

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie et biologie des organismes – Populations – Interactions

Présentée et soutenue publiquement par

Rachid OUBAASSINE

Le 28 octobre 2009

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

**Rôle cardioprotecteur de l'insuline dans
l'intoxication aiguë à la digoxine :
étude *in vivo* et mécanisme d'action cellulaire**

Membres du jury

Mr le Professeur Daniel MATHIEU
Mr le Docteur Grégoire VANDECASTEELE
Mme le Professeur Valérie SCHINI-KERTH
Mr le Professeur Michel PINGET
Mr le Docteur Jean-Christophe ROEGEL
Mr le Professeur Albert JAEGER
Mr le Docteur Pierre EFTEKHARI
Mme le Professeur Laurence KESSLER
Mme le Docteur Nelly FROSSARD

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examineur
Examineur
Invité
Invité
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

INTRODUCTION

1^{ère} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- I.** Les intoxications médicamenteuses
- II.** Effet de l'insuline au cours de l'intoxication aux cardiotropes
- III.** Intoxication à la digoxine
- IV.** Aspects pharmacologiques de la digoxine
- V.** Aspects pharmacologiques de l'insuline
- VI.** Effet de l'insuline au cours d'une intoxication à la digoxine

OBJECTIFS

2^{ème} PARTIE : TRAVAUX DE RECHERCHE

- I.** Mise en place d'un clamp euglycémique/hyperinsulinique
- II.** Effet du clamp euglycémique/hyperinsulinique sur une intoxication aiguë à la digoxine
- III.** Etude *in vitro* du mécanisme cellulaire des effets de l'insuline dans l'intoxication à la digoxine

CONCLUSION – PERSPECTIVE

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS

AA	Acides Aminés
ADP	Adénosine Diphosphate
AP-1	Activating protein 1
ATP	Adénosine Triphosphate
BAV	Bloc auriculo-ventriculaire
BCC	Bloqueur de Canaux Calciques
DIG	Digoxine-Insuline-Glucose
DIOC ₆	3,3 – dihexyloxacarbo-cyanine iodide
ECG	Electrocardiogramme
eNOS	Endothelial nitric oxid synthase
ET-1	Endotheline
FACS	Cytométrie en flux (ou flow cytometry techniques)
Fc	Fréquence cardiaque
GID	Glucose-Insuline-Digoxine
GIK	Glucose-insuline-potassium
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Peptide
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
IGF	Insulin like growth factors
IL-6	Interleukine 6
iNOS	Inducible nitric oxid synthase
IV	Intraveineuse
KA :	Constante d'association
ka :	Constante de vitesse d'association
K _{ATP}	Canaux potassiques ATP-dépendants
KD :	Constante de dissociation
kd :	Constante de vitesse de dissociation
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
NO	Monoxyde d'azote
NF-κB	Facteur nucléaire Kappa-B

PA	Potentiel d'action
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
P _i	Phosphate inorganique
PI3-K	Phosphatidyl-inositol-kinase 3
PAS	Pression artérielle systolique
PCR	Protéine C-réactive
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
RI	Récepteur à l'insuline
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPS	Résonance Plasmonique de Surface
RU	Unités de résonance
SC	Sous cutané
SPR	Surface plasmon resonance
SREBP-C	Sterol Response Element Binding Protein
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TM	Transmembranaire
UI	Unité Internationale
$\Delta\psi_m$	Potentiel membranaire mitochondrial

INTRODUCTION

L'intérêt de l'insuline dans la prise en charge de certaines pathologies cardiovasculaires, notamment lors de l'atteinte du muscle myocardique (intoxication par les cardiotropes, « soumission » à un environnement hyperglycémique chez le diabétique....), est grandissant. Cet effet cardioprotecteur de l'insuline connu et évoluant depuis déjà plus d'une dizaine d'années aux travers d'expérimentations animales mais également aux travers d'observations cliniques, donne un élan dans la thérapeutique de prise en charge de ces pathologies. Cette atteinte cardiovasculaire constitue un véritable problème de santé publique en raison du nombre de patients touchés par les intoxications aux cardiotropes et de l'augmentation considérable des sujets diabétiques. En effet l'intoxication avec atteinte cardiaque peut avoir plusieurs étiologies : volontaire ou accidentelle avec des substances ayant soit un tropisme cardiaque soit, des effets secondaires avec manifestations cardiaques.

Bien que son mécanisme d'action soit encore peu ou mal connu, l'utilisation de la perfusion d'insuline-glucose a montré son efficacité et son intérêt. Nombreux travaux rapportent au sujet de l'insuline, à côté de ses effets métaboliques connus, des effets non métaboliques (anti-inflammatoire et propriétés anti-oxydantes, prévention de la dysfonction endothéliale, protection myocardique) qui pourraient également contribuer à cette cardioprotection. D'ailleurs son utilisation est déjà dans les recommandations de prise en charge clinique de certaines pathologies (intoxications aux bloqueurs de canaux calciques, et aux bêta-bloquants). Dans les services de réanimation où les patients admis présentent une défaillance multiviscérale causée souvent par un choc septique primaire avec un stress hypermétabolique associé à une hyperglycémie, et où le risque de morbi-mortalité est très élevé, la perfusion d'insuline avec maintien d'une euglycémie est également recommandée.

Concernant les intoxications aiguës aux cardiotropes, qui sont des urgences vitales, le traitement pharmacologique classique basé sur l'administration de catécholamines présente parfois un caractère réfractaire. D'autres approches cherchant à influencer le métabolisme cardiaque apparaissent, notamment l'administration conjointe d'insuline et de glucose souvent présentée comme un schéma hyperinsulinique/euglycémique. Ce traitement est d'autant plus justifié que le rôle délétère de l'hyperglycémie, qui apparaît au cours de certaines intoxications, a été démontré dans plusieurs études.

Dans la première partie de ce travail consacrée à l'analyse bibliographique, nous ferons une présentation de certaines données concernant l'épidémiologie des intoxications aux cardiotropes ainsi que le bénéfice de l'utilisation de l'insuline au cours de certaines d'entre elles. Puis nous aborderons les propriétés pharmacologiques de l'insuline et de la digoxine. Dans une seconde partie nous présenterons nos résultats du travail de recherche en rapportant tout d'abord les données concernant les effets *in vivo* d'une perfusion d'insuline-glucose lors d'une intoxication aiguë à la digoxine. Puis nous aborderons les résultats des études *in vitro* réalisées sur la pompe Na,K-ATPase isolée et sur les cardiomyocytes soumis à la digoxine en présence ou non d'insuline.

1^{ère} PARTIE :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les intoxications médicamenteuses

1. Epidémiologie

Depuis les années 50, les intoxications médicamenteuses aiguës sont devenues un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés en raison de l'augmentation importante de leur fréquence [Labourel *et al.*, 2006]. En effet ces intoxications quelles soient accidentelles ou volontaires, représentent un motif fréquent d'admission aux urgences et en réanimation. La mortalité globale des intoxications est très largement inférieure à 1 % (1 239 cas sur 2 482 041 intoxications aux États-Unis en 2007 [Bronstein *et al.*, 2008]) mais, peut dépasser 10 % pour certains toxiques cardiotropes [Mégarbane, Donetti *et al.*, 2006].

Dans les pays occidentaux, les types d'intoxications principalement admises en réanimation sont à prédominance des intoxications médicamenteuses. À l'inverse, dans les pays en voie de développement, les pesticides sont une cause majeure d'admission aux soins intensifs [Mégarbane, Donetti *et al.*, 2006 ; Bronstein *et al.*, 2008].

L'évolution de la mortalité des intoxications médicamenteuses dans les pays développés reste néanmoins difficile à estimer. En effet nombreux sont les pays qui souffrent du manque de registre et de données épidémiologiques sur les intoxications admises en réanimation.

En France, notamment à l'inverse des États-Unis et du Royaume-Uni [Henry *et al.*, 1997 ; Morgan *et al.*, 2004 ; CDCP, 2005 ; Adnet *et al.*, 2005], il n'existe pas de registre national des intoxications volontaires. Il est donc impossible d'évaluer l'incidence globale et les caractéristiques sous-jacentes à ces manifestations. Ces intoxications restent pourtant une des premières causes d'hospitalisation des personnes de moins de trente ans [Adnet *et al.*, 2005].

Parmi les intoxications aiguës en France, les médicaments occupent toujours la première place [Bismuth *et al.*, 1997]. L'incidence des intoxications médicamenteuses augmente régulièrement depuis une trentaine d'années passant entre 1970 et 1990 respectivement de 1,2 à 5,5 intoxications pour 1000 habitants [Lambert *et al.*, 1997]. Actuellement, l'incidence annuelle des intoxications médicamenteuses volontaires est estimée à environ 4 pour 1000 habitants [Lambert *et al.*, 1997 ; Adnet *et al.*, 2005]. Cela est d'autant plus problématique qu'en France la mortalité due à ces intoxications médicamenteuses est estimée à plus de 2000 décès chaque année [Saviuc *et al.*, 1999 ; Adnet *et al.*, 2005].

Même si les intoxications médicamenteuses représentent l'immense majorité des intoxications volontaires (tableau I), les diverses classes médicamenteuses en cause ont évolué en 30 ans du

fait des changements de prescriptions et des nouvelles molécules mises sur le marché [Adnet et al., 2005].

Tableau I : Classes des agents impliqués selon le type d'intoxications [Harry, 2009]

Produits	Intoxication accidentelle	Intoxication volontaire
Médicaments / parapharmacie	31,5%	59%
Produits industriels	18,5%	18%
Produits ménagers	22%	5%
Aliments / produits diététiques	4,2%	3%
Phytoprotecteurs	4,5%	1,5%
Cosmétiques	4,4%	1,5%
Armes de guerre / défense	0,1%	1,5%
Drogues / dopants	0,2%	1,5%
Plantes champignons	6,3%	1%
Animal	1,7%	0,03%
Autres	6,6%	8%

Par ailleurs le pronostic de certaines intoxications graves a changé. Des thérapeutiques symptomatiques, parfois invasives et non dénuées de danger, se sont développées et les traitements spécifiques appartenant souvent à la classe des médicaments orphelins sont devenus coûteux. Il convient de pouvoir limiter l'usage de ces thérapeutiques aux sujets intoxiqués graves, qui risquent une évolution compliquée, des séquelles ou une issue fatale [Mégarbane, Donetti et al., 2006].

2. Intoxication par les cardiotropes

Les médicaments à visée cardiovasculaire représentent, avec ceux de l'appareil respiratoire, la deuxième classe pharmaceutique la plus consommée derrière les médicaments psychotropes [Adnet et al., 2005]. Par ailleurs, les intoxications médicamenteuses volontaires augmentent régulièrement, en particulier chez l'adulte, alors que leur gravité a diminué principalement en raison de la baisse de toxicité des principes actifs des médicaments les plus employés [Lambert et al., 1997]. L'intoxication volontaire aux médicaments psychotropes reste l'étiologie la plus fréquente (tableau II) en Europe et aux Etats-Unis [Isacsson et al., 1995 ; Adnet et al., 2005].

Tableau II : Répartition par classe médicamenteuse [Labourel et al., 2006]

<i>Classes médicamenteuses</i>	<i>%</i>	<i>Nombre</i>
<i>Psychotropes</i>	79,4	441
Benzodiazépines et apparentés *	43,7	243
Carbamates	11,7	65
Neuroleptiques	8,6	48
Antidépresseurs sérotoninergiques	7,6	42
Antidépresseurs tricycliques	7,4	41
Lithium	0,4	2
<i>Antalgiques et AINS</i>	9,8	54
Paracétamol	3,6	20
Dextropropoxyphène	3,5	19
Morphiniques	2,2	12
AINS	0,5	3
<i>Anti-convulsivants</i>	2,3	13
<i>Anti-parkinsoniens</i>	2,3	13
<i>Bêta bloquants</i>	1	6
<i>Barbituriques</i>	0,9	5
<i>Anticoagulants</i>	0,7	4
<i>Amphétamines</i>	0,4	2
<i>Autres</i>	3,2	18
Total	100	556
* Imidazopyridines et cyclopyrrolones.		

Bien que le nombre d'intoxications par cardiotropes apparaît faible en comparaison des intoxications par psychotropes, une étude réalisée en Seine Saint-Denis a permis de constater une

augmentation de 110% des intoxications par cardiotropes entre 1994/95 et 1999/2000 passant respectivement des 19 à 40 interventions. Tandis que, le nombre d'interventions pour les intoxications aux psychotropes augmentait de 37% soit de 505 interventions à 691 [Adnet *et al.*, 2005 ; Lapostolle *et al.*, 2006].

Les intoxications aiguës par cardiotropes ayant conduit à une hospitalisation en réanimation (figure 1) représentent environ 5 % de celles observées aux États-Unis [Gueye *et al.*, 2002] et 6,5 % dans certains centres hospitaliers français [Lapostolle, 1997].

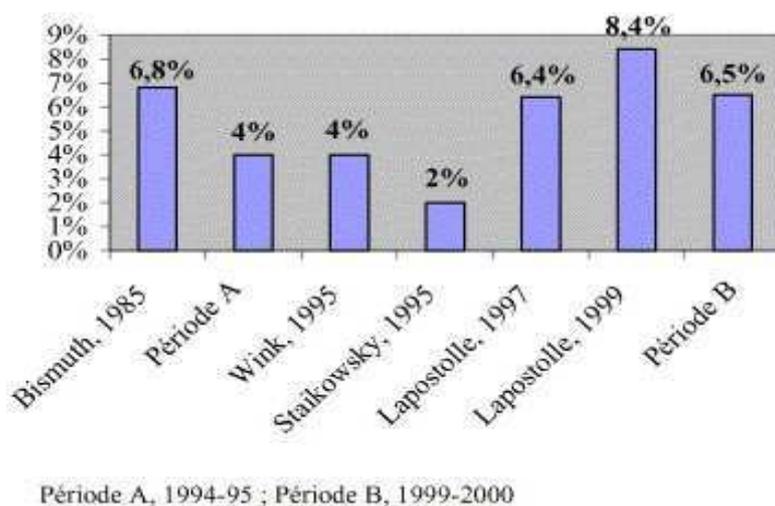


Figure 1 : Fréquence des intoxications par les cardiotropes dans différents services de réanimation. D'après [Adnet *et al.*, 2005].

Les intoxications aux cardiotropes (Tableau III) ne représentent qu'une très faible proportion des intoxications médicamenteuses. Elles sont celles cependant dont la mortalité directement imputable est la plus importante [Lapostolle, 1997 ; Adnet *et al.*, 2006 ; Bronstein *et al.*, 2008].

Les intoxications par les cardiotropes sont associées à une gravité réelle et potentiellement majeure, atteignant 15 à 20%, notamment lorsqu'il s'agit d'intoxications par les inhibiteurs calciques, les antiarythmiques, les digitaliques, etc... [Gérard *et al.*, 2002 ; Lapostolle *et al.*, 2006]. La défaillance cardiocirculatoire est une des causes principales de décès [Bosquet *et al.*, 2001].

Tableau III : Intoxications par les cardiotropes (données statistiques des centres antipoison américains, année 2007) [Bronstein *et al.*, 2008]

Produits		Nombre de cas	Nombre d'hospitalisation	Nombre de décès	Pourcentage de décès (1/1000)
Psychotropes		245 412	66 074	56	0,228
	Antidépresseurs	97 186	24 719	32	0,329
	Anxiolytiques	148 226	41 355	24	0,162
Cardiovasculaires		85 174	15 357	36	0,423
	Antiarythmiques	1 304	215	1	0,767
	Bêtabloquants	19 926	3 641	3	0,151
	Inhibiteurs calciques	10 084	2 232	17	1,686
	Glycosides	2 565	987	10	3,899
	Clonidine	6 162	2 235	2	0,325
	Antihypertenseurs	2 874	793	1	0,348
TOTAL Médicaments		1 482 964	268 433	407	0,274

Toutefois, la toxicité cardiaque n'est pas l'exclusivité des médicaments cardiovasculaires. Elle concerne aussi des psychotropes (antidépresseurs polycycliques en premier lieu), des antalgiques (dextropropoxyphène), des antipaludéens (chloroquine), des toxiques illicites (cocaïne), mais aussi des produits chimiques (organophosphorés, cyanure), domestiques (monoxyde de carbone, trichloréthylène) et des plantes (digitale, aconit, colchicine, if) [Lapostolle *et al.*, 2006 ; Mégarbane, Baud *et al.*, 2006].

Le choc d'origine toxique peut être cardiogénique ou vasoplégique avec une atteinte de la fonction cardiaque [Mégarbane, Donetti *et al.*, 2006], qui apparaît essentiellement suite à :

- une altération de la fonction systolique :
 - un effet inotrope négatif,
 - inhibiteurs calciques,
 - bêtabloquants,
 - bloqueurs des canaux sodiques,
 - un trouble de la géométrie de contraction ventriculaire, comme au cours des troubles du rythme ventriculaires malins,
- altération de la fonction diastolique (plus rare) : intoxications par les digitaliques,

- myocardite toxique avec la colchicine (blocage de la dépolymérisation des microtubules),
- nécrose des myocytes suite à la vasoconstriction coronaire induite par la cocaïne.

Par ailleurs, la prise en charge des toxidromes dus aux intoxications graves par cardiotropes, est un acte d'une urgence. Ceci notamment en raison du risque de survenue précoce de complications pouvant être responsable de mortalité élevée.

La gravité potentielle de ces intoxications est liée **[Sauder, 2006]** :

- à la toxicité de ces molécules caractérisées par un index thérapeutique étroit,
- à leur(s) mécanisme(s) d'action : stabilisants de membrane et inhibiteurs calciques sont les plus dangereux,
- à la dose ingérée (relation dose/effet),
- à une cinétique d'absorption rapide (anti-arythmiques, chloroquine, inhibiteurs calciques, bêtabloqueurs) avec des pics d'absorption souvent inférieurs à deux heures,
- à leur forme galénique : le risque est prolongé avec les formes à libération prolongée,
- à la survenue précoce de complications graves,
- au terrain : cardiopathie, troubles conductifs préexistants.

Toute intoxication potentiellement grave justifie un transport médicalisé et une admission en réanimation, même chez un patient (encore) asymptomatique **[Sauder, 2006]**.

Les traitements pharmacologiques (symptomatiques et antidotiques) sont généralement efficaces et suffisants pour traiter ces patients **[Mégarbane, Baud et al., 2006]**.

