.

Protocole expérimental

Après équilibration, les anneaux de VDC sont pré-contractés à la phényléphrine (2 μ M) et les courbes concentration-relaxation cumulatives (CCRC) sont ensuite établies avec les agonistes β -AR. Sur les anneaux de VDC intactes, les CCRC sont construites en présence d'isoprénaline (agoniste β -AR non sélectif) (1 nM à 10 μ M), de SR 58611A (agoniste β_3 -AR préférentiel) (0,01 à 30 μ M) et de ZD 2079 (0,01 à 100 μ M) (agoniste β_3 -AR préférentiel). Dans certaines expériences, les CCRC à l'isoprénaline sont établies en présence de nadolol (antagoniste β_1/β_2 -AR) et les CCRC au SR 58611A sont construites en présence de nadolol ou de ZM 215001 (antagoniste β_3 -AR à 2 μ M, Mayers et coll. 1996) pendant 30 min.

Dans d'autres expériences les CCRCs au SR 58611A sont construites sur des anneaux sans endothélium ou sur des anneaux intacts préalablement incubés en présence d'un inhibiteur des NO-synthases (L-NMMA, 100 μ M) pendant 30 min.

De plus, les anneaux de VDC sont incubés en présence de lipopolysaccharides (LPS) d'*E. Coli* (1 μ g/ml) pendant 16 heures à 4 °C. Dans les mêmes conditions des anneaux de VDC incubés dans la solution de Krebs sans endotoxine constituent leur contrôle.

Analyse statistique

Les réponses relaxantes sont exprimées en % par rapport à la précontraction induite par la phényléphrine. Les relaxations sont exprimées par leur moyenne \pm s.e.m et le n représente le nombre d'anneaux examinés. La comparaison des différentes courbes de relaxation est réalisée par analyse de variance (ANOVA) à deux voies avec mesures répétées. La concentration d'agonistes produisant 50% de la réponse maximale (EC_{50}) et l'effet maximal (E_{max}) sont calculés par la technique de régression non linéaire basée sur l'équation de Boltzman (Souilem et coll. 1995) lorsque l'effet maximal atteint un plateau. Dans les courbes de relaxation où la réponse n'atteint pas un plateau, la réponse maximale (RM) correspond à l'effet de la plus forte concentration.

La comparaison entre les paramètres obtenus après les différents traitements est calculée à l'aide du test *t* de Student non apparié. Le seuil de significativité est fixé à 5%.

RESULTATS

Effets relaxants induits par l'isoprénaline

L'isoprénaline produit une relaxation des VDC de façon dépendante de la concentration avec un pD_2 de $7,2 \pm 0,11$ et un E_{max} de $92,8 \pm 3,2\%$ (n=6) (Figure 1a). Cette relaxation est rapide et atteint un maximum au bout de 2 à 5 min. En présence de nadolol (200 nM), la relaxation induite par l'isoprénaline est significativement inhibée avec un pD_2 de $6,2 \pm 0,06$ ($P < 0,01$ vs control, n=6) et un E_{max} de $44,6 \pm 6,2\%$ ($P < 0,001$ vs control, n=6) (Figure 1a). La cinétique de relaxation développée en présence de nadolols est lente et atteint un maximum au bout 8 à 10 min.

Effets relaxants des agonistes β_3 -AR

Le SR 58611A (0,01-30 μ M) et le ZD 2079 (0,01-100 μ M) produisent une relaxation des VDC de façon dépendante de la concentration (Figure 1b). Les RM sont de $66,2 \pm 4,1\%$ (n=6) et $56,8 \pm 4,3\%$; (n=6, Figure 1b) respectivement. Ces relaxations se développent de façon lente et similaire à celle obtenue avec l'isoprénaline en présence de nadolol, elles atteignent un plateau au bout de 10 à 15 min. Dans le but de caractériser le récepteur impliqué dans la relaxation induite par le SR 58611A, les CCRC sont construites en présence de 10 μ M de nadolol ou de 2 μ M de ZM 215001. La RM au SR 58611A n'est pas modifiée en présence de nadolol ($68,4 \pm 2,9\%$, n=5) mais elle est significativement inhibée en présence de ZM 215001 ($33,1 \pm 3,3\%$, (n=5), $P < 0,05$ vs contrôle, n = 6, Figure 1b).

Effets de la désendothélialisation et du L-NMMA sur la relaxation au SR 58611A

Dans le but de rechercher le rôle de l'endothélium et du NO dans la relaxation induite par la stimulation β_3 -AR, les CCRC sont établies sur des anneaux de VDC sans endothélium ou sur des anneaux intacts préalablement incubés en présence de L-NMMA. Sur des VDC sans endothélium, la relaxation au SR 58611A est significativement inhibée ; la RM obtenue est de $31,6 \pm 4,4\%$, (n=5, $P < 0,05$ vs SR 58611A avec endothélium, Figure 2). De façon similaire, l'inhibition des NO-synthases par le L-NMMA réduit significativement la relaxation au SR 58611; la RM obtenue est de $33,9 \pm 4\%$, (n=7, $P < 0,05$ vs SR 58611A sans L-NMMA, Figure 2).

Effets de l'endotoxine sur la relaxation β_3 -AR

Afin d'évaluer les effets directs des endotoxines, des expériences ont été menées sur des anneaux de VDC, préalablement incubés avec des LPS d'*E. Coli*. L'incubation des anneaux de VDC avec les LPS diminue significativement la relaxation au SR 58611 ; la RM obtenue est de $32 \pm 5,4\%$, ($n=6$, $P < 0,05$ vs SR 58611A sans endotoxine, Figure 3). Dans d'autres expériences, le mode d'action de l'endotoxine est recherchée en présence d'ibuprofène ; un inhibiteur non sélectif des cyclooxygénases. L'incubation des anneaux de VDC en présence de $10 \mu\text{M}$ d'ibuprofène rétablit la relaxation des VDC préalablement incubées en présence d'endotoxine. La RM obtenue est de $53 \pm 5,8\%$, ($n=5$, Figure 3).

DISCUSSION

Les résultats de notre travail montrent que l'activation des récepteurs β_3 -AR participe aux effets relaxants induits par l'isoprénaline sur les VDC. La relaxation induite par la stimulation β_3 -AR est partiellement dépendante de l'endothélium et du NO. Le nadolol, antagoniste β_1 et β_2 -adrénergique (200 nM) provoque un déplacement à droite de la courbe de relaxation à l'isoprénaline avec une baisse de l' E_{max} . Cet antagonisme compétitif non pur suggère l'activation de récepteurs β -AR différents des récepteurs β_1 et β_2 -AR. De plus, la relaxation persistante en présence de nadolol est de cinétique lente. Des résultats similaires sont obtenus sur des aortes de rat incubées en présence de propranolol (Brawley et coll. 2000) ou de nadolol (Trochu et coll. 1999). Le SR 58611A et le ZD 2079, agonistes β_3 -AR préférentiels, produisent une relaxation de cinétique lente similaire à celle produite par l'isoprénaline en présence de nadolol. La cinétique lente de réponse induite par le SR 58611A a été également observée dans les couches circulaires et longitudinales de l'iléon chez le cheval (Belloli et coll. 1997). La relaxation induite par le SR 58611A n'est pas modifiée en présence de nadolol ($10 \mu\text{M}$) mais elle est significativement inhibée en présence de ZM 215001, antagoniste β_3 -AR suggérant que la réponse induite par le SR 58611A est médiée par l'activation des récepteurs β_3 -AR.

Sur des VDC désendothélialisées ou incubées en présence de L-NMMA, les réponses relaxantes induites par le SR 58611A sont partiellement mais significativement inhibées indiquant que l'activation des récepteurs β_3 -AR est en partie médiée par le NO d'origine endothéliale. La voie de signalisation impliquant le rôle de l'endothélium et le NO a été décrite dans les VDC (Mallem et coll. 2000), dans l'aorte de rat (Trochu et coll. 1999, Mallem et coll. 2001). Ces résultats n'ont pas été retrouvés par Brawley et coll. (2000) qui n'ont pas observé d'effet du L-NAME sur la relaxation induite par le ZD 2079.