3. Les antidotes

Le traitement d'un patient intoxiqué par un cardiotrope doit prendre en compte le mécanisme de toxicité en cause. Les objectifs du traitement sont le maintien d'un état circulatoire satisfaisant, défini par une pression artérielle systolique supérieure à 90 mmHg, une fréquence cardiaque supérieure à 50 battements par minute et la disparition des signes d'hypoperfusion périphérique. Ainsi les traitements symptomatiques sont suffisants au cours des intoxications par cardiotropes les moins graves, car ils permettent d'assurer la survie du patient [**Albertson et al., 2001 ; Baud, Megarbane et al., 2007 ; Bronstein et al., 2008**].

L'indication d'un antidote doit être discutée en fonction du bénéfice escompté, du risque iatrogène et des possibilités d'administration.

Aucun antidote n'a fait la preuve de son efficacité lorsqu'il est utilisé seul. C'est pourquoi il est utilisé en complément d'un traitement symptomatique. Le glucagon et les inhibiteurs des phosphodiésterases sont inconstamment efficaces au cours des intoxications par les bêtabloquants et ou par les inhibiteurs calciques. Les sels de calcium sont peu efficaces pour inverser les effets des inhibiteurs calciques [**Sauder, 2006**].

Le traitement symptomatique reste prioritaire, celui-ci relève en première intention d'un traitement par remplissage vasculaire. En cas d'échec, le recours à une catécholamine est préconisé. Le choix de la thérapeutique repose sur le mécanisme du choc et de la toxicité induite par les drogues : molécule vasoconstrictrice en cas de choc vasoplégique ou molécule inotrope en cas de choc par baisse d'inotropisme. Lorsque la distinction entre vasoplégie et défaut d'inotropisme n'est pas possible, le recours à un traitement par bêtamimétique (isoprénaline ou adrénaline) doit être envisagé [**Lapostolle et al., 2006 ; Mégarbane, Donetti et al., 2006**].

Cette stratégie de prise en charge thérapeutique doit intégrer l'éventualité du recours à des thérapeutiques récentes (perfusion d'insuline-glucose, inhibiteurs des phosphodiésterases) ou à la circulation extra-corporelle, cette dernière étant réservée pour les formes les plus graves. Toutefois, qu'il s'agisse de traiter un collapsus, un trouble du rythme ou de la conduction, le traitement symptomatique ne doit pas faire omettre ou retarder un traitement spécifique parfois indiqué par anticorps antidigitalique, fomépiazole, etc... [**Lapostolle et al., 2006**].

Les différents antidotes utilisés au décours d'une intoxication par un antiarythmique (bêtabloquant, inhibiteur calcique...) sont :

- La dobutamine ou l'isoprénaline : l'antidote de première ligne [Taboulet et al., 1993].
- Le glucagon : antidote de seconde ligne, à réserver aux intoxications ne répondant pas à la dobutamine. Les effets sur la pression artérielle apparaissent avec un délai de 1 à 5 minutes, ils sont maximum à 5–15 minutes et durent 20–30 minutes après une dose unique. Cependant, il s'agit d'un traitement coûteux et les quantités requises peuvent en limiter son utilisation. De plus aucune étude clinique randomisée n'a encore démontré son efficacité [Bailey, 2003].
- Les sels de calcium : sont proposés pour les intoxications par inhibiteurs calciques. Leur efficacité est néanmoins inconstante [Salhanick et al., 2003]. Le gluconate de calcium est administré à dose double ou triple. On note également une différence de pratique entre les pays francophones et anglo-saxons, ces derniers l'utilisent en première intention pour traiter le collapsus lié aux inhibiteurs calciques contrairement aux francophones qui recommandent les catécholamines.
- La perfusion d'insuline-glucose : elle s'est révélée efficace dans plusieurs cas, permettant de réduire voire interrompre, les catécholamines au cours d'intoxications réfractaires [Yuan et al., 1999]. Dans les études où il a été utilisé, le traitement a bien été toléré et semble efficace sur les paramètres hémodynamiques et la survie. Néanmoins, son efficacité reste inconstante et imprévisible [Mégarbane et al., 2004 (a) et (b)]. De plus, aucune étude prospective n'en a démontré l'intérêt. Elle doit cependant être testée avant d'évoquer le caractère réfractaire du choc aux inhibiteurs calciques [Mégarbane et al., 2009].
- La 4-aminopyridine et la 3,4-diaminopyridine : augmentent l'influx intracellulaire de calcium, mais pourraient être responsables d'effets secondaires dont des convulsions à fortes doses. Leurs effets bénéfiques ont été décrits dans des modèles expérimentaux, mais leur utilisation clinique reste encore très limitée [Plewa et al., 1994 ; Wilffert et al., 2007].
- L' amrinone et le levosimendan, inhibiteurs des phosphodiésterases : bien que la preuve de leur efficacité n'ait jamais été prouvée, ils sont en cours d'évaluation et sont proposés pour les chocs cardiogéniques sévères [Manoach et al., 1997 ; Gaudins et al., 2008].
- Plus récemment, la perfusion de solutés lipidiques : des données cliniques et expérimentales permettent de proposer ce produit, associé aux autres mesures de réanimation, en traitement lors des intoxications aux stabilisants de membrane. [Cottrel et al., 2008 ; Sirianni et al., 2008]. Leur utilisation doit être tout de même prudente car aucune étude clinique randomisée n'a prouvé leur efficacité.

La prise en charge des patients admis pour intoxication aiguë doit être réfléchi et organisée en amont. La mise à disposition précoce du meilleur traitement reste un défi pour la médecine d'urgence.

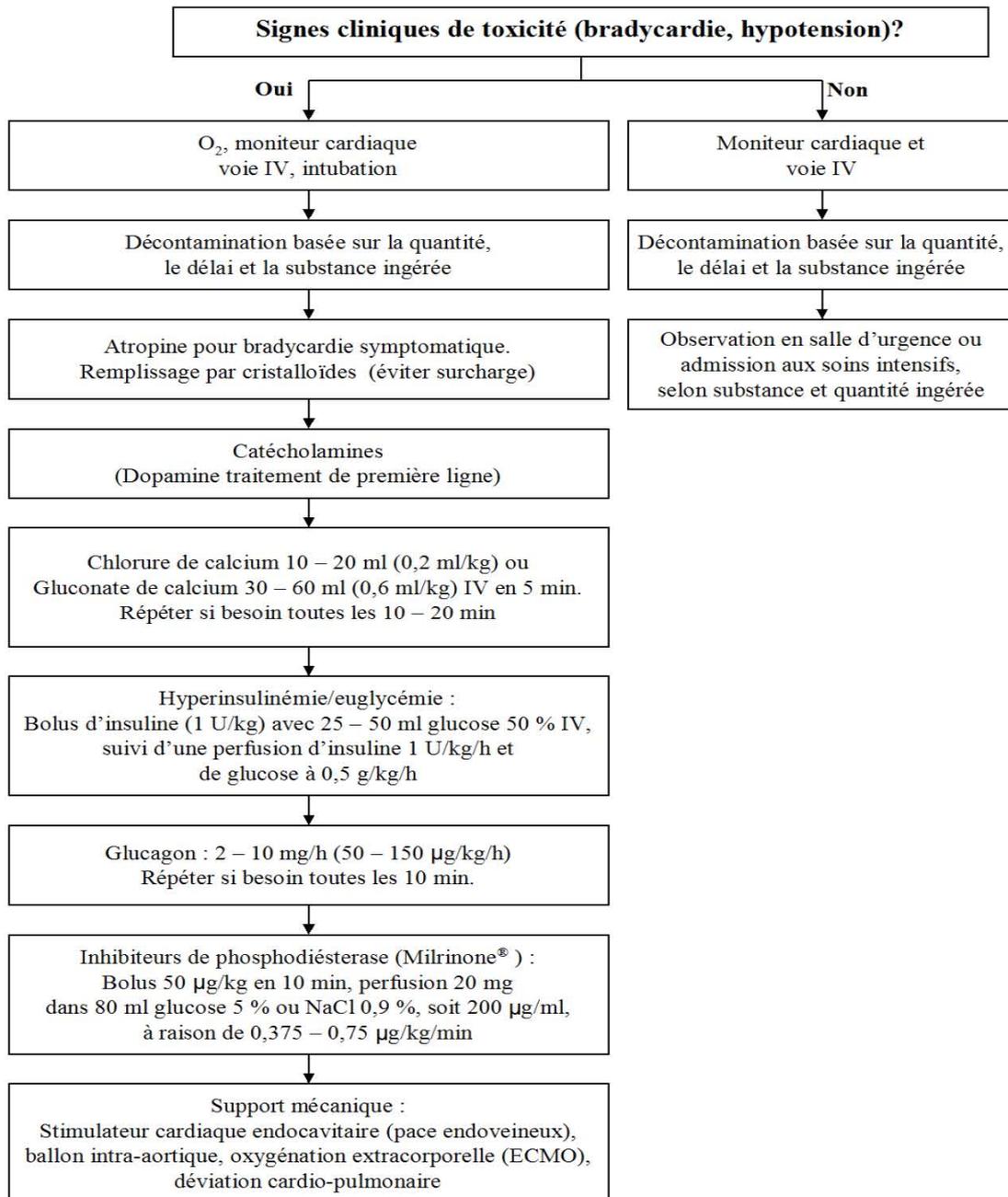


Figure 2 : Suggestion d'algorithme de prise en charge de la toxicité cardiovasculaire induite par les bloqueurs de canaux calciques ou par les bêta-bloquants.
D'après [DeWitt et al., 2004]

II. Effet de l'insuline au cours de l'intoxication aux cardiotropes

Plusieurs cas expérimentaux et cliniques sont rapportés où la perfusion d'insuline-glucose est utilisée comme traitement d'intoxications aux cardiotropes.

1. Bêtabloquants

1.1. Physiopathologie

Les bêtabloquants sont des antiarythmiques de classe II de Vaughan-Williams. Ils s'opposent à l'action des catécholamines en bloquant les récepteurs bêta-adrénergiques, en particulier au niveau du cœur, des vaisseaux et des bronches. Les bêtabloquants sont des antagonistes compétitifs et spécifiques des catécholamines (endogènes et synthétiques). Ils inhibent l'entrée du Na^+ et Ca^{2+} à la phase 0 de la dépolarisation du myocarde en diminuant la quantité d'AMPc intracellulaire. Leur action sur la contractilité est secondaire à l'inhibition de la libération du Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique (figure 3). Ces effets conduisent au niveau cardiovasculaire, par blocage des récepteurs bêta-1 adrénergiques, à des actions à la fois chronotrope, inotrope, dromotrope et bathmotrope négative, tandis que l'inhibition des récepteurs bêta-2 adrénergiques des cellules broncho-pulmonaires entraîne une bronchoconstriction.

Concernant les manifestations métaboliques, les effets des bêtabloquants provoquent une inhibition de la glycolyse, de la sécrétion du glucagon ainsi qu'une inhibition de la lipolyse.

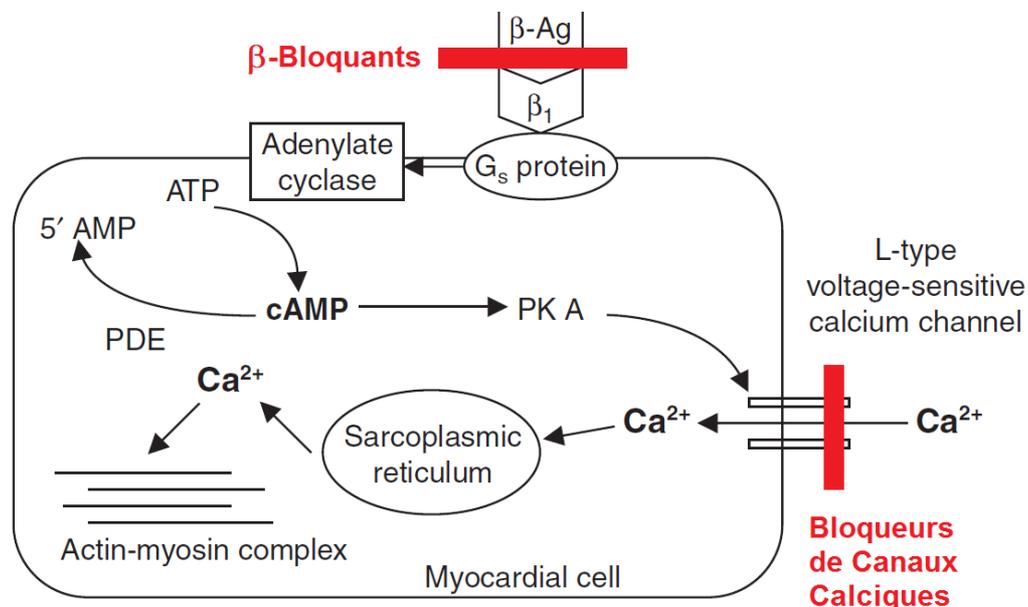


Figure 3 : Rôle du calcium dans la contraction myocardique et effets des bêta adrénergiques (β -Ag), des bêtabloquants ainsi que des bloqueurs de canaux calciques.

D'après [DeWitt et al., 2004]

Les bêtabloquants constituent par ailleurs une classe très hétérogène. Ils se différencient entre eux essentiellement aux niveaux de cinq caractéristiques (tableau IV) :

- l'existence d'une cardiosélectivité (bêta-1-sélectivité) : elle permet de limiter les effets liés au blocage des récepteurs bêta-2 adrénergiques,
- l'existence d'une action sympathomimétique intrinsèque : elle permet à la molécule d'avoir une action agoniste partielle qui s'ajoute à son effet antagoniste,
- l'existence d'un effet stabilisant de membrane : elle procure des actions antiarythmiques et inotropes négatives plus prononcées,
- voie d'élimination hépatique ou rénale : elle témoigne en cas d'élimination rénale (bêtabloquants hydrosolubles) de l'absence d'effet centraux,
- l'existence d'une liposolubilité : elle procure une forte résorption digestive ainsi qu'une fixation protéique et un passage membranaire important.

Tableau IV : Principales propriétés des bêtabloquants

Produits (DCI)	Cardio-sélectivité	Activité sympathomimétique intrinsèque	Effet stabilisant de membrane	Elimination majoritaire (H et/ou R)	Lipo-solubilité
Acébutolol	Oui	Oui	/	H et R	+
Celiprolol				H et R	+
Atenolol		Non		R	/
Bétaxolol				H	+
Bisoprolol				R	+
Metoprolol				H	+
Cartéolol	Non	Oui	Non	R	+
Pindolol			Non	H et R	+
Oxprénolol			Oui	R	++
Nadolol		Non	Non	R	/
Timolol			Non	R	+
Propranolol			Oui	H	++

H : hépatique ; R : rénale

Deux molécules, le propranolol et l'acébutolol, sont impliquées dans plus de 80% des décès par bêtabloquants. Ceci en raison de leur fréquence de prescription et probablement aussi en raison de leurs propriétés d'effet stabilisant de membrane [Love et al., 2000].

Les bêtabloquants sont à l'origine de trois tableaux cliniques [Baud, Mouhoub et al., 2007 ; Mégarbane et al., 2009 ; Sharma et al., 2009] :

- Le premier tableau est celui d'une intoxication apparemment asymptomatique et qui va le rester. Des données américaines suggèrent que l'apparition des troubles cardiovasculaires se situe dans un délai de six heures par rapport à l'ingestion en cas d'intoxication mono-médicamenteuse. Dans ces conditions, lorsque l'ECG reste normal dans les six heures qui suivent l'ingestion, le patient est autorisé à quitter l'hôpital sauf en cas d'ingestion de forme à libération prolongée.
- Le deuxième tableau est celui d'une bradycardie sans chute tensionnelle qui ne nécessite pas d'intervention thérapeutique sauf en cas d'intoxication par le sotalol où l'accélération de la fréquence cardiaque au-delà de 80 battements par minute est nécessaire pour éviter le risque de torsades de pointe.
- Le troisième tableau est celui d'un état grave : un arrêt cardiaque lors de la découverte au domicile, un choc cardiogénique qui va s'installer progressivement. Ainsi 70 % des arrêts cardiaques induits par les bêtabloquants surviennent dans les 24 heures qui suivent l'hospitalisation.

Les manifestations les plus fréquentes (50% des cas) sont l'hypotension, la bradycardie et le bloc de conduction auriculo-ventriculaire [Love, 1994].

1.2. Perfusion d'insuline-glucose lors d'une intoxication par bêtabloquants

La perfusion d'insuline-glucose a également fait l'objet de travaux en traitement d'intoxication aiguë par les bêtabloquants chez le chien. En effet déjà en 1985, Reikeras et ses collaborateurs [Reikeras et al., 1985 (a) et (b)] ont étudié les effets métaboliques et hémodynamiques de l'insuline à faibles et fortes doses lors d'une intoxication par 0,5 UI/kg de propranolol chez le chien. L'insuline a été administrée selon un bolus initiale de 0,5 UI/Kg suivi d'une perfusion continue de 0,5 UI/Kg puis d'un second bolus 30 minutes plus tard de 300 UI. Du glucose à 40% ainsi que du potassium ont été associés pour maintenir leurs concentrations plasmatiques aux valeurs physiologiques. Dès la 5^{ème} minute après l'administration de la faible dose d'insuline il a été observé une amélioration des paramètres de la fonction cardiaque (pression systolique, volume d'éjection, débit cardiaque...). Ces effets ce sont accentués aux fortes doses d'insuline, avec également une augmentation au niveau artériel et myocardique des concentrations en glucose, lactate et acides gras libres. Toutefois, l'insuline n'a pas eu d'effet

ni sur la fréquence ni sur la conduction cardiaque. Les travaux de Krukenkamp ont néanmoins démontré, toujours chez le chien, une amélioration de 80% de la fréquence cardiaque lors d'une intoxication au propranolol (0,2 mg/kg) traitée avec une forte dose d'insuline (1000 UI) [Krukenkamp *et al.*, 1986].

Une autre étude [Kerns *et al.*, 1997] chez le chien rapporte le cas d'une intoxication au propranolol (0,25 mg/kg/min en IV) traitée par une perfusion d'insuline-glucose (insuline à 4 UI/min + du glucose à 50%). L'ensemble des six animaux traités a survécu, tandis que le taux de survie de ceux traités par glucagon, adrénaline et solution saline a été respectivement de 70%, 15% et 0%. L'insuline a permis une amélioration des paramètres hémodynamiques (débit cardiaque, pression artérielle...). Il a également été observé une augmentation de l'absorption du glucose par le myocarde ainsi qu'une diminution de la kaliémie [Lheureux *et al.*, 2006].