Dans cette étude, l'incubation des VDC en présence d'endotoxine réduit significativement la relaxation β_3 -AR induite par le SR 58611A. Il est bien documenté que l'endotoxine ne présente aucun effet toxique direct. La nature des protéines ou des médiateurs responsables de l'action de l'endotoxine sur la relaxation β_3 -AR est recherchée en présence d'ibuprofène, un inhibiteur des cyclooxygénases. L'altération de la relaxation β_3 -AR en présence d'endotoxine est rétablie par l'application d'ibuprofène suggérant que la production des prostanoïdes joue un rôle important dans cette dysfonction. Le thromboxane A2 (TxA2) pourrait être le médiateur impliqué dans cette altération. Il a été montré que le traitement des cellules endothéliales en culture chez le cheval par les endotoxines augmente la production du thromboxane B2 (TxB2), métabolite stable du thromboxane A2 (Bottom et coll. 1985). De plus, des études *in vivo* chez le cheval ont démontré également l'augmentation des concentrations circulantes de TxA2 après administration des endotoxines (Moore et coll. 1986).

Le thromboxane B2 serait à l'origine de lésions des cellules endothéliales (Turek et coll. 1985) dans le territoire cardiopulmonaire chez le poney. Ces lésions induites par l'endotoxine d'*E. Coli* sont inhibées par l'administration de flunixin méglumine, suggérant que l'atténuation des lésions des cellules endothéliales par la flunixin-méglumine peut être la conséquence de la diminution de la concentration de TxA2.

L'action d'endotoxine sur la relaxation β -AR a été également rapportée dans les bandes parenchymateuses chez le cobaye (Sugimoto et coll. 1996) et dans les artères coronaires chez le porc (Wang et coll. 1996). Le dysfonctionnement β -AR chez le cobaye semble impliquer le TxA2. En effet, l'ozagrel, un inhibiteur sélectif des récepteurs du TxA2 abolit l'altération de la relaxation β -AR induite par les LPS d'*E. Coli* (Sugimoto et

coll. 1996). L'implication de médiateurs autres que les prostanoïdes dans l'action des endotoxines n'est pas totalement exclue. Berkowitz et coll. (1998) ont montré que la production du TNF α en réponse à l'endotoxine d'*E. Coli* provoque une diminution de l'expression des récepteurs β_3 -AR dans le tissu adipeux chez la souris.

Compte tenu du rôle controversé des endotoxines dans la reproduction des modifications physiopathologiques et cliniques de la fourbure aiguë, les études pharmacologiques décrivant les réponses des vaisseaux digités incubés en présence d'endotoxines ou prélevés sur des chevaux préalablement traités par des endotoxines doivent être considérées avec prudence. En effet, il a été rapporté que la réactivité des vaisseaux digités en réponse à l'acétylcholine, l'histamine, l'épinéphrine ou la sérotonine dans la fourbure aiguë n'est pas altérée (Moore et coll. 1991).

En conclusion, cette étude démontre pour la première fois l'expression fonctionnelle des récepteurs β_3 -AR dans les VDC. L'activation de ces récepteurs produit une relaxation en partie dépendante de l'endothélium et du NO. La dysfonction de la relaxation β_3 -AR induite par l'endotoxine d'*E. Coli* impliquerait l'induction des produits des cyclooxygénases. L'altération de la vasodilatation induite par la stimulation β_3 -AR pourrait avoir des conséquences physiopathologiques dans la fourbure aiguë chez le cheval.

BIBLIOGRAPHIE

- Bailey, S.R. and Elliott, J. The role of prostanoids and nitric oxide in endotoxin-induced hyporesponsiveness of equine digital blood vessels. *Equine Vet. J.*, 1999, **31**, 212-218.
- Belloli, C., Re, G., Arioli, F., Badino, P., Carcano, R., Odore, R., Girardi, C. and Beretta, C. Differences between longitudinal and circular smooth muscle in beta-adrenergic control of motility of isolated equine ileum. *Am. J. Vet. Res.*, 1997, **58**, 1422-6.
- Berkowitz, D.E., Brown, D., Lee, K.M., Emala, C., Palmer, D., An, Y. and Breslow, M. Endotoxin-induced alteration in the expression of leptin and β_3 -adrenergic receptor in adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, 1998, **274**, E992-E997.
- Bottoms, G.D., Johnson, M., Lamar, C., Fessler, J.F. and Turek, J.J. Endotoxin-induced eicosanoid production by equine vascular endothelial cells and neutrophils. *Circ. Shock.*, 1985, **15**, 155-162.
- Brawley, L., Shaw, A.M. and MacDonald, A. Role of endothelium/nitric oxide in atypical β -adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, **398**, 285-296.
- Elliott, J. and Soydan, J. Characterization of beta-adrenoceptors in equine digital veins: implications of the modes of vasodilatory action of isoxsuprine. *Equine Vet. J.*, 1995, **19**, 101-107.
- Gauthier, C., Langin, D. and Balligand J.-L. β_3 -adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000, **21**, 426-431.
- Mallem, M.Y., Gogny, M., Gautier, F., Bucas, V., Vu, A.T. and Desfontis, J.-C. Beta-adrenoceptor-mediated relaxation is nitric oxide dependent in equine digital veins. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 2000, **23**, Suppl 1.
- Mallem M.Y., Gautier F., Serpillon S., Gogny M., Gauthier C., Desfontis J.-C.. In spontaneously hypertensive rats, no modification of β_3 -adrenergic relaxation, but impairment of atypical response to CGP 12177. 18ème congrès national de cardiologie (GRRC), Montpellier, 2001.
- Mayers, R.M., Quayle, S.P., Thompson, A. J., Grant, T. L. and Holloway, B. R. The acid metabolite of ZD 7114 is a partial agonist of lipolysis mediated by the rat β_3 -adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, **295**, 199-205.
- Moore, J.N., Allen, D. and Clark, E.S. Pathophysiology of acute laminitis. *Equine Practice*, 1991, **13**, 29-32.
- Moore, J.N., Hardee, M.M. and Hardee, G.E. Modulation of arachidonic acid metabolism in endotoxic horses : comparison of flunixin meglumine, phenylbutazone and a selective thromboxane synthetase inhibitor. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 110-113.
- Souilem, O., Bidon, J.-C., Gogny, M., Blin, M., Vu, A.T. and Jondet, A. Effect of moderate cooling on contractile responses in mouse vas deferens and its relation to calcium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1995, **352**, 337-45.
- Sprouze, R.F., Garner, H.E. and Green, E.M. (1987) Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate-induced laminitis. *Equine Vet. J.* **19**, 25-28.
- Sugimoto, Y., Mihara, T., Hayakawa, T., Nakayama, Y., Kishida, H. and Kamei, C. Effect of Apafant on

bronchial hyperresponsiveness and down-regulation of beta-adrenoceptors induced by endotoxin in guinea pigs. *Arzneimittelforschung*, 1997, **47**, 837-41.

Trochu, J.N., Leblais, V., Rautureau, Y., Beverelly, F., Le Marec, H., Berdeaux, A. and Gauthier, C. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.*, 1999, **128**, 69-76.

Turek, J.J., Templeton, C.B., Bottoms, G.D. and Fessler, J.F. Flunixin meglumine attenuation of endotoxin-induced damage to the cardiopulmonary vascular endothelium of the pony. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 591-6.

Wang, S.Y., VanderMeer, T.J., Fink, M.P. and Sellke, F.W. Uncoupling of coronary microvascular beta 2-adrenoceptors by *Escherichia Coli* endotoxemia. *Surgery*, 1994, **116**, 307-312.