Il est à noter par ailleurs qu'à ce jour, il n'y a pas eu d'études cliniques chez des patients intoxiqués par des bêta-bloquants ayant été traités par une perfusion d'insuline-glucose.

2. Les bloqueurs de canaux calciques (BCC)

2.1. Physiopathologie

Les bloqueurs de canaux calciques (ou inhibiteurs calciques) sont des antiarythmiques de classe IV de Vaughan-Williams. Ils diminuent l'influx du calcium au cours du plateau du potentiel d'action succédant normalement à l'excitation d'une cellule contractile et bloquent ainsi l'action de l'ATPase des myofibrilles. Cet effet est lié à une inhibition sélective de la fréquence d'ouverture des canaux calciques lents L-voltage dépendant. L'inhibition de l'entrée du calcium provoque une réduction du relargage du calcium par le réticulum sarcoplasmique, entraînant ainsi aux niveaux des cellules musculaires myocardiques, une diminution de la force contractile et aussi de la consommation en oxygène. Au niveau des cellules musculaires lisses (artérioles), il se produit une diminution de l'activité des protéines contractiles aboutissant à un effet vaso-dilatateur. Les bloqueurs de canaux calciques ont donc des effets inotrope, dromotrope et chronotrope négatifs.

Par ailleurs les manifestations pharmacodynamiques (tableau V) des bloqueurs des canaux calciques dépendent de leurs structures moléculaires et de la localisation préférentielle des canaux calciques qu'ils bloquent. Il existe ainsi 4 classes pharmacologiques d'inhibiteurs calciques : les dihydropyridines (nifédipine), les benzothiazépines (diltiazem), les dérivés phénylalkylamine (vérapamil) et les diarylamino-propylamine (bépridil). Selon le type, le BCC

aura un tropisme à prédominance soit vasculaire soit cardiaque. On oppose ainsi classiquement, les dihydropyridines, dont les effets sont préférentiellement vasculaires (collapsus par vasoplégie et tachycardie réactionnelle), au diltiazem et au vérapamil, dont les effets cardiaques s'ajoutent aux effets vasculaires entraînant une bradycardie, un bloc auriculoventriculaire, voire un choc cardiogénique par altération de la contractilité (vérapamil). Les symptômes cliniques apparaissent rapidement après l'ingestion et se caractérisent principalement par une hypotension qui résulte d'une baisse de la contractilité myocardique ou d'une vasodilatation artérielle. Quant à l'hyperglycémie observée, elle est une conséquence de la diminution de sécrétion d'insuline par les cellules bêta de Langherans du pancréas [Megarbane et al., 2008].

Lors d'intoxication, le tableau clinique se compose d'un état de choc associant une acidose lactique, une insuffisance rénale aiguë oligurique, des troubles de la conscience et une détresse respiratoire. L'ampleur de la bradycardie et des troubles de la conduction sont fonction de l'inhibiteur calcique en cause. Ainsi, lors des intoxications par vérapamil et diltiazem on observe une bradycardie et un bloc de conduction dans environ 80% des cas, un collapsus dans environ 60 % et un arrêt cardiaque dans 10 à 20% des cas. Néanmoins, aux doses toxiques la différence de sélectivité tissulaire opposant vérapamil et diltiazem, d'une part, et les dihydropyridines, s'atténue [Sauder et al., 2003 ; Alain, 2001 ; Megarbane et al., 2009].

Tableau V : Propriétés pharmacologiques des bloqueurs de canaux calciques

Inhibiteurs calciques	Effet inotrope négatif	Bradycardie	Dépression conduction auriculo-ventriculaire	Vaso-dilatation
Dihydropyridines	0	0	0	+++
Diltiazem	+	++	++	++
Verapamil	+++	+++	+++	++
Bépridil	+/-	++	++	+/-

2.2. Perfusion d'insuline-glucose lors d'une intoxication par les bloqueurs de canaux calciques

2.2.1. Expérimentale

Dans des études menées chez le chien, Kline et ses collaborateurs [Kline et al., 1993 ; Kline et al., 1995 ; Kline et al., 1996 ; Kline et al., 1997] ont étudié l'effet d'une perfusion d'insuline-glucose lors d'un choc cardiogénique induit par une intoxication aux bloqueurs de canaux calciques, le vérapamil. Les animaux ont été séparés en deux groupes recevant respectivement selon le schéma soit :

- des concentrations croissantes de vérapamil en intra-portale (IP) associées à une perfusion d'insuline-glucose de 1 UI/min d'insuline et du glucose à 50% ;
- une perfusion de 0,1 mg/kg/min de vérapamil en intraveineux (IV) associée à une perfusion d'insuline-glucose de 4 UI/min d'insuline et du glucose à 20%.

La glycémie a été contrôlée entre 5,5 et 11,1 mmol/L. La surveillance a été réalisée par mesure de la pression systolique, de la contractilité du myocarde, de la glycémie, etc....

Au cours de ces expérimentations, l'insuline a montré des effets bénéfiques chez les animaux en augmentant le taux de survie, en améliorant l'inotropisme myocardique ainsi que la perfusion et la fonction cardiaque (systolique et diastolique). Ces effets ont été significativement supérieurs en comparaison aux autres traitements antidotiques (chlorure de calcium, épinéphrine, glucagon). D'ailleurs l'ensemble des animaux traités par la perfusion d'insuline a survécu tandis que, seul 33% de survies ont été obtenus avec l'épinéphrine et aucune avec le glucagon.

L'effet bénéfique (inotrope positif) de l'insuline a été obtenu entre 10 et 15 minutes après le début de la perfusion. Par ailleurs il a été constaté que l'effet de l'insuline persistait bien après l'arrêt de la perfusion.

Dans cette intoxication, les bénéfices sur les animaux ont probablement été dus à une meilleure utilisation des glucides par le myocarde permettant ainsi d'avoir de meilleurs apports énergétiques [Hantson, 2006 (a) et (b) ; Cottrel et al., 2008].

2.2.2. Cliniques

Des cas cliniques ont également été observés où une perfusion d'insuline-glucose a été utilisée comme traitement lors d'un choc cardiogénique rebelle suite à une intoxication par les BCC. Cette perfusion a permis d'observer une amélioration de la condition des patients. En effet l'insuline a été utilisée avec succès dans 11 cas d'empoisonnement par les BCC : cinq avec le vérapamil, trois avec l'amlodipine, deux avec le diltiazem et un avec le nifédipine [Yuan et al.,

1999 ; Morris-kukoski et al., 2000 ; Boyer et al., 2001 ; Marques et al., 2003 ; Meyer et al., 2003 ; Rasmussen et al., 2003].

Dans l'étude de **Yuan et al., 1999** une série de cinq cas d'intoxication par vérapamil et un par amlodipine ont été rapportés. Tous les patients présentaient un choc circulatoire (hypotension, bradycardie et/ou acidose) réfractaire au traitement conventionnel. Après administration d'insuline-glucose, leur statut hémodynamique s'est stabilisé et tous ont survécu sans séquelles. La perfusion d'insuline-glucose utilisée était associée à de fortes doses d'insuline (10 à 20 UI en dose de charge IV suivi de 0,1 à 1 UI/kg/h en perfusion IV continue) et à du glucose pour maintenir une glycémie physiologique. La pression artérielle s'est améliorée en 60 à 90 minutes. La durée de l'administration d'insuline varie selon les patients de 9 à 49 heures. Bien sûr, un tel traitement par insuline entraîne une hypoglycémie qui doit être traitée par l'administration simultanée de glucose ajustée en fonction de la glycémie qui doit être surveillée étroitement.

La perfusion d'insuline et de glucose a permis :

- de compenser le déficit de sécrétion pancréatique d'insuline endogène bloquée par les inhibiteurs calciques ;
- d'améliorer les propriétés contractiles des cellules myocardiques et des cellules musculaires lisses vasculaires en majorant l'entrée intracellulaire du glucose ;
- d'augmenter l'oxydation des lactates et de réduire la production d'acides gras utilisés comme carburant cellulaire au cours du choc, optimisant ainsi le profil métabolique du myocarde face au stress,

[Harris et al., 2006 ; Shepherd et al., 2006 ; Mégarbane et al., 2008].

L'ensemble de ces phénomènes permet d'éviter au cœur une surconsommation inutile en oxygène **[Mégarbane et al., 2008].**

Quelques cas ont néanmoins été rapportés au cours desquels le traitement par la perfusion d'insuline-glucose n'a pas réussi à améliorer la condition du patient **[Herbert et al., 2001 ; Boyer et al., 2002 ; Cumpston et al., 2002 ; Pizon et al., 2005].** Ces observations démontrent les limites des effets bénéfiques de l'euglycémie/hyperinsulinémie dans le traitement des patients intoxiqués par les BCC.

Il semble selon certains auteurs **[Levine et al., 2006 ; Lheureux et al., 2006]** que dans plusieurs cas d'échec, l'administration d'insuline-glucose avait débuté tardivement. Ils

suggèrent donc que ce traitement soit envisagé plus tôt lors d'une intoxication et non pas uniquement en dernier recours.

3. Protocoles d'administration de l'insuline-glucose

Bien qu'aucune étude contrôlée n'ait jusqu'à présent démontré l'efficacité de l'euglycémie/hyperinsulinémie dans le traitement de l'intoxication par les BCC, plusieurs auteurs ont fait mention de cas cliniques survenus chez des adultes. Ce traitement, utilisé conjointement au traitement conventionnel par solutés IV, catécholamines, atropine, stimulateur cardiaque, sels de calcium et glucagon, s'est avéré efficace [Place *et al.*, 2000 ; Meyer *et al.*, 2001 ; Boyer *et al.*, 2001 ; Boyer *et al.*, 2002 ; Rasmussen *et al.*, 2003 ; Marques *et al.*, 2003 ; Min *et al.*, 2004 ; Ortiz-Munoz *et al.*, 2005 ; Hasin *et al.*, 2006 ; Harris *et al.*, 2006].

D'ailleurs, plusieurs auteurs ont formulé des recommandations (figures 4 et 5) d'utilisation de la perfusion d'insuline-glucose pour le traitement des intoxications aux BCC et aux bêta-bloquants [Boyer *et al.*, 2001 ; Boyer *et al.*, 2002 ; Bailey, 2003 ; Megarbane *et al.*, 2004 (a) et (b) ; Shepherd *et al.*, 2005 ; Lheureux *et al.*, 2006 ; Pohler, 2006 ; Shepherd, 2006 ; Megarbane *et al.*, 2008].

Celles-ci préconisent d'administrer :

- un bolus d'insuline de 1 U/kg IV, suivi d'une perfusion de 0,5 – 1 U/kg/h,
- l'euglycémie est assurée par co-administration d'un bolus de 25 g de glucose IV, suivi d'une perfusion de 15 à 30 g/h, à ajuster en fonction de la glycémie.

L'objectif du traitement est d'augmenter la tension artérielle systolique à au moins 100 mg Hg et la fréquence cardiaque à au moins 50 battements par minute, avec en parallèle un suivi rapproché de la glycémie et de la kaliémie, consistant pour :

- la glycémie, en une surveillance toutes les 30 minutes pendant les 4 premières heures au moins et d'ajuster la perfusion de glucose au besoin,
- la kaliémie, en une évaluation chaque heure, et des valeurs maintenues entre 2,8 et 3,2 mmol/L [Greene *et al.*, 2007].

La durée de la perfusion d'insuline-glucose est dictée principalement par la sévérité des signes. Un besoin accru en glucose en cours de traitement peut être un indice de l'efficacité du traitement. On pourra alors diminuer la perfusion d'insuline en fonction de la réponse cardio-

vasculaire. Par ailleurs en raison de sa longue durée d'action, l'insuline pourra être diminuée progressivement, puis cessée lorsque les signes vitaux seront redevenus acceptables.

Récemment, les nouvelles lignes directrices de l'American Heart Association suggèrent de considérer l'utilisation de l'insuline-glucose pour le traitement des deux types d'intoxications : BCC et bêta-bloquants [Blais, 2001].

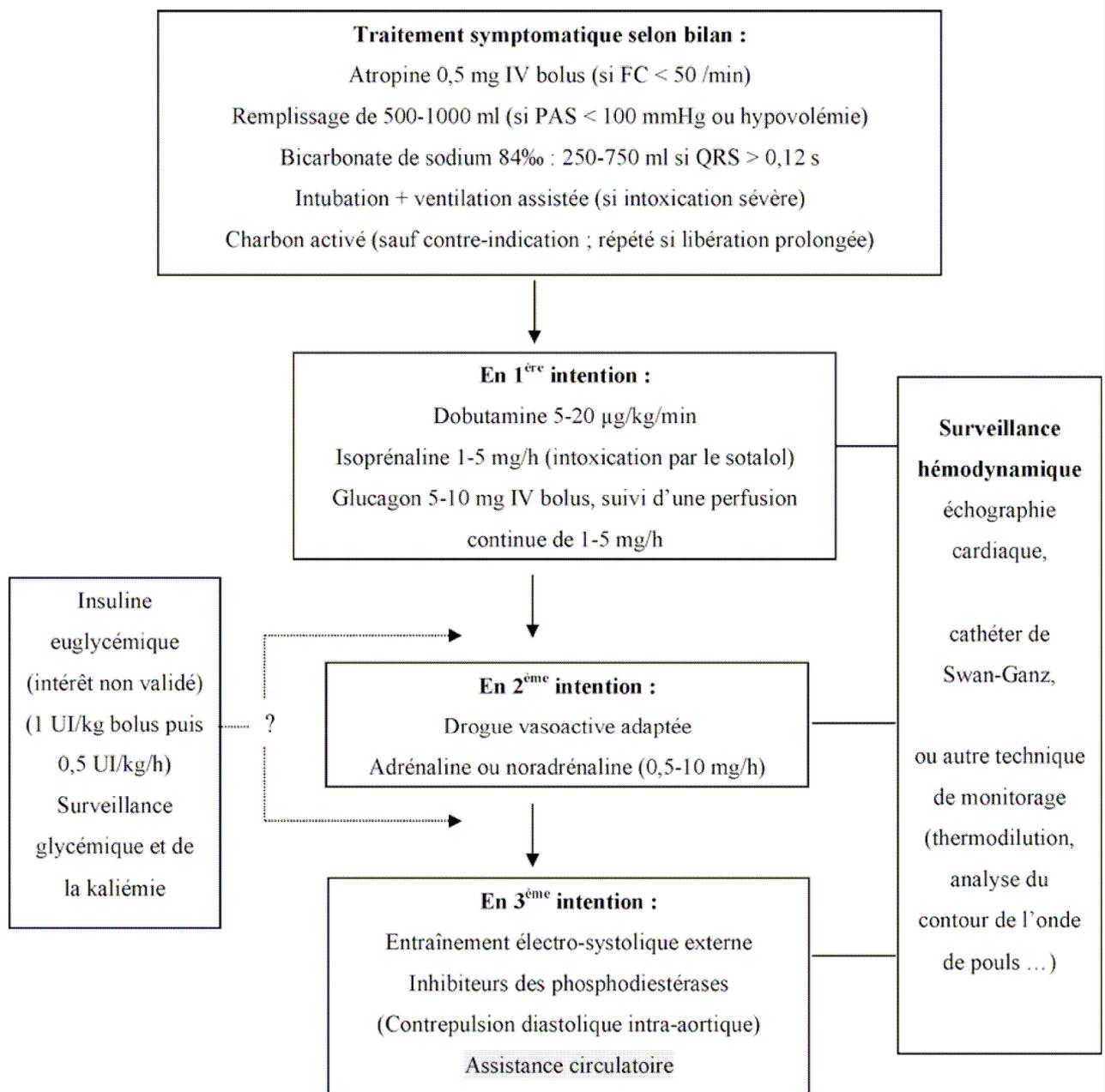


Figure 4 : Algorithme de prise en charge des intoxications par bêtabloquant.

FC : fréquence cardiaque ; PAS : pression artérielle systolique.

D'après [Mégarbane et al., 2009]

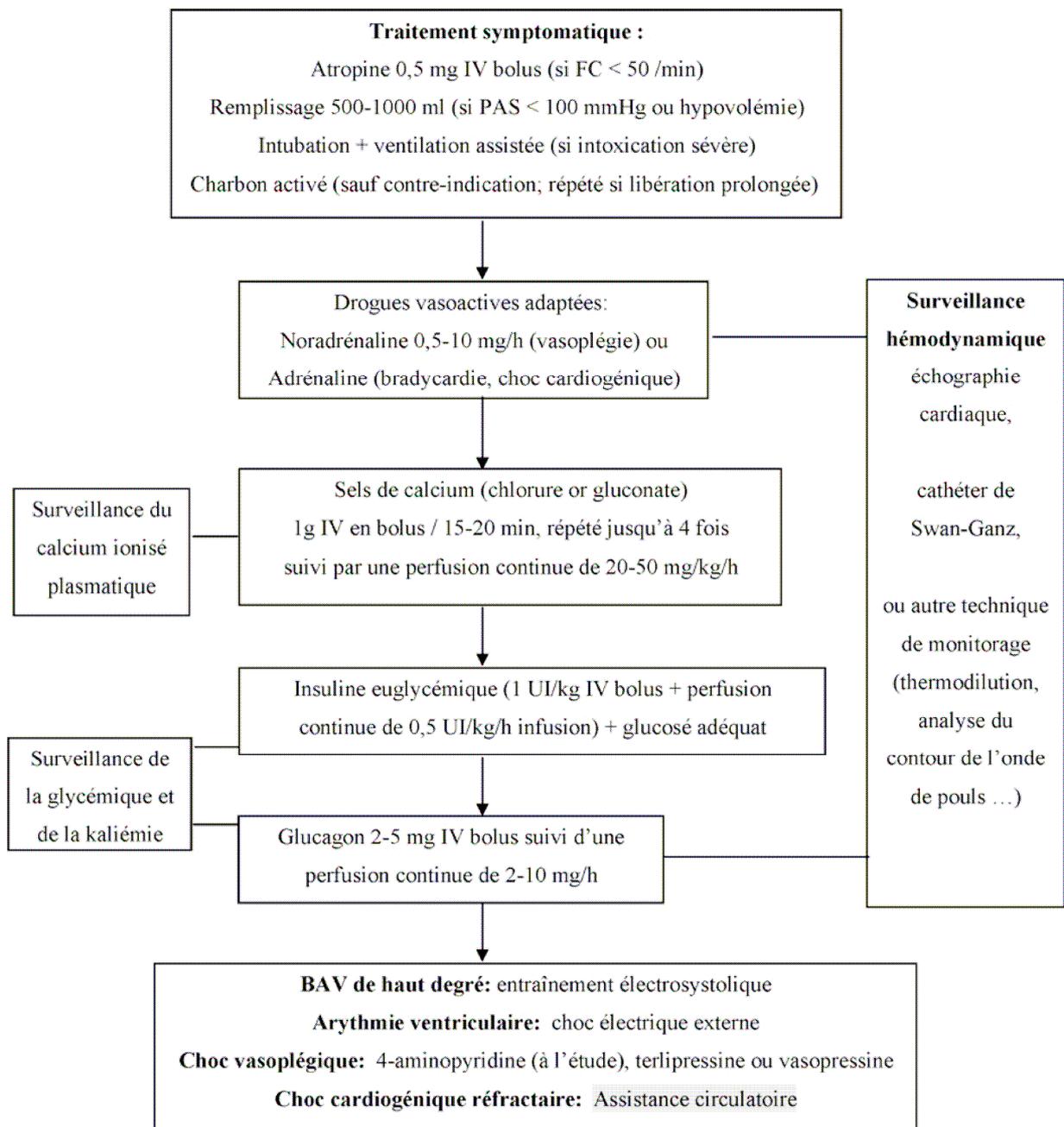


Figure 5 : Algorithme de prise en charge des intoxications par inhibiteurs calciques.
 FC : fréquence cardiaque ; PAS : pression artérielle systolique.
 D'après [Mégarbane et al., 2009]

III. Epidémiologie de l'intoxication à la digoxine

A l'inverse des bêta-bloquants et des bloqueurs de canaux calciques, aucune étude publiée n'a rapporté de cas d'intoxication aux digitaliques associée à un traitement par une perfusion d'insuline-glucose.

En effet, concernant la digoxine, bien que son utilisation thérapeutique soit ancienne et reste toujours validée dans l'insuffisance cardiaque avec ou sans fibrillation auriculaire [Eichhorn et al., 2002], aucune donnée expérimentale à ce jour, n'a évalué l'effet de l'insuline-glucose face ses manifestations toxicologiques.

Or les intoxications, volontaires ou accidentelles (surdosages), par les digitaliques avaient un taux de mortalité élevé (environ 20%) jusque dans les années 1970 [Gaultier et al., 1968]. Depuis l'avènement de l'immunothérapie par fragments Fab anti-digoxine (Digidot®), le pronostic de ces intoxications s'est nettement amélioré mais avec un taux de mortalité persistant de 4-5% [Antman et al., 1990].

Dans le monde occidental, les intoxications aux digitaliques sont essentiellement dues à des surdosages de digoxine chez des sujets âgés ayant une insuffisance cardiaque et une fonction rénale altérée [Eichhorn et al., 2002]. L'incidence de ces intoxications varie de 6 à 23% des patients traités, du fait d'imprécision du diagnostic (signes cliniques aspécifiques dans les formes mineures) [Mahdyoon et al., 1990].

Dans les pays en voie de développement, l'origine des intoxications est plutôt due à l'ingestion accidentelle (enfant) ou volontaire (adulte) de végétaux contenant des glucosides cardiaques tels que les feuilles de digitale pourpre ou de laurier rose. Cela est devenu une forme de plus en plus fréquente de suicide au Sri-Lanka avec environ 400 hospitalisations par an (2^{ème} cause derrière les pesticides) ; 40% de ces patients requièrent un traitement dans une unité de Réanimation avec un taux de mortalité de 10-13% [Eddleston et al., 1999]. Le traitement de ces formes graves par l'immunothérapie spécifique a aussi été validé, avec un taux de mortalité divisé par trois [Eddleston et al., 2000]. Mais le coût élevé de ce traitement (1970 € par patient) fait qu'il n'est plus disponible au Sri Lanka depuis 2002 [Eddleston et al., 2003].

L'intoxication aiguë à la digoxine et aux glucosides cardiaques est donc un véritable problème de santé publique mondiale, dont l'OMS doit se préoccuper avec les cliniciens et les industriels afin de développer des traitements efficaces à des coûts abordables pour les pathologies à fort taux de morbi-mortalité [Trouiller et al., 2002].

Du fait de l'intérêt à évaluer le bénéfice des interactions potentielles entre l'insuline et la digoxine sur la cible d'action de cette dernière, à savoir la pompe Na,K-ATPase, nous allons dans les parties suivantes décrire les effets et les mécanismes d'actions pharmacologiques respectivement de ces deux molécules.

IV. Aspects pharmacologiques de la digoxine

1. Structure et origine de la molécule

La digoxine substance dérivée de la digitaline découverte en 1872 par Claude Adolphe Nativelle [Kassel, 2002], est actuellement l'un des principaux médicaments utilisé en cardiologie. Les cardiotoniques "digitaliques" sont des hétérosides composés d'une fraction osidique et d'une génine (figure 6).

Ils contiennent une fraction aglycone ou génine constituée d'un noyau stéroïde, avec un cycle lactone pentagonal en C17, et d'une fraction glucidique avec des sucres liés en C3, qui confèrent une plus grande hydrosolubilité.

La digoxine est constituée d'une molécule de digoxigénine et de trois molécules de digitoxose.

La structure chimique de la digoxine comporte un groupe OH de plus que la digitoxine mais leurs caractéristiques pharmacocinétiques sont très différentes.

L'ouabaine inhibiteur pharmacologique de la pompe Na,K-ATPase provient de la strophante glabre (*Strophantus gratus*).

Les glycosides cardiaques sont d'origine végétale : digitale laineuse (*Digitalis lanata*, Figure 7A), digitale pourprée (*Digitalis purpurea*, Figure 7B).

D'autres plantes contiennent également des glycosides : la scille (*Scilla maritima*), le laurier (*Nerium oleander*), le muguet (*Convallaria maialis*) qui peuvent être à l'origine d'intoxications parfois graves [Ducluzeau et al., 2003].

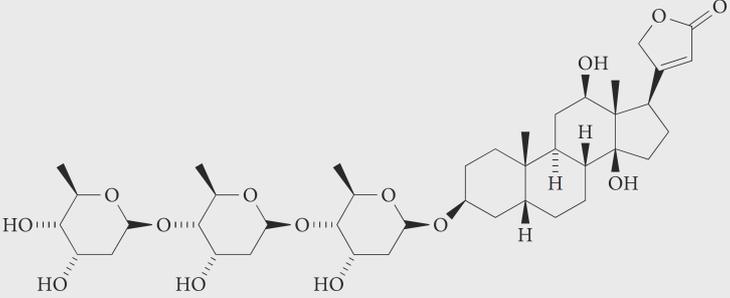
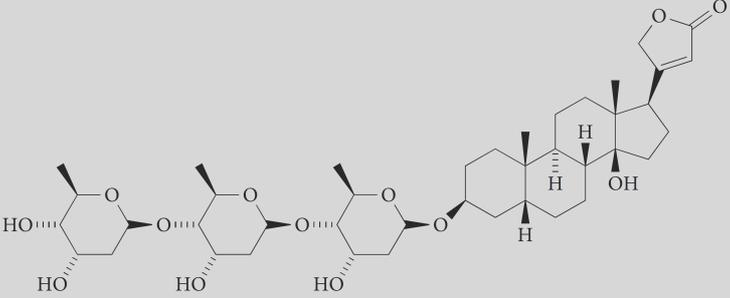
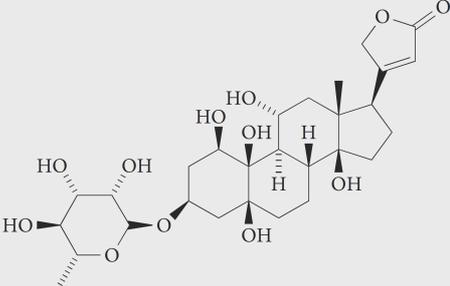
Nom de la molécule	Structure	Propriétés
Digoxine		<ul style="list-style-type: none"> • Famille : Scrophulariaceae • Espèces : <i>Digitalis purpurea</i> • M_r : 780.9 • Formule Chimique : $C_{41}H_{64}O_{14}$
Digitoxine		<ul style="list-style-type: none"> • Famille : Scrophulariaceae • Espèces : <i>Digitalis purpurea</i> • M_r : 764.9 • Formule Chimique : $C_{41}H_{64}O_{13}$
Ouabaine		<ul style="list-style-type: none"> • Famille : Apocynaceae • Espèce : <i>Nerium oleander</i> • M_r : 584.7 • Formule Chimique : $C_{29}H_{44}O_{12}$

Figure 6 : Structure moléculaire de la digoxine, de la digitoxine et de l'ouabaine.
D'après [Prassas et al., 2008]



A

Figure 7A : Source végétale : digitale laineuse (*Digitalis lanata*)



B

Figure 7B : Source végétale : digitale pourprée (*Digitalis purpurea*)

2. Pharmacocinétique des digitaliques

Les propriétés pharmacocinétiques des différentes molécules sont indiquées dans le tableau VI. L'interprétation fiable du pic plasmatique n'est possible qu'à la fin de la distribution depuis le compartiment central, c'est-à-dire plus de 4 à 6 heures après l'ingestion, expliquant la faible valeur pronostique des concentrations plasmatiques dans l'intoxication aiguë. Les risques vitaux peuvent persister pendant 36 heures pour la digoxine chez le sujet à fonction rénale normale et pendant 5 jours pour la digitoxine. Le volume de distribution de la digoxine d'environ 5,6 L/kg signifie que la concentration sérique en digoxine est au moins 30 fois inférieure à sa concentration tissulaire.

Tableau VI : Pharmacocinétique des digitaliques disponibles par voie orale

DCI	Digoxine	Digitoxine *
Spécialités	Digoxine [®] , Hémigoxine [®]	Digitaline [®]
Demi-vie sérique	36 - 48 h	110 h
Excrétion majoritaire	urinaire	biliaire
Cycle entéro-hépatique	Non	Oui
Fixation aux protéines plasmatiques	25-30 %	90 %
Biodisponibilité	60-80 %	100%
Volume de distribution	5,61 L/kg (4 à 7)	0,46 L/kg

* la digitaline n'est plus commercialisée en France depuis 2003

3. Mécanismes d'action

La digoxine se lie spécifiquement à la Na,K-ATPase membranaire (pompe à sodium) et inhibe l'activité de cette enzyme.

3.1. Structure de la Na,K-ATPase

La Na,K-ATPase (sodium-potassium adénosine triphosphatase) est une enzyme membranaire ubiquitaire, qui assure le maintien des gradients de concentrations transmembranaires du sodium et du potassium. Ce gradient va permettre à la cellule de fournir l'énergie pour assurer l'activité des transporteurs nécessaires à la préservation de l'homéostasie [Beguin et al., 1997 ; Djemli-Shipkolye et al., 2000].

Le fonctionnement de cette protéine a été mis en évidence pour la première fois par Jens Christian Skou en 1957 dans les cellules nerveuses de crabes. Cette découverte lui a d'ailleurs valu en 1997 le prix Nobel. Depuis, cette pompe a été classée comme faisant partie d'une famille de protéine : les ATPases de type P. Ces dernières sont principalement localisées au niveau des membranes plasmiques. Elles tirent leur nom du fait qu'elles sont phosphorylées lors du transport des ions contre leur gradient de concentration [Apell, 2004]. Pour la Na,K-ATPase cette phosphorylation ouvrant le cycle de pompage des ions, est précédée par l'hydrolyse de l'ATP qui transfère le groupement phosphate libéré au résidu aspartique de la protéine (Asp 369) [Mikhailova et al., 2002]. Les ATPases de type P se distinguent des autres ATPases (type F et V) par leur capacité à être inhibées par les ions vanadate. Parmi les types P on peut citer la Na,K-ATPase, la H,K-ATPases ainsi que la Ca²⁺-ATPases [Niggli et al., 2008].

La Na,K-ATPase est un complexe transmembranaire actif de plusieurs protéines renfermant principalement une sous-unité α et β de type $(\alpha\beta)_2$, à laquelle vient s'ajouter une nouvelle sous-unité récemment découverte la sous-unité γ (figure 8).

3.1.1. La sous-unité α

Elle est non glycosylée et comporte environ 1000 acides aminés, soit un poids moléculaire de 97-120 kDa [Lingrel et al., 1990; Sweadner et al., 1992; Sharabani-Yosef et al., 1999]. Cette sous-unité traverse la membrane plasmique à dix reprises. Elle présente au niveau cytoplasmique une grande boucle entre le quatrième et le cinquième segment. Par ailleurs les extrémités (NH₂ et COOH) terminales de la protéine sont localisées au niveau intracellulaire. Elles possèdent par ailleurs plusieurs sites de liaison pour les ions et les molécules. Ceux-ci se fixant, soit au niveau extracellulaire (glycosides cardiaques), soit au niveau transmembranaire

(Na⁺, K⁺) soit enfin au niveau cytoplasmique (ATP, PKC...). La sous-unité α est celle qui est responsable de l'activité catalytique. Actuellement quatre isoformes de cette sous-unité ont été identifiées : $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$. L'expression de l'un ou l'autre de ces isoformes dépend du tissu (ou organe) dans lequel il se trouve [Bers et al., 2003 ; Vague et al., 2004 ; Mijatovic et al., 2007] ; ainsi :

- l'isoforme $\alpha 1$ est présent dans la plupart des cellules (ubiquitaire),
- l'isoforme $\alpha 2$ est principalement localisé dans le muscle, le cœur, le tissu adipeux et le cerveau,
- l'isoforme $\alpha 3$ est surtout localisé dans le cœur et le cerveau,
- l'isoforme $\alpha 4$ est retrouvé au niveau des testicules et des spermatozoïdes.

Les isoformes diffèrent également dans leurs affinités aux ions (Na⁺ intracellulaire : $\alpha 1 = \alpha 2 > \alpha 3$ et K⁺ extracellulaire : $\alpha 3 > \alpha 1 = \alpha 2$) [Lingrel, 1992]. Par ailleurs chez les rongeurs, contrairement aux primates, ces isoformes diffèrent aussi dans leurs affinités à l'ouabaine. En effet l'isoforme $\alpha 1$ possède une affinité plus faible pour l'ouabaine (K_i de 1~5x10⁻⁵ M) par rapport à $\alpha 2$ et à $\alpha 3$ qui eux sont à forte affinité (K_i de 1~5x10⁻⁵ M) [Repke et al., 1995].

Le pourcentage de conservation des sous-unités α entre les différentes espèces de mammifères est de 92% pour $\alpha 1$ et $\alpha 2$, et de 96% pour $\alpha 3$. Quant au pourcentage d'homologie, au sein d'une même espèce, entre les séquences $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ il est d'environ 87% [Blanco et al., 1998].

3.1.2. La sous-unité β

C'est une glycoprotéine, hautement glycosylée, d'environ 300 résidus et de poids moléculaire situé entre 35-55 kDa [Orlowski et al., 1988 ; Lingrel et al., 1994a ; Burke et al., 1991 ; Sharabani-Yosef et al., 1999]. Elle est caractérisée par un seul domaine transmembranaire et possède trois sites de glycosylation sur sa partie extracellulaire [Scheiner-Bobis, 2002].

Il a été identifié trois isoformes de cette sous-unité [Bers et al., 2003 ; Vague et al., 2004 ; Mijatovic et al., 2007] :

- $\beta 1$: est le plus largement distribué dans les différents tissus, excepté certains astrocytes, les cellules vestibulaires de l'oreille interne et les muscles glycolytiques à contraction rapide,

- $\beta 2$: est principalement localisé au niveau des muscle squelettique, le cœur, le cerveau,
- $\beta 3$: est notamment isolé dans le cerveau, le poumon, le cœur.

Par ailleurs, cette sous-unité en plus de sa fonction de chaperon moléculaire assure le repliement et l'ancrage approprié de la sous-unité α au niveau de la membrane plasmique. Elle est également indispensable à l'activité de cette enzyme bien qu'elle soit elle-même dépourvue, d'après les connaissances actuelles, de toute activité catalytique.

De récentes études suggèrent que la sous-unité β pourrait être impliquée dans le mécanisme de transport actif et qu'elle pourrait également jouer un rôle de sous-unité régulatrice [Kaplan et al., 1985 ; Geering et al., 2001 ; Vague et al., 2004]. Ceci serait certainement dû au fait qu'elle interagisse par contact direct avec les segments transmembranaire 7 et 10 de la sous-unité α [Morth et al., 2007].

L'identité des séquences entre les espèces de mammifères des isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ est de 95%. Cette valeur tombe à 60% lorsqu'on inclut dans la comparaison les autres espèces. Par ailleurs l'homologie entre les différents isoformes est plus faible que celle constatée pour la sous-unité α . En effet l'homologie entre $\beta 1$ et $\beta 2$ est de 58%, celle entre $\beta 1$ et $\beta 3$ est estimée à 68%. Quant à celle entre $\beta 2$ et $\beta 3$, elle est d'environ 61% [Blanco et al., 1998].

3.1.3. La sous-unité γ

C'est un peptide d'environ 30 acides aminés de 7-11 kDa, co-exprimé avec les sous-unités α et β [Morth et al., 2007]. Son existence a été suggérée il y a une trentaine d'années par Forbush et al., 1978, puis confirmée par plusieurs travaux effectués sur des préparations purifiées de l'enzyme [Reeves et al., 1980 ; Hardwicke et al., 1981 ; Collins et al., 1982]. La sous-unité γ appartient à la famille des FXYP et jouerait un rôle régulateur vis à vis de la Na,K-ATPase et influencerait ses propriétés de transport d'ions [Delprat et al., 2006]. Cette sous-unité participerait également à la stabilisation conformationnelle de la Na,K-ATPase ainsi qu'à l'augmentation de l'affinité aux molécules d'ATP [Therien et al., 2001]. Toutefois elle ne semble pas nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme [Scheiner-Bobis et al., 1994]. Les protéines de la famille FXYP tirent leur nom d'une séquence invariante d'acide aminé répétée et localisée juste avant la partie transmembranaire [Swadner et al., 2000; Faller, 2008]. Il a par ailleurs été mis en évidence qu'entre les résidus du domaine transmembranaire (TM) 9 de

la sous-unité α et les protéines FXYD il existait une interaction fonctionnelle et structurale qui est tissu et isoforme spécifique [Li et al., 2004 ; Geering, 2005].