Figure 1

A) Courbes concentrations-relaxations cumulatives à l'isoprénaline en absence (cercles vides, n=6) ou en présence de nadolol (200 nM) (cercles pleins, n=6). B) Courbes concentrations-relaxations cumulatives au SR 58611A en absence (carrés vides, n=6) et en présence de nadolol (10 μ M) (carrés pleins, n=5) ou de ZM 215001 (triangles pleins, n=5) et au ZD 2079 (losanges vides, n=6). * $P < 0,05$ différence significative par rapport au contrôle.

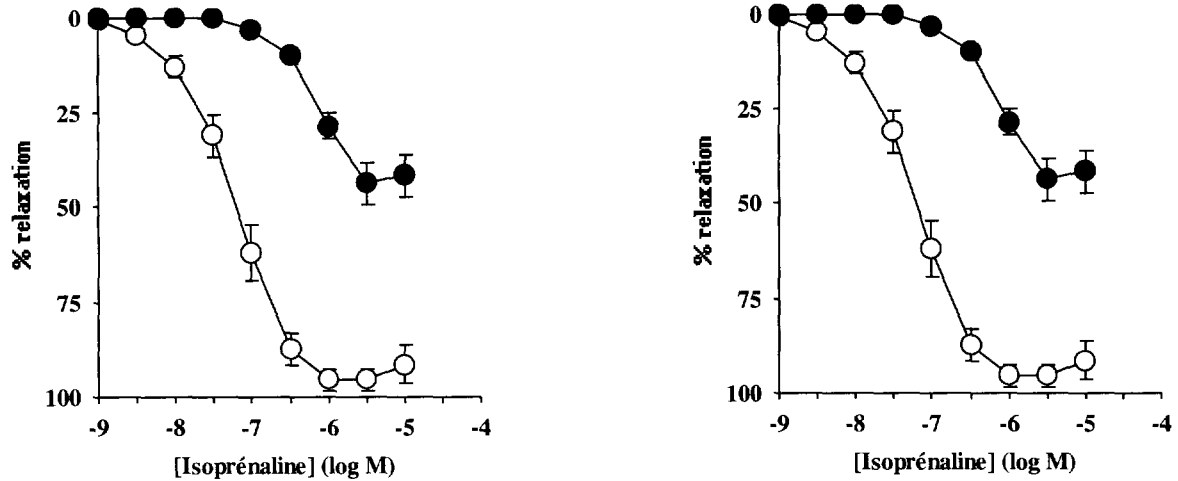


Figure 2

Courbes concentrations-relaxations cumulatives au SR 58611A sur des anneaux contrôles (carrés, n=6), après désendothélialisation (triangles, n=6) ou après incubation en présence de L-NMMA (cercles, n=6) * $P < 0,05$ différence significative par rapport au contrôle.

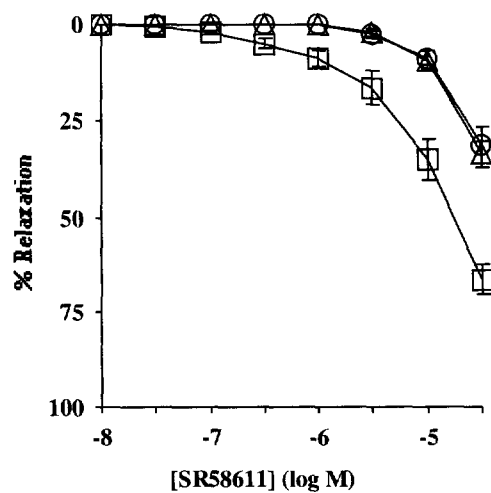


Figure 3

Courbes concentrations-relaxations cumulatives au SR 58611A sur des anneaux contrôles (carrés, n=6), après incubation avec l'endotoxine (cercles, n=6) ou en présence d'ibuprofène sur des anneaux préalablement incubés avec l'endotoxine. (triangles, n=6) * $P < 0,05$ différence significative par rapport au contrôle.