La famille des protéines FXYD est formée de petites protéines membranaires caractérisées par une signature avec un motif conservé contenant FXYD, deux glycines et une sérine. Chez les mammifères, cette famille comporte sept membres incluant FXYD1 à FXYD7 et où la sous-unité γ de la Na,K-ATPase correspond à FXYD2 (première protéine de cette famille à avoir été isolée). Ces protéines ont un seul segment transmembranaire, et la partie carboxyterminale est dirigée vers le cytoplasme à l'exception de FXYD3 qui a deux segments transmembranaires et dont les deux extrémités se trouvent au niveau cytoplasmique [Delprat et al., 2006 ; Geering, 2006].

De même l'analyse des séquences entre ces protéines aux niveaux des différentes espèces est de 75%, alors qu'il s'élève à 93% si la comparaison est effectuée uniquement au sein des espèces de mammifères [Therien et al., 2000].

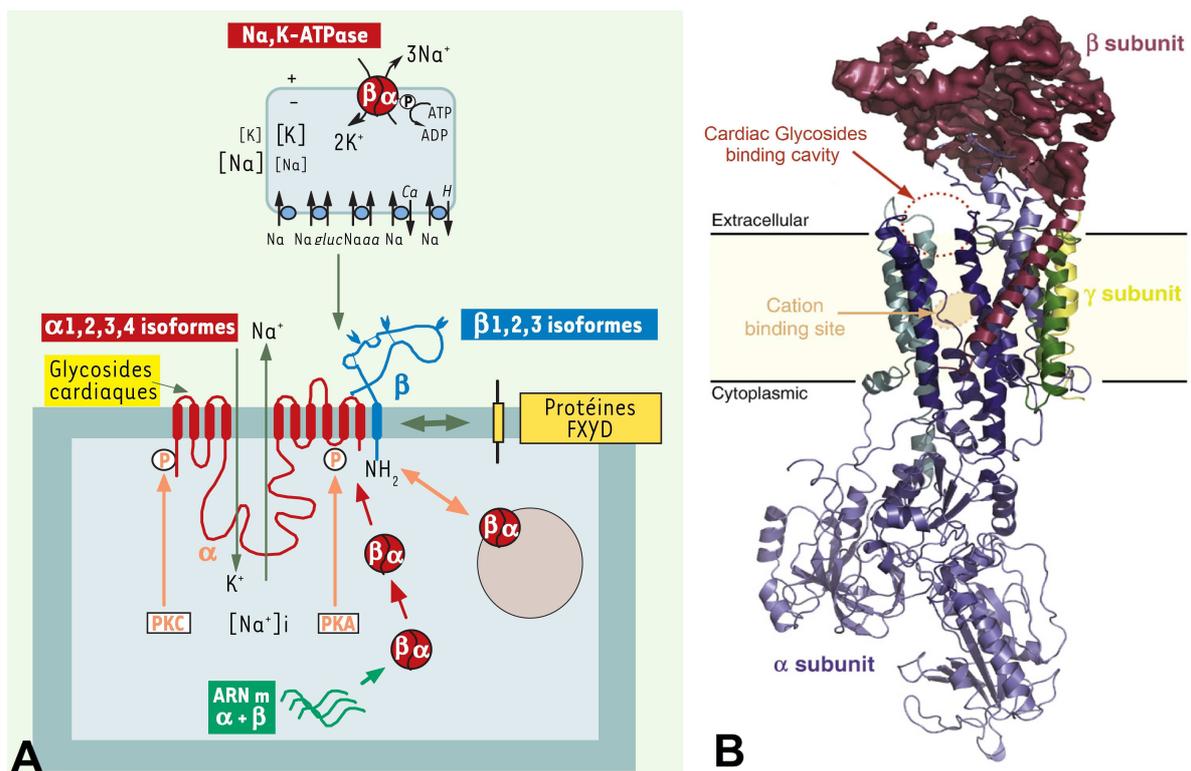


Figure 8 : La Na,K-ATPase : (A) structure et régulation ; (B) structure tridimensionnelle et localisation des sites de liaison avec les cations (Na et K) et les glycosides cardiaques. D'après [(A) Delprat et al., 2006 et (B) Yatime et al., 2009]

3.2. Rôles de la Na,K-ATPase

La Na,K-ATPase au travers de sa structure et des interactions entre ses sous-unités assure sa fonction de système de transport (antiport) responsable du maintien des gradients Na^+ et K^+ à travers la membrane plasmique (figure 9). Ces gradients sont essentiels aux cellules pour contrôler osmotiquement leur contenu en eau et maintenir leur potentiel de membrane. De plus, le gradient de Na^+ fournit l'énergie nécessaire pour l'activité des systèmes de transports secondaires fournissant aux cellules d'autres éléments nécessaires : glucose, acides aminés, calcium, proton. Parallèlement au maintien de l'homéostasie, la Na,K-ATPase exerce selon les tissus différentes fonctions [Delprat *et al.*, 2006] :

- dans les cellules musculaires, l'activité de la Na,K-ATPase est couplée à l'échangeur Na/Ca permettant ainsi la contraction du cœur et des muscles squelettiques,
- dans le rein, la Na,K-ATPase est localisée dans la membrane basolatérale des cellules épithéliales où elle contribue à la réabsorption du Na^+ essentielle au maintien du volume extracellulaire et de la pression sanguine,
- dans les neurones et dans les cellules gliales, la Na,K-ATPase permet la reconstitution des gradients Na^+ et K^+ pendant l'activité neuronale et assure ainsi l'excitabilité neuronale.

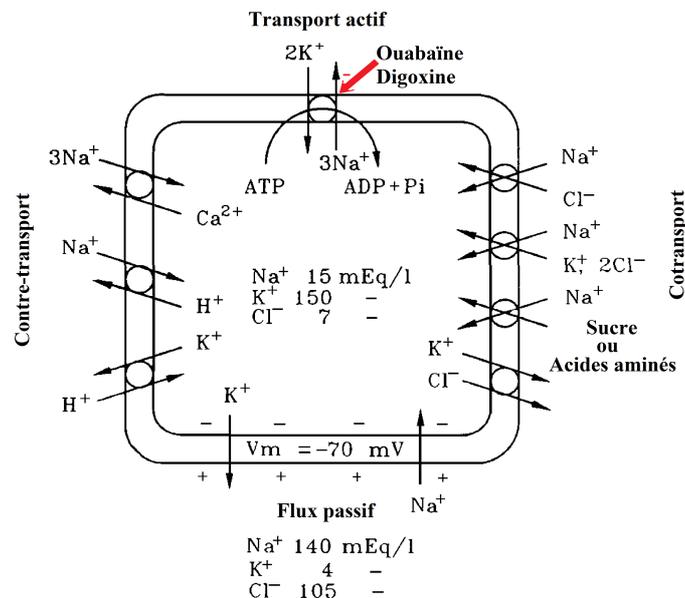


Figure 9 : Schéma récapitulatif des principales conséquences du transport actif du Na^+ et du K^+ . La Na,K-ATPase utilise l'énergie chimique provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour maintenir un gradient entrant pour le Na^+ et un gradient sortant pour le K^+ . L'énergie de ces gradients est utilisée pour effectuer du contre-transport et du cotransport et pour maintenir le potentiel membranaire. D'après [Skou, 2004]

L'enzyme encore appelée pompe Na,K-ATPase car elle « pompe » 3 ions Na^+ de l'intérieure vers l'extérieur de la cellule et 2 ions K^+ de l'extérieur vers l'intérieur. Elle effectue ce transport au moyen d'une énergie apportée par phosphorylation : hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi [Smith et al., 2004].



i et *e* représentent respectivement les secteurs intra- et extracellulaires de la cellule.

L'établissement de ces gradients ioniques primaires est coûteux d'un point de vue énergétique car ils consomment 20 - 30% du stock total d'ATP de la cellule [Jorgensen et al., 1998 ; 2003 ; Schramm et al., 1994].

3.3. Sites et modes d'action des glycosides cardiotoniques

Il est maintenant clairement établi que ces composées moléculaires se fixent et interagissent avec la sous-unité α de l'enzyme. Cette interaction semble s'exercer principalement sur la première boucle extracellulaire reliant les segments transmembranaires TM 1 et TM 2. Néanmoins d'autres segments de l'enzyme sont également suspectés dans cette liaison avec les glycosides (figure 10) notamment la boucle entre TM3 et TM4 [Nesher et al., 2007 ; Keenan et al., 2005 ; Ogawa et al., 2009].

Par ailleurs au niveau de cette première boucle extracellulaire allant de l'acide aminé 111 à 122, deux acides aminés semblent jouer un rôle clé dans l'affinité entre l'enzyme et l'ouabaïne. En effet chez l'homme les deux résidus de la sous-unité α en position 111 et 122 sont respectivement une glutamine (Q) et une asparagine (N) et ceci invariablement quel que soit l'isoforme. Tandis que chez le rat l'isoforme $\alpha 2$ se compose d'une leucine (L) en position 111 et d'une asparagine (N) en position 122, alors que dans l'isoforme $\alpha 1$ on y trouve respectivement une arginine (R) et l'acide aspartique (D). Cette séquence confère à l'isoforme $\alpha 1$ une affinité pour l'ouabaïne 1000 fois plus faible que celle observée chez l'homme. L'isoforme $\alpha 2$ a quant à lui une affinité intermédiaire [Lingrel et al., 1997 ; Keenan et al., 2005 ; Mijatovic et al., 2007].

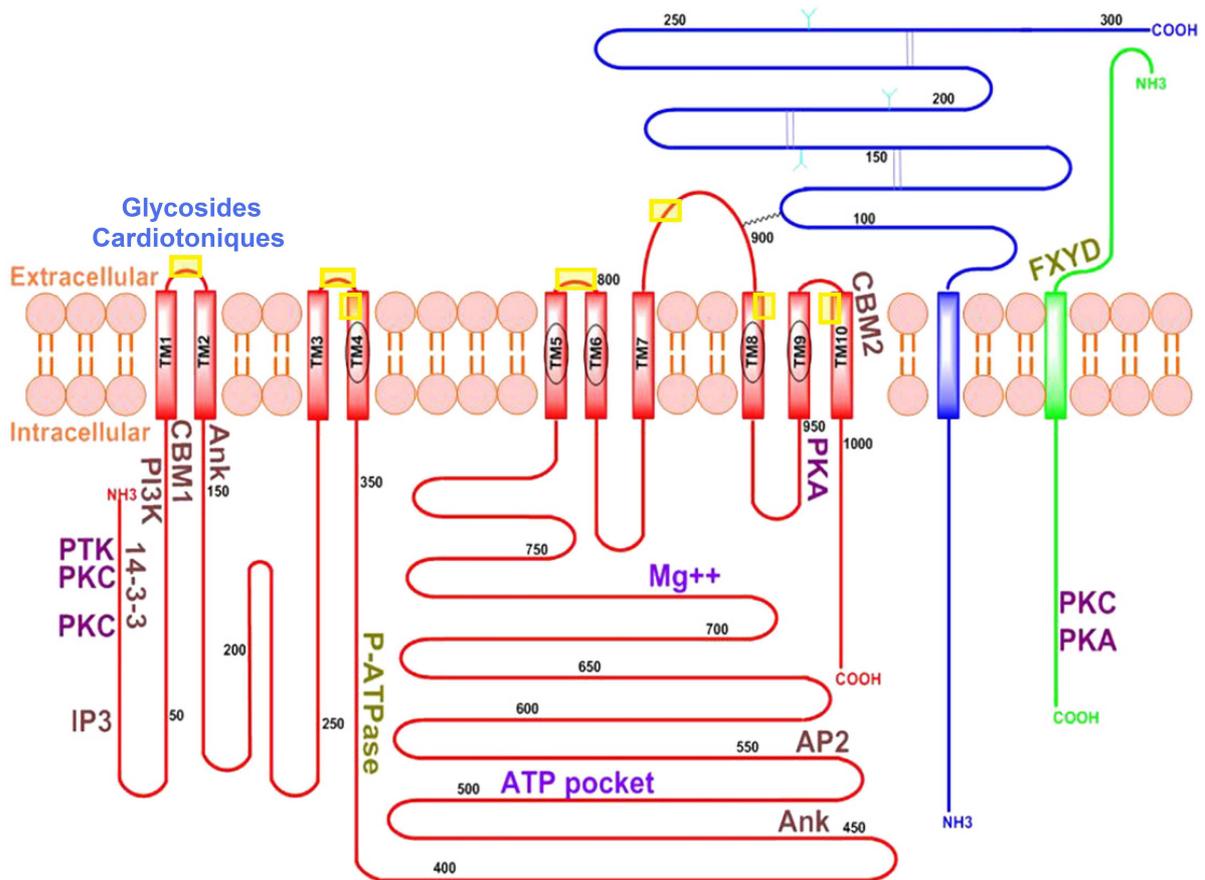


Figure 10 : Schéma de la structure et des sites d'interaction de différents composants avec les sous-unités de la Na,K-ATPase. En rouge la sous-unité α , en bleu la sous-unité β et en vert la sous-unité γ (ou FXYD). Les carrés jaunes représentent les sites de liaison entre l'enzyme et les glycosides cardiotoniques : TM=segment transmembranaire. D'après [Nesher et al., 2007]

L'inhibition de cette pompe par les glycosides cardiotoniques (digoxine, ouabaine...) va bloquer le transport des ions Na^+ et K^+ (figure 11). Ainsi le Na^+ ne pouvant plus sortir de la cellule s'accumule dans le cytoplasme sous la membrane, induisant une diminution du gradient de concentration entre Na^+ extra et intra cellulaire. Ceci entraîne un ralentissement voire un blocage de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (entrée du sodium et sortie du calcium) d'où une moindre sortie de Ca^{2+} . Parfois on observe même une inversion dans l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ conduisant à une entrée de Ca^{2+} dans la cellule [Sticherling et al., 2000]. L'augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} active les éléments contractiles (filaments d'actomyosine) au niveau du cœur et des fibres vasculaires lisses à l'origine de l'effet inotrope positif [Ducluzeau et al., 2003 ; Alain, 2001 ; Dawson et al., 2007]. L'inhibition de cette pompe va également influencer sur la balance interne du potassium en faveur d'une hyperkaliémie extracellulaire. En effet, le blocage de la pompe empêche le K^+ d'entrer au niveau cellulaire.

Outre son action de pompe ionique, la stimulation de la Na,K-ATPase induit la mise en action de différents second messager (figure 11) entre le signal membranaire et le noyau. Ainsi sur le cardiomyocyte, cette enzyme a des propriétés prolifératives par activation de plusieurs facteurs transcriptionnels (AP-1 ; NF- κ B) et augmente aussi la production de radicaux libres par la mitochondrie [Xie *et al.*, 2002]. Sur d'autres lignées cellulaires (muscle lisse endovasculaire) elle active la protéine p42/44 stimulant sa prolifération [Xie *et al.*, 2002].

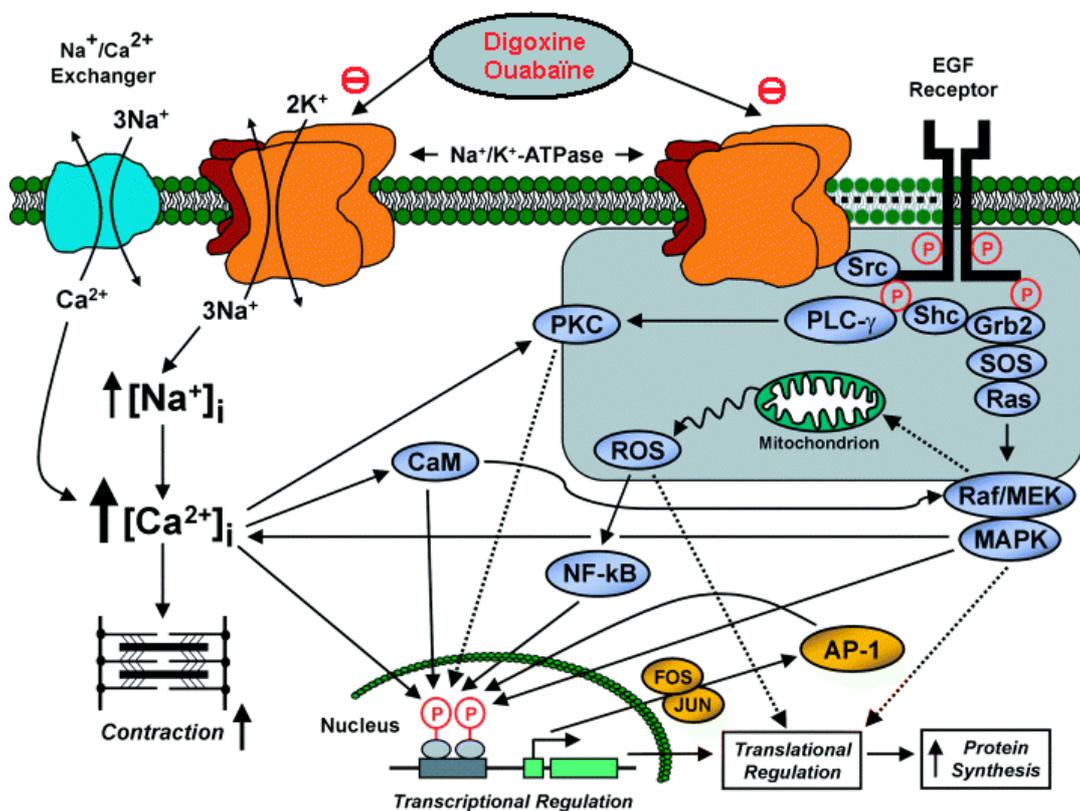


Figure 11 : Schéma de l'action inhibitrice des glycosides cardiaque sur la pompe Na,K-ATPase et ses conséquences sur le cardiomyocyte. D'après [Xie *et al.*, 2002]

4. Effets cliniques

Les digitaliques ont été utilisés pour leurs propriétés tonicardiaques (figure 12) bien avant que l'on connaisse leur mécanisme d'action. En effet, la digitale a été introduite en thérapeutique en 1785 par Sir William Withering. Aujourd'hui la digoxine est le digitalique le plus utilisé.

4.1. Action sur le myocarde

La digoxine a pour propriété essentielle d'augmenter le débit cardiaque chez l'insuffisant cardiaque. Son action sur le cœur s'exerce au moyen de cinq effets [Lamere, 2005 ; Vacheron et al., 1999] :

- l'Effet inotrope positif : augmentation de la force de contraction du myocarde suite à l'élévation de la concentration du calcium au niveau des filaments d'actomyosine. Cela s'accompagne d'une augmentation de la vitesse de contraction, du volume d'éjection systolique et du débit cardiaque, mais aussi d'un raccourcissement de la durée de la systole avec allongement relatif de la diastole ainsi que d'une diminution du volume et de la pression télédiastolique.
- Effet tonotrope positif : augmentation du tonus du muscle cardiaque et réduction du volume ventriculaire. D'où chez l'insuffisant cardiaque au cœur dilaté, il en résultera une réduction de la taille du cœur en diastole et une augmentation du débit cardiaque notamment par réduction du volume résiduel.
- Effet bathmotrope positif : augmentation de l'excitabilité du myocarde, ce qui favorise l'apparition de post-dépolarisations tardives. Quant à la période réfractaire du myocarde auriculaire et ventriculaire elle est diminuée tandis que celle du nœud auriculo-ventriculaire est augmentée.
- Effet chronotrope négatif : ralentissement du cœur (action bradycardisante) par action directe sur le cœur au niveau du tissu conducteur, mais aussi par action indirecte sur le système nerveux autonome via l'excitation vagale et la diminution du tonus sympathique (médiée par les catécholamines).
- Effet dromotrope négatif : la digoxine ralentit la vitesse de conduction auriculo-ventriculaire, par effet direct et indirect médié par l'intermédiaire de l'acétylcholine.

4.2. Action vasculaire

La digoxine augmente les résistances vasculaires périphériques en agissant directement sur les fibres vasculaires lisses artérielles et veineuses. Ainsi chez l'insuffisant cardiaque cela va

entraîner une dilation veineuse et artériolaire dont le mécanisme est médié par l'inhibition de la stimulation sympathique exagérée. En effet chez l'insuffisant cardiaque il y a une hyperactivité adrénérgique (concentration plasmatique anormalement élevée en norépinéphrine). Par ailleurs chez l'insuffisant cardiaque la digoxine réduit les besoins du cœur en oxygène. En effet malgré l'augmentation de la contractilité myocardique (effet inotrope positif), elle réduit la taille du cœur, ralentit son rythme et diminue les résistances périphériques [Longhurst et al., 1985].

4.3. Action sur le système nerveux autonome (SNA)

Les effets de la digoxine sur le système nerveux autonome participent à son action bradycardisante en diminuant la fréquence sinusale et en augmentant la période réfractaire du nœud auriculo-ventriculaire. Elle se fait principalement par inhibition du système sympathique et stimulation du vague parasympathomimétique (directement ou indirectement) par l'intermédiaire des barorécepteurs. Ainsi au niveau des baro-récepteurs aortiques (carotidiens), auriculaires et pulmonaires, la digoxine inhibe la pompe Na,K-ATPase des cellules baro-réceptrices, dont l'activité est anormalement augmentée au cours de l'insuffisance cardiaque, restaurant ainsi la sensibilité du baroréflexe. Il en résulte une diminution de l'activité du système sympathique et un rétablissement partiel du tonus vagal [Jan, 2004 ; Seronde, 2005].

Chez l'insuffisant cardiaque, il existe une augmentation anormale de l'activité de la Na,K-ATPase au niveau des barorécepteurs qui perdent ainsi leur sensibilité. En s'y opposant par l'inhibition de la Na,K-ATPase, les digitaliques exercent un effet bénéfique, notamment sur des symptômes fonctionnels rencontrés en cas d'insuffisance cardiaque et ceci indépendamment de leur action directe [Seronde, 2005].

4.4. Manifestation électrocardiographique

La digoxine ralentit la fréquence cardiaque et modifie le potentiel d'action (PA). Cette altération du PA explique les anomalies de la repolarisation qu'elle provoque sur l'électrocardiogramme [Alain, 2001 ; Seronde, 2005] :

- abaissement du point J,
- sous-décalage du segment ST avec raccourcissement de l'intervalle QT, donnant une image de cupule à concavité supérieure englobant plus ou moins l'onde T,
- aplatissement de l'onde T qui devient biphasique ou négative mais toujours asymétrique,
- raccourcissement de l'intervalle QT,

- allongement discret de l'intervalle PR.

Ces signes ECG ne sont pas des signes d'intoxications mais ils témoignent d'une imprégnation du digitalique au niveau du myocarde.

A l'arrêt du traitement, les troubles de la repolarisation régressent très lentement et parfois en quelques mois.

4.5. Action diurétiques

La digoxine augmente la diurèse par stimulation des barorécepteurs, qui diminuent la sécrétion d'hormones antidiurétiques, et augmentent l'excrétion du sodium et de l'eau libre ; ceci par la diminution du tonus sympathique et la diminution de la stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone [**Longhurst, 1984**].

La digoxine exerce également une action directe sur le néphron par inhibition de la pompe Na,K-ATPase [**Lloyd et al., 1992**].

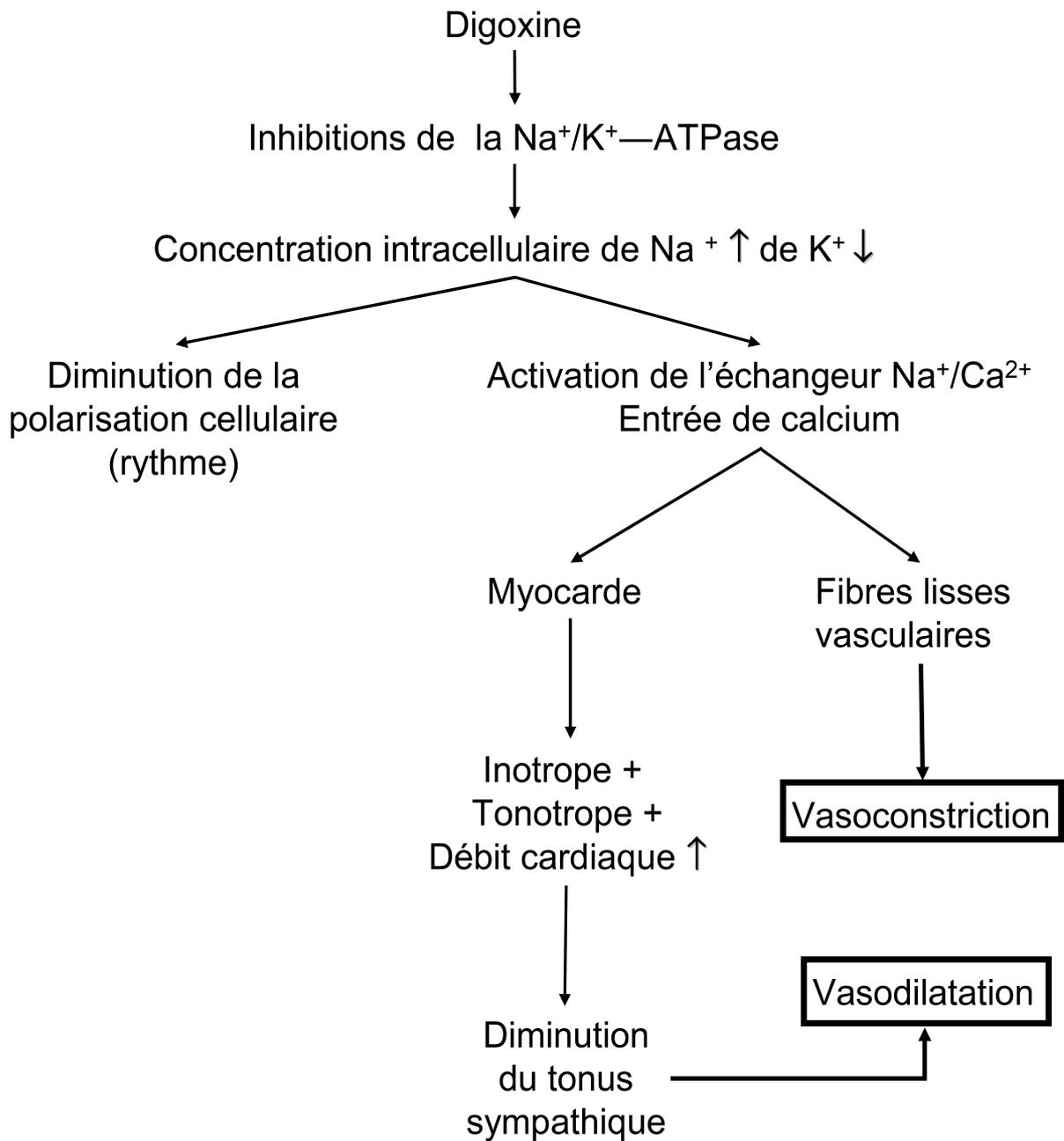


Figure 12 : Vue d'ensemble des effets de la digoxine. D'après [Alain, 2001]

5. Autres effets des glycosides cardiaques

De nouvelles applications des substances digitaliques sont actuellement évoquées dans la littérature. En effet des études récentes ont rapporté l'existence de nombreuses voies de signalisation cellulaires de la pompe Na,K-ATPase, permettant ainsi d'explorer une nouvelle propriété pharmacologique de la digoxine et plus globalement des glycosides cardiotoniques [Xie et al., 2002 ; Kometiani et al., 2005 ; Aperia et al., 2007]. Ce nouvel effet aurait une action bénéfique dans la thérapeutique anticancéreuse [Lefranc, Kiss et al., 2008 ; Zhang et al., 2008 ; Simpson et al., 2009].

Pourtant déjà en 1967, des recherches ont montré que l'utilisation des glycosides limitait la croissance des cellules néoplasiques [Shiratori, 1967]. Dans les années 80 des chercheurs suédois ont rapporté lors d'une étude épidémiologique l'effet bénéfique d'un traitement par la digoxine sur le cancer du sein [Stenkvis et al., 1979 ; 1980 ; 1982]. Il a été observé en effet que des femmes ayant le cancer du sein, et qui suivent en plus un traitement cardiaque à l'aide de glycosides cardiotoniques, développaient moins de cellules malignes que les femmes ne suivant pas ce traitement [Stenkvis et al., 1982]. Ils ont également constaté qu'après cinq années de mastectomie, le taux de récurrence du cancer du sein chez les patientes sous traitement digitalique était 9,6 fois plus faible par rapport aux patientes sans traitement digitalique. Les recherches ont été reprises récemment et orientées vers les cancers du cerveau, du sang, du sein et de la prostate. Des résultats bénéfiques sur les cellules cancéreuses ont depuis été rapportés dans de nombreux travaux expérimentaux d'études *in vivo* et *in vitro* [López-Lázaro et al., 2007 ; Mijatovic et al., 2007 ; Winnicka et al., 2006]. D'ailleurs certains essais cliniques actuels évaluent l'effet des glycosides cardiaques comme thérapeutique anticancéreuse [Mekhail et al., 2006 ; Mijatovic et al., 2006 ; Newman et al., 2008].

Un chercheur norvégien [Haux, 1999] a par ailleurs montré qu'utilisée à des doses non toxiques, la digitoxine provoquait la mort cellulaire programmée des cellules cancéreuses, rapprochant leur comportement de celui des cellules saines qui meurent normalement par apoptose. Effectivement le souci majeur de cette classe des médicaments est sa faible marge thérapeutique.

Toutefois les mécanismes d'actions moléculaires qui favorisent la sensibilité des cellules cancéreuses aux glycosides cardiaques restent encore inconnus, mais un certain nombre de voies sont suggérées (figure 13).

Ces données ouvrent la voie à de nouvelles perspectives dans la prise en charge de la maladie cancéreuse.

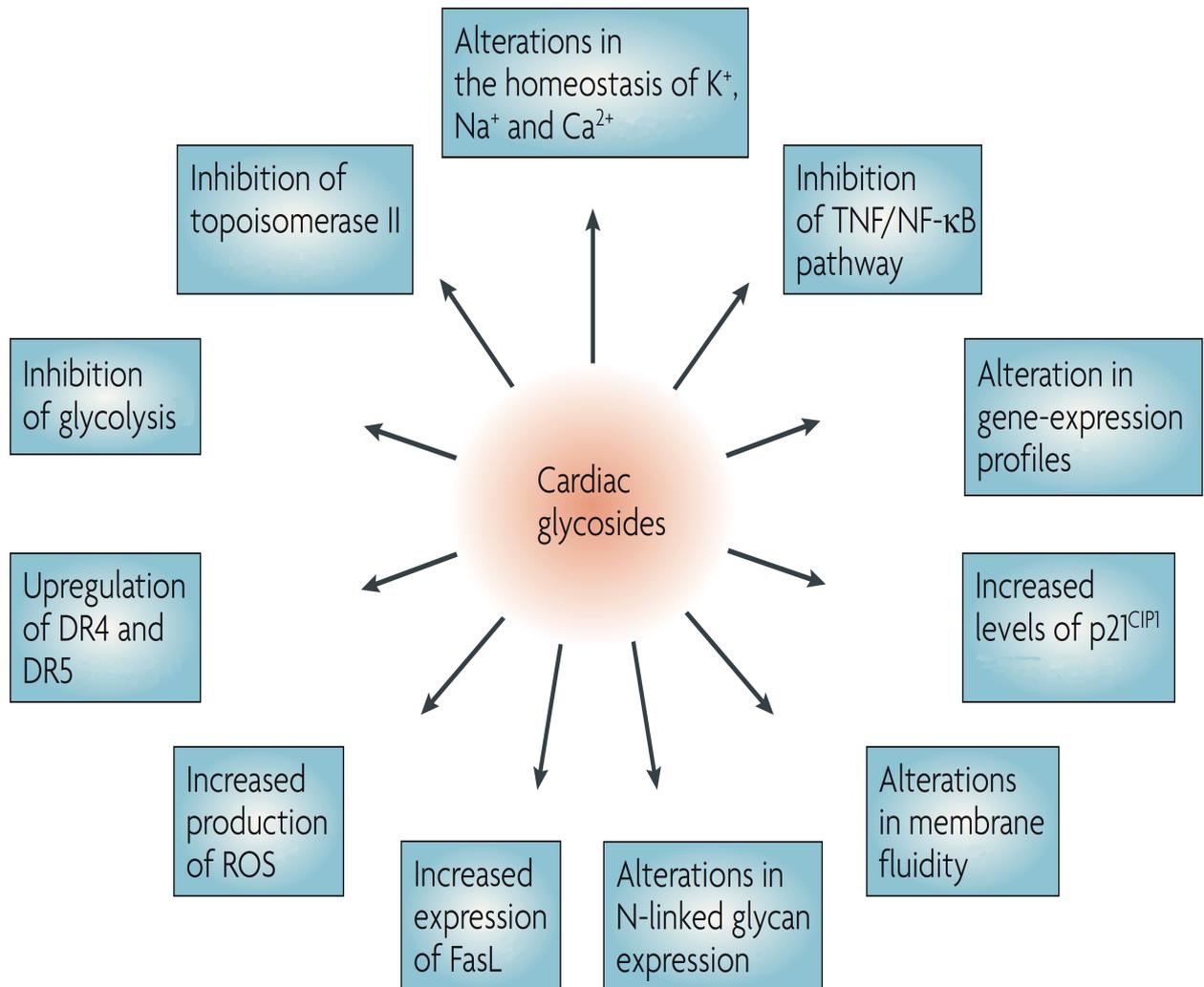


Figure 13 : Cible d'action des glycosides cardiotoniques pour un effet anti cancéreux.
D'après [Prassas *et al.*, 2008]

6. L'intoxication digitalique

6.1. Incidence de l'intoxication aux digitaliques

L'incidence de l'intoxication aux digitaliques est relativement faible mais augmente du fait du vieillissement de la population et du recours plus fréquent à ce type de traitement [Wofford et al., 1991]. L'intoxication aiguë résulte d'une ingestion massive à but suicidaire, d'un surdosage secondaire à une erreur de posologie, à la confusion entre 2 médicaments ou à un mésusage chez l'enfant [Gittelman et al., 1999]. L'ingestion de plantes contenant un hétéroside cardiotonique (*Digitalis lanata* et *purpurea*, *Nerium oleander*, *Thevetia peruviana*) peut également être responsable d'un tableau clinique similaire [Bourgeois et al., 2005]. L'altération de la fonction rénale, notamment chez le sujet âgé, favorise le surdosage en digoxine. D'autres facteurs tels que l'hypothyroïdie, l'âge avancé, l'insuffisance cardiaque avancée, l'ischémie myocardique, l'hypoxémie ainsi que la co-ingestion avec les autres médicaments (amiodarone, vérapamil, quinidine), les troubles électrolytiques (hypokaliémie, hypomagnésémie, hypercalcémie) quelques fois causés par des diurétiques, et les déséquilibres acido-basiques, peuvent conduire à une augmentation de la sensibilité myocardique aux digitaliques [Fréjaville et al., 1971]. En pratique il faut distinguer trois situations selon [Bayer, 1991] :

- les intoxications aiguës pures chez les patients qui ne prennent pas habituellement ce type de traitement,
- les intoxications aiguës chez les patients traités antérieurement par les digitaliques,
- les intoxications chroniques chez les patients traités par les digitaliques consécutives le plus souvent à une diminution de l'élimination du digitalique comme lors de l'insuffisance rénale.

6.2. Description clinique de l'intoxication digitalique

Les intoxications par la digoxine se manifestent par différents symptômes non spécifiques (nausées, vomissements, anorexie, fatigue, vertiges, dyschromatopsie, hyperkaliémie en cas d'intoxication aiguë) et par des arythmies potentiellement mortelles (troubles du rythme supra-ventriculaire, troubles de la conduction auriculo-ventriculaire, troubles de l'excitabilité ventriculaire) [Dubuc, 2000]. Bien qu'ayant un tropisme pour le cœur, une intoxication digitalique provoque des manifestations cardiaques et non cardiaques [Bauman et al., 2006 ; Levine et al., 2009 ; Thacker et al., 2007 ; Schreiber, 2008].

Les manifestations initiales : ce sont l'apparition quasi-constante de troubles digestifs (80%), avec nausées, vomissements ; leur apparition s'échelonne entre quelques minutes et 12 heures ; leur durée est sans rapport avec la dose de digitaline ingérée, et n'est pas raccourcie par l'administration d'atropine. Les douleurs abdominales et la diarrhée se manifestent environ chez 20% des malades, et sont toujours associées à des vomissements [**Schaumann et al., 1986**]. Il existe un risque d'infarctus mésentérique lié à une baisse du débit splanchnique (hypovolémie et vasoconstriction).

Les troubles cardiovasculaires : ils apparaissent à partir de la 6^{ème} heure. La pression artérielle est longtemps conservée, en raison d'un tonus sympathique vasoconstricteur. L'association des différents troubles est difficile à schématiser ; leur enchaînement est imprévisible. Ils peuvent varier d'un instant à l'autre et sont de plusieurs types [**Bhatia et al., 1987 ; Kelly et al., 1992 ; Gittelman et al., 1999**] :

- Des troubles de la conduction sino-auriculaire, auriculo-ventriculaire (BAV 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} degrés) et intraventriculaire : ils peuvent conduire à une bradycardie extrême avec désynchronisation des épisodes réfractaires, à l'origine de ré-entrée ventriculaire et donc de tachycardie ventriculaire.
- Des troubles de l'automatisme : ils sont variés et comportent des extrasystoles ventriculaires (ESV) bigémées, polymorphes voire bidirectionnelles, un rythme jonctionnel accéléré, des foyers ectopiques (hyperautomatisme) ou des phénomènes de ré-entrée.
- Des troubles de repolarisation : présence d'ondes T aplaties voire négatives, abaissement du point J avec sous-décalage du segment ST sous la forme d'une cupule à concavité supérieure, raccourcissement du segment QT.

Les signes neurosensoriels : obnubilation et somnolence ou agitation et angoisse sont observées chez 25% des malades. Un certain nombre d'entre eux présente une véritable psychose aiguë (avec confusion mentale et délire hallucinatoire) ; ce trouble ne coïncide pas avec une chute de la pression artérielle ou un trouble hydro-électrolytique ; par contre, l'administration d'atropine l'augmente indiscutablement. L'asthénie musculaire est constante, souvent associée à des myalgies diffuses et à des céphalées. Ces manifestations ne sont pas calmées par l'atropine mais répondent favorablement au traitement antidotique. Malheureusement, l'apparition de ces symptômes n'est pas graduelle. Troubles visuels : vision floue, photophobie, scotomes scintillants et/ou dyschromatopsie sont rares : environ 5% des cas [**Cooke, 1993**].

L'atteinte rénale : elle est très fréquente lors de l'intoxication digitalique mais n'est pas le fait d'une action rénale du toxique [**Tuncok et al., 1997**], elle est rarement préoccupante. Il

est d'ailleurs difficile de faire la part dans sa genèse entre les perturbations hémodynamiques de ces malades et la restriction hydrosodée à laquelle ils sont soumis.

Les décès : ils surviennent dans les suites de fibrillation ventriculaire (65% des cas), d'asystole prolongée (25%) ou d'insuffisance circulatoire sévère (10%). L'hyperkaliémie est un signe constant d'intoxication aiguë grave aux digitaliques [Dally et al., 1981]. Les kaliémies mesurées à l'admission et à la 12^{ème} heure sont significativement plus élevées chez les patients décédés que chez les survivants [Hickey et al., 1991]. L'imputation de l'hyperkaliémie aux digitaliques et l'analyse de sa valeur pronostique ne peuvent cependant être considérées qu'en l'absence d'acidose, de diurétiques hyperkaliémiant, d'apports potassiques et d'insuffisance circulatoire [Urtizbera et al., 1991].

6.3. Physiopathologie de l'intoxication

Les troubles ECG secondaires à l'intoxication aiguë sont liés à l'inhibition de l'ATPase membranaire [Akeru et al., 1991 ; Ma et al., 2001]. L'automaticité des fibres de Purkinje et des pacemakers est augmentée tandis que l'excitabilité, la vitesse de conduction et la période réfractaire effective des cellules atriales et ventriculaires sont déprimées. L'inhibition de l'ATPase membranaire provoque une hyperkaliémie qui traduit en fait une déplétion potassique intracellulaire. L'hypokaliémie peut, à l'inverse, favoriser la toxicité des digitaliques en favorisant leur fixation aux récepteurs cellulaires myocardiques.

La physiopathologie précise des troubles neurosensoriels secondaires à l'intoxication n'est pas parfaitement élucidée. Les vomissements résultent d'une action sur *l'area postrema* ou d'une irritation gastrique. Il existe une baisse du débit splanchnique à dose pharmacologique chez le sujet sain et un effet vasoconstricteur sur les vaisseaux mésentériques, pouvant expliquer les ischémies mésentériques observées dans certaines intoxications aiguës graves.

6.4. Le traitement de l'intoxication

Le traitement de l'intoxication aux digitaliques fait appel depuis 1976 aux fragments Fab (figure 14) spécifiques des glucosides cardiotoniques [Smith et al., 1976]. La dose optimale d'anticorps antidigitaliques à administrer n'est pas actuellement clairement définie. La posologie à administrer se base sur une neutralisation équimolaire du digitalique par les anticorps [Parant et al., 2003]. Mais dans certaines situations, en particulier dans certaines intoxications aiguës, une dose inframolaire de fragments Fab peut être suffisante pour traiter les signes de l'intoxication [Hickey et al., 1991].

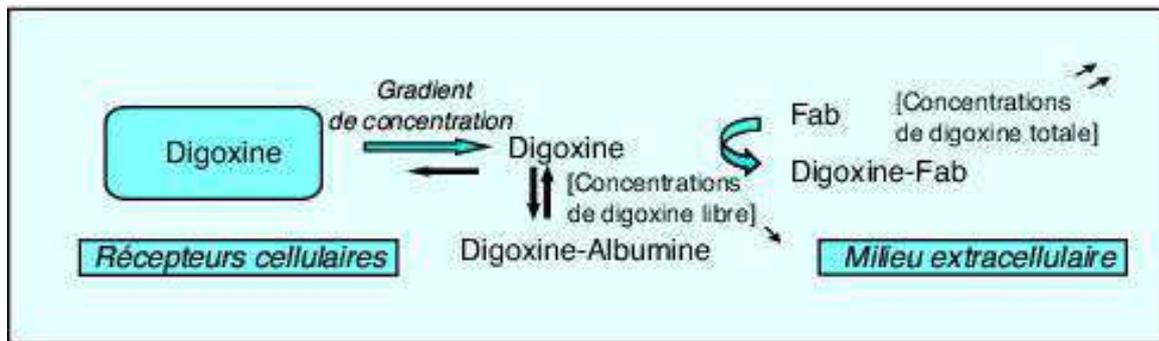


Figure 14 : Mécanisme d'action des fragments Fab anti-digitalique.
D'après [Parant et al., 2003]

V. Aspects pharmacologiques de l'insuline

1. Structure

L'insuline est la première protéine dont la séquence primaire a été complètement déterminée en 1955 par le britannique Frederick Sanger, cela lui a d'ailleurs valu le prix Nobel 1958 [Sanger et al., 1953 (a) et (b)]. Sa structure tridimensionnelle a été analysée par cristallographie aux rayons X en 1969 par Dorothy Crowford Hodgkin et ses collaborateurs à Oxford [Baker et al., 1988]. L'insuline est un polypeptide de 5 800 Daltons, constituée de 51 acides aminés. Elle est constituée d'une chaîne A de 21 acides aminés et d'une chaîne B de 30 acides aminés, reliées par deux ponts disulfures, A7-B7 et A20-B19 (figure 15). Un pont disulfure supplémentaire, intracaténaire, est présent à l'intérieur de la chaîne A reliant les acides aminés A6-A11. Le monomère est la forme bioactive de l'hormone. C'est sous cette forme qu'existe la molécule d'insuline dans la gamme des concentrations physiologiques et à pH neutre. Le monomère d'insuline présente une structure globulaire dont le centre est constitué d'un noyau hydrophobe. A concentrations supraphysiologiques et à pH neutre ou acide, l'insuline forme des dimères en absence d'atome de zinc. En présence de ces derniers qui jouent le rôle de coordinateurs, trois dimères peuvent s'associer pour former des cristaux d'hexamères ayant une structure sphérique. Les hexamères d'insuline représentent la forme de stockage majeure de l'hormone dans les granules de sécrétion (figure 16) [Allain, 2006].

La structure primaire de l'insuline humaine est assez similaire de l'insuline porcine et bovine (Tableau VII).

Tableau VII : Différence entre les origines des insulines

Origine	AA position 8	AA position 10	AA position 30
Insuline Humaine	Thréonine	Isoleucine	Thréonine
Insuline Porcine	Thréonine	Isoleucine	Alanine
Insuline Bovine	Alanine	Valine	Alanine

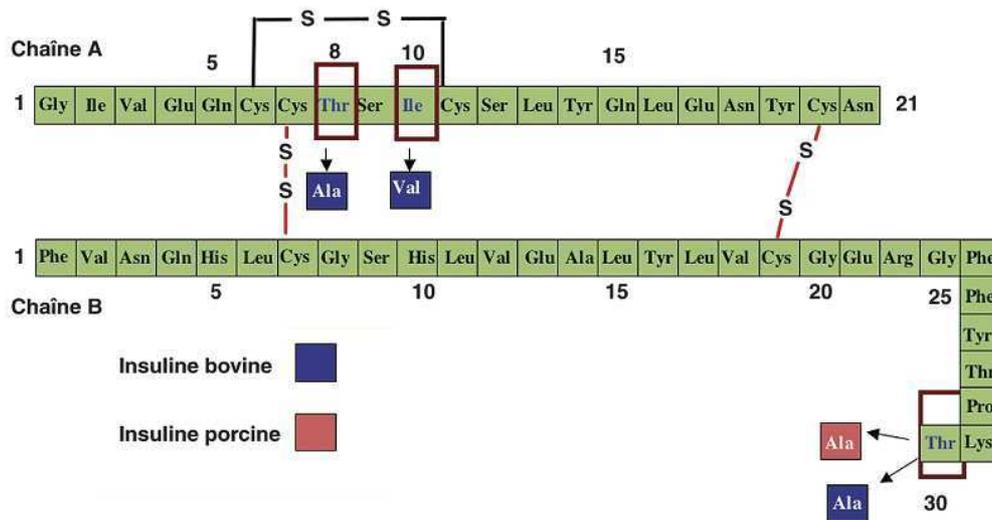


Figure 15 : Structure primaire de l'insuline humaine. D'après [Magnan *et al.*, 2005]

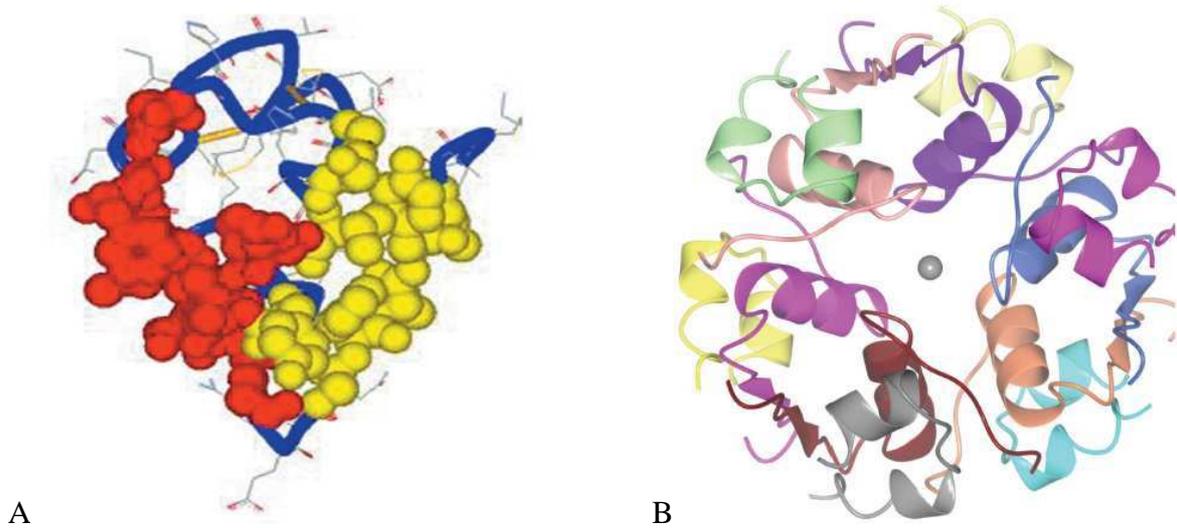


Figure 16 : Structure tridimensionnelle de l'insuline (A : monomère, B : hexamère)
 D'après [De Meyts, 2005 ; Dodson, 2008]

2. La sécrétion de l'insuline

L'insuline est sécrétée (figure 17) par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. Les mécanismes de sa sécrétion, biphasique et pulsatile, sont aujourd'hui bien connus. L'entrée du glucose, par transport passif via les transporteurs GLUT2, dans la cellule β stimule la sécrétion d'insuline par deux voies de transduction distinctes qui requièrent son métabolisme. La première, appelée également voie dépendante des canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}), est associée à la phase de sécrétion précoce et transitoire. La seconde voie indépendante des K_{ATP} , est associée à l'amplification et au maintien de la sécrétion d'insuline, ainsi qu'à l'activation de sa synthèse de novo [Aizawa et al., 1994].

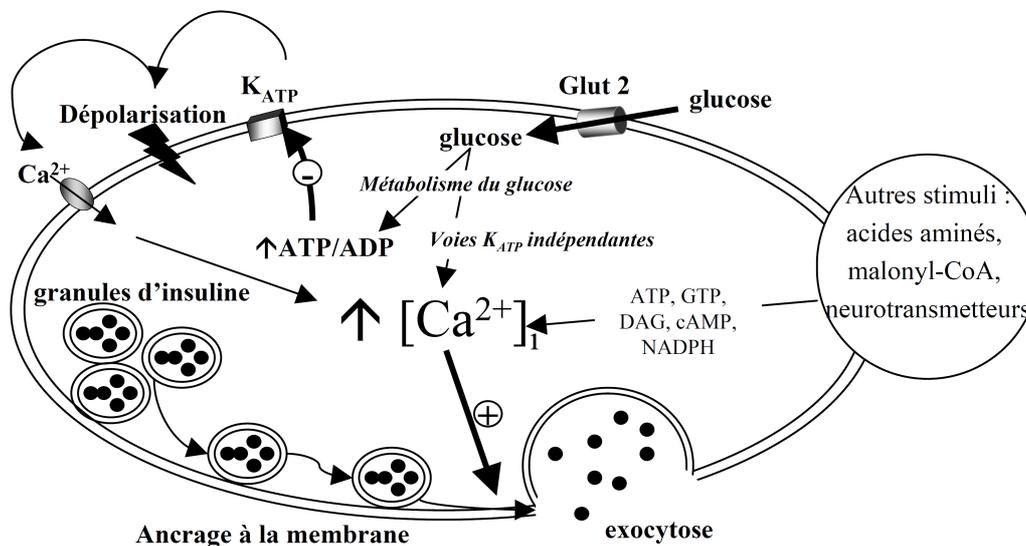


Figure 17 : Mécanismes de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas.
D'après [Straub et al., 2002 ; Rorsman et al., 2003]

La phase précoce de la sécrétion d'insuline est activée par l'augmentation du ratio ATP/ADP induite par le métabolisme du glucose. Cette dernière induit la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants (K_{ATP}), la dépolérisation de la membrane et l'ouverture des canaux calciques. L'entrée du calcium dans la cellule amorce la translocation et l'exocytose des granules d'insuline. Par la suite, les variations des concentrations intracellulaires de calcium ($[Ca^{2+}]_i$), modulées par la voie indépendante des K_{ATP} , conditionnent le caractère pulsatile de la sécrétion d'insuline. D'autres stimuli, de nature neuro-humorale et nutritionnelle peuvent moduler l'exocytose des granules d'insuline.

3. Récepteur à l'insuline (RI)

Il appartient à la superfamille des récepteurs de facteurs de croissance, comprenant le récepteur de l'IGF-1, qui possède une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire. Il constitue le chef de file de la famille des récepteurs formés de quatre sous-unités. Le RI est une protéine hétérodimérique ($\alpha_2\beta_2$) composée de deux sous-unités α et de deux sous-unités β (figure 18) [Capeau, 2003 ; De Meyts, 2005] :

- la sous-unité α (130 – 190 kDa) : constituée de 723 acides aminés possède un domaine extramembranaire qui est le site de liaison de l'insuline. Elle possède également de nombreux sites de glycosylation,
- la sous-unité β (45 – 90 kDa) : possède un domaine extracellulaire constitué de nombreux sites de glycosylation et un domaine transmembranaire. Le domaine intracellulaire se compose essentiellement d'un domaine à activité tyrosine kinase avec un site de liaison à l'ATP et d'un domaine catalytique, le tout permettant la transduction du signal.

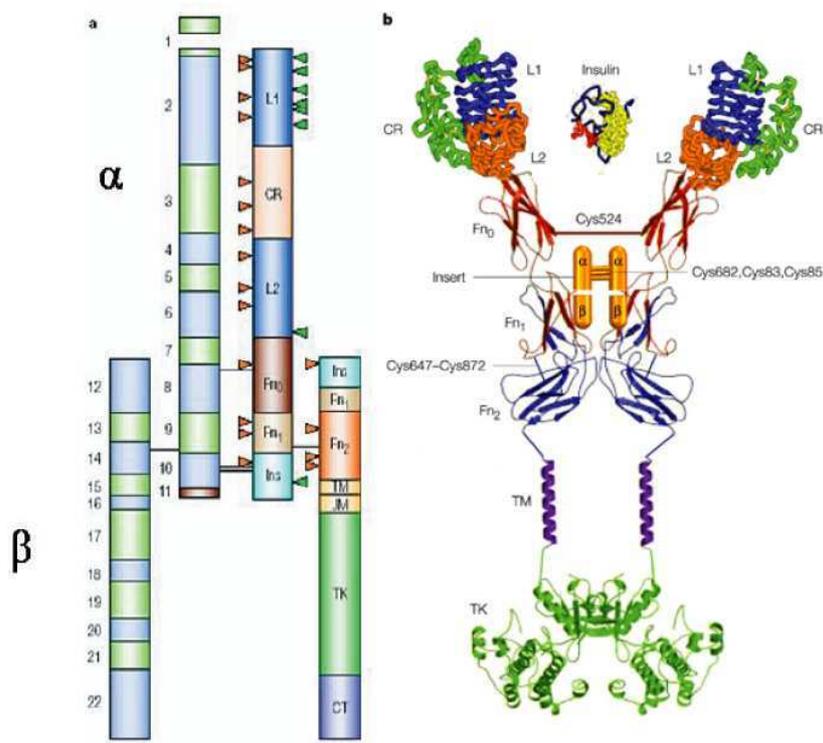


Figure 18 : Structure du récepteur à l'insuline. D'après [De Meyts, 2005]

4. Voies de signalisation

La liaison de l'insuline à son récepteur induit des changements morphologiques du récepteur, déclenchant l'activité tyrosine kinase intrinsèque des sous-unités β et l'activation de cascades de signalisation intracellulaire. L'action de l'insuline suite à la liaison sur son récepteur s'effectue schématiquement, au niveau intracellulaire, selon deux voies (figure 19).

La première voie est celle liée à la phosphatidyl-inositol-kinase 3 (PI3-K) kinase impliquée dans les métabolismes protidique, glucidique et lipidique, c'est la voie du signal métabolique (*metabolic signal*). La seconde voie est celle de la cascade *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), intervenant dans la prolifération cellulaire et l'apoptose, c'est la voie communément appelée la voie du signal de croissance (*growth signal*) [Bouglé et al., 2009].

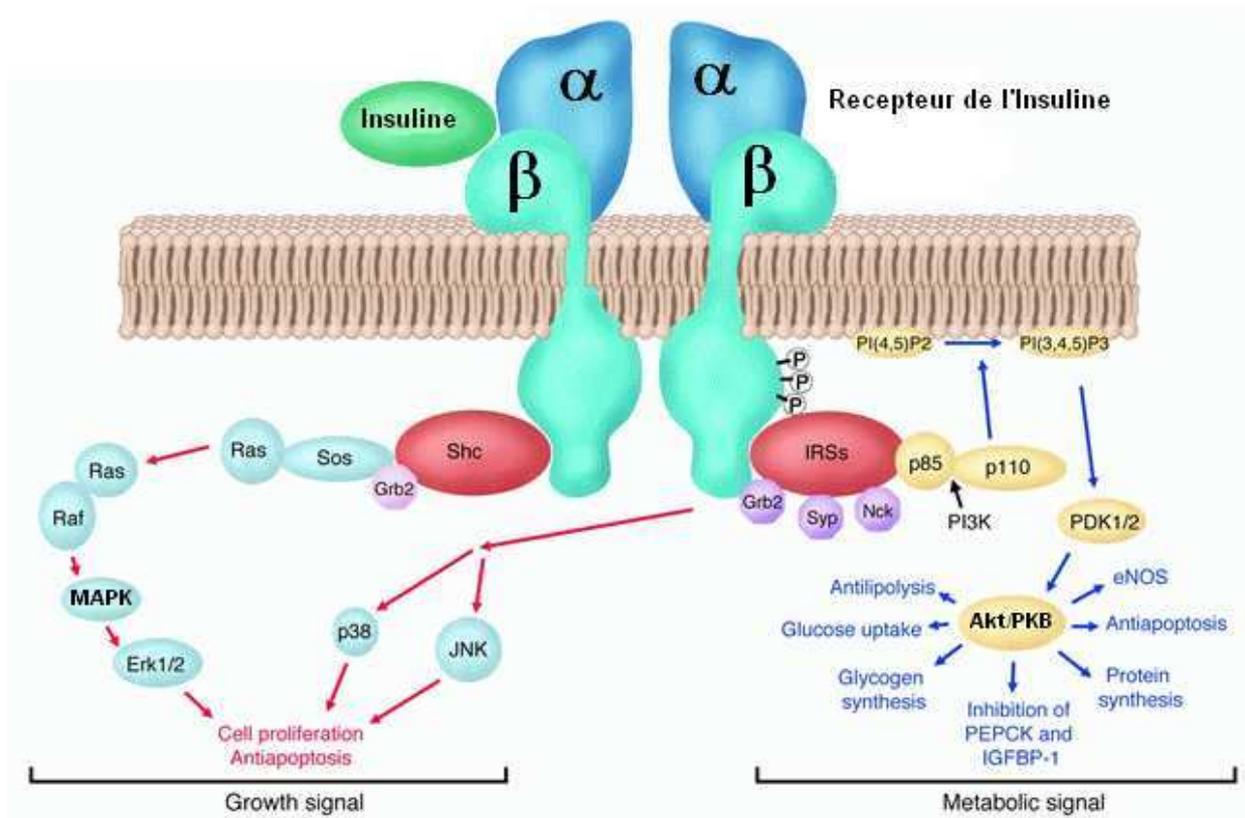


Figure 19 : Schéma général des voies de transduction du signal de l'insuline.
D'après [Van den Berghe, 2004]

5. Régulation endogène de la sécrétion d'insuline

Les cellules β ont une capacité de stockage en insuline assez importante, elles contiennent plus de 10 000 granules de sécrétion. Celles-ci renferment un mélange de protéines et d'ions. L'insuline et le peptide C en quantités équivalentes représentent environ 75% de la masse du granule [Orci *et al.*, 1988 ; Michael *et al.*, 2006]. La sécrétion d'insuline phénomène pulsatile est soumise à de nombreux substrats qui participent à sa régulation. On parle de stimuli (figure 20) activateur (ou amplificateur) et inhibiteur (ou atténuateur). Le glucose est le régulateur principal de cette sécrétion d'insuline [Bouglé *et al.*, 2009].

Les autres activateurs de la sécrétion d'insuline sont :

- le glucagon,
- la cholécystokinine,
- et les incrétines : Glucose-dependent Insulinotropic Peptide (GIP) et le glucagon-like peptide-1 (GLP-1)...

Les inhibiteurs de la sécrétion d'insuline sont :

- les catécholamines (adrénaline et noradrénaline),
- et la somatostatine...

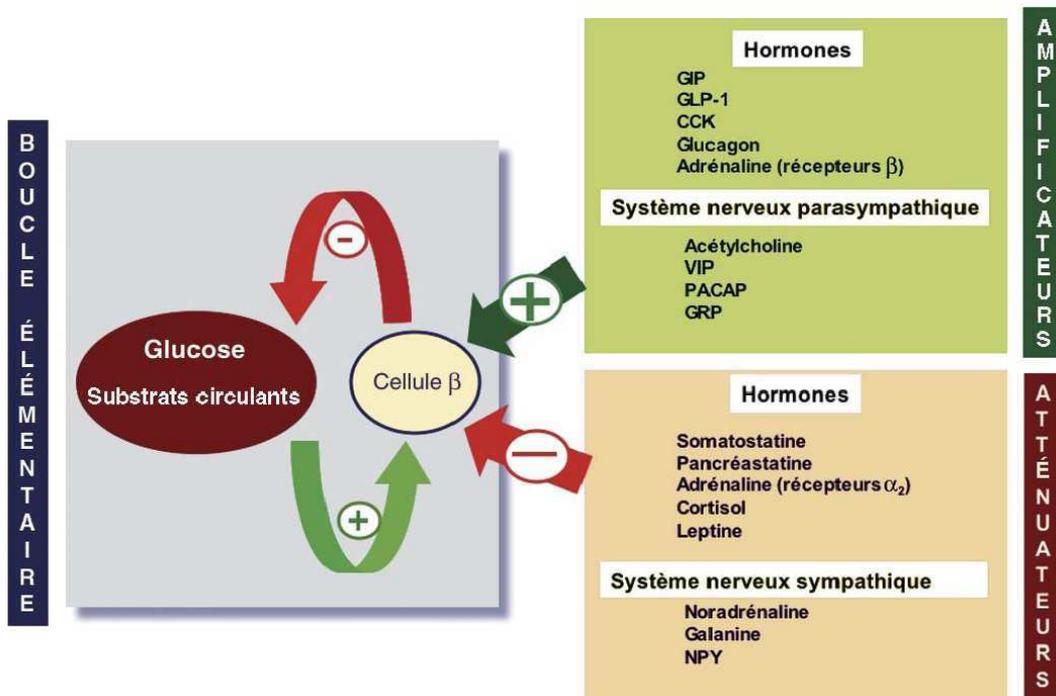


Figure 20 : Principaux facteurs humoraux et nerveux de contrôle de la sécrétion d'insuline. PACAP : pituitary adenylate cyclise activating polypeptide ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; GRP : gastrin releasing peptide ; GIP : gastric inhibitory polypeptide ; GLP-1 : glucagon like peptide-1 ; CCK : cholécystokinine ; NPY : neuropeptide Y.

D'après [Magnan *et al.*, 2006]

6. Effets généraux

L'insuline, seule hormone normoglycémiante possède une multitude d'effets (figure 23 et 24) et joue un rôle majeur dans le métabolisme des glucides, des protéides et des lipides. L'insuline est en effet essentielle dans la mise en réserve des substrats énergétiques. En se fixant sur son récepteur spécifique l'insuline exerce également des effets indépendants du métabolisme que sont les phénomènes inflammatoires, centraux, etc... [Allain, 2001 ; Andreelli et al., 2006 ; Orban et al., 2006].

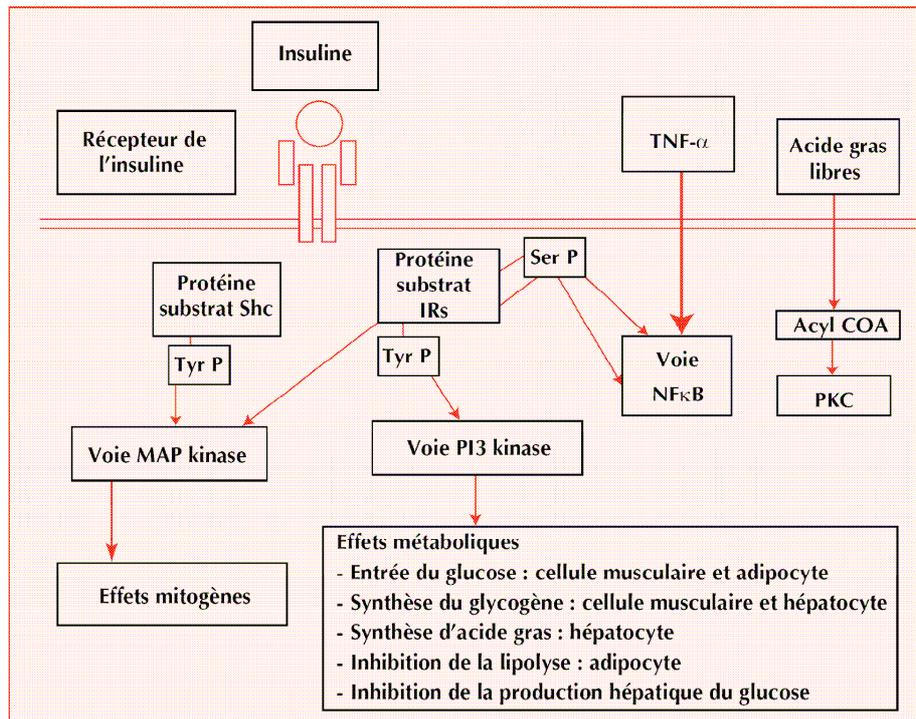


Figure 23 : Mécanismes moléculaires de la signalisation par l'insuline. D'après [Capeau et al., 2006]

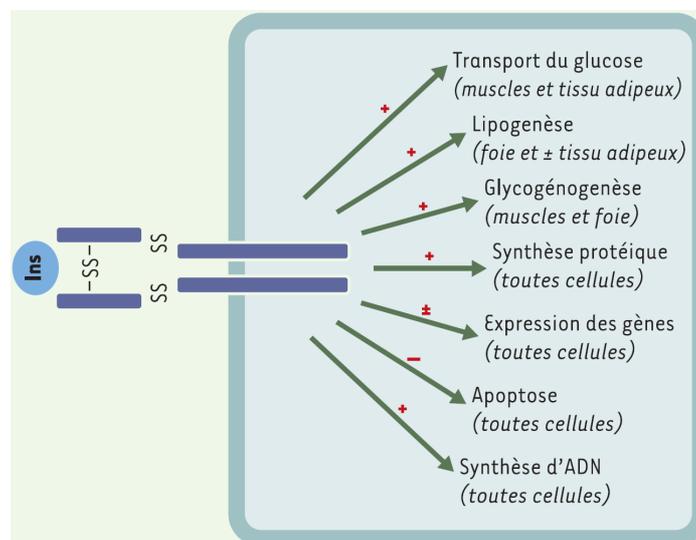


Figure 24 : Effets pléiotropes de l'insuline. D'après [Capeau, 2003]

6.1. Effets métaboliques

6.1.1. Métabolisme glucidique

L'insuline a pour principale activité, de favoriser l'entrée du glucose dans les cellules des tissus insulinosensibles (muscles squelettiques, foie et tissus adipeux), en augmentant la perméabilité de leur membrane au moyen d'un recrutement de récepteurs au glucose GLUT4.

Au niveau des cellules hépatiques, l'insuline stimule la glycogénèse (stockage du glucose sous forme de glycogène) par stimulation de l'activité glycogène synthase. L'insuline stimule l'utilisation du glucose par la glycolyse ou son oxydation par la voie des pentoses-phosphates et s'oppose à la fabrication de glucose à partir d'acides aminés gluco-formateurs (néoglucogénèse) et à la sortie du glucose du foie. Elle inhibe la production du glucose en diminuant la glycogénolyse par inhibition de la glycogène phosphorylase [Capeau *et al.*, 1996 ; Moucari *et al.*, 2007].

6.1.2. Métabolisme protéique

Au niveau protéique l'insuline a une action anabolisante (anti-catabolique) essentielle. Cet effet s'exerce en favorisant la synthèse protéique à partir d'acides aminés plasmatiques (effets dépendant de l'AMP cyclique). Elle inhibe également la protéolyse au niveau du muscle en bloquant la néoglucogénèse [Lee *et al.*, 1994 ; Capeau *et al.*, 1996].

L'effet de l'insuline diffère selon le tissu et la protéine considérés. En effet au niveau du muscle, l'insuline à elle seule ne paraît pas capable de stimuler la synthèse protéique [Meek *et al.*, 1998]. De même l'insuline n'a pas d'effet sur la synthèse des protéines de structure du foie mais elle régule la synthèse des protéines « exportées » par celui-ci : elle stimule la synthèse d'albumine, et freine celle du fibrinogène [Ahlmán *et al.*, 2001 ; De Feo *et al.*, 1991]. Donc l'insuline favorise la synthèse de protéines à rôle nutritionnel majeur, comme les protéines de structure des entérocytes et l'albumine sécrétée par le foie, et réprime la synthèse des protéines de réaction inflammatoire, comme le fibrinogène [Darmaun, 2002].

6.1.3. Métabolisme lipidique

L'insuline a une action anti-lipolytique. Elle diminue la libération des acides gras libres et du glycérol du tissu adipeux. Au niveau hépatique, elle favorise la synthèse des acides gras libres et l'estérification des triglycérides. Elle active la lipogénèse en stimulant l'actéyl CoA carboxylase et par activation du facteur de transcription le « Sterol Response Element Binding Protein » (SREBP-C). Elle agit également comme régulateur de la concentration des corps

cétoniques circulant en diminuant leur libération par le tissu adipeux. Au niveau des adipocytes enfin, elle favorise la captation des triglycérides en augmentant l'activité de la lipoprotéine lipase [Moucari *et al.*, 2007].

6.2. Effets non métaboliques

En dehors des effets sur la glycémie, l'insuline possède de nombreux autres effets. Ce sont des phénomènes indépendants du métabolisme et notamment du niveau glycémique. On parle alors d'effets non métaboliques de l'insuline (figure 25).

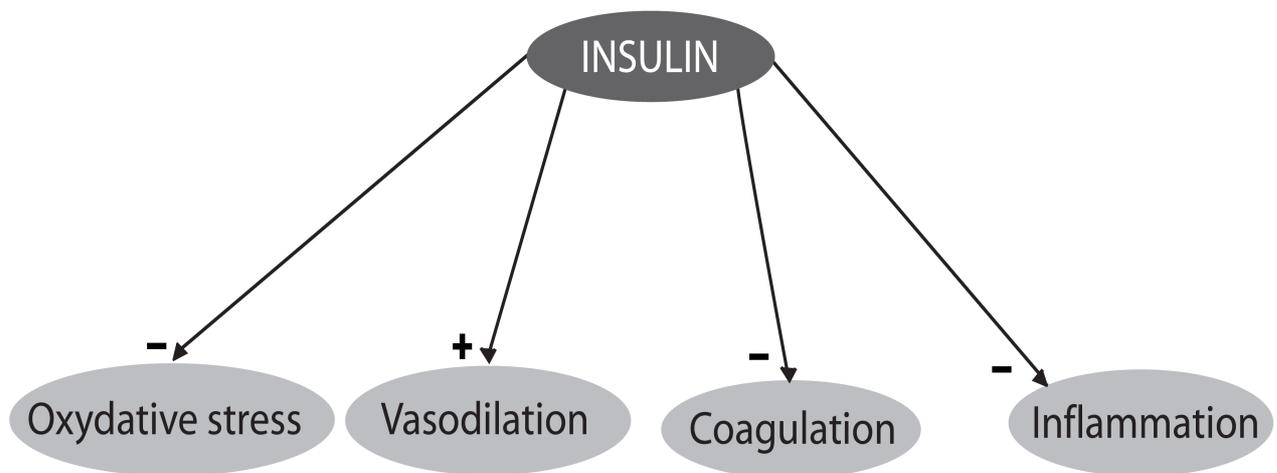


Figure 25 : Effets propres de l'insuline. D'après [Devos, 2008]

6.2.1. L'insuline et l'inflammation

L'implication de l'insuline dans les phénomènes inflammatoires a clairement été identifiée. En effet l'insuline possède des propriétés anti-inflammatoires propres qui se manifestent selon plusieurs types tels que la réduction du facteur de transcription NFκB, la diminution de la production de *Tumor Necrosis Factor* (TNFα) [Satomi *et al.*, 1985], ou encore la diminution du stress oxydatif produit par les dérivés de l'oxygène ROS [Dandona *et al.*, 2001; Das UN, 2001]. Cet effet anti-inflammatoire semble également lié à la diminution de la production de molécules de l'inflammation telle que la protéine C-réactive (PCR) [Takebayashi *et al.*, 2004]. L'insuline pourrait par ailleurs favoriser la production de cytokines anti-inflammatoires [Jeschke *et al.*, 2004 (a)]. Dans un modèle expérimental de sepsis porcine [Brix-Christensen *et al.*, 2004] mais aussi chez l'homme [Krogh-Madsen *et al.*, 2004], l'insuline a été capable de diminuer les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-6) et d'acides gras

circulants, et d'augmenter les taux de cytokines anti-inflammatoires [Jeschke et al., 2004 (b)]. De même au niveau des adipocytes [Sakaue et al., 1999] l'insuline antagonise les effets du facteur inhibant la migration des macrophages (MIF). Celui-ci est une cytokine qui augmente au cours du sepsis et qui favorise le développement de la réaction inflammatoire en augmentant l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

L'insuline est également un puissant inhibiteur de l'enzyme hépatique phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Cet enzyme est responsable de la voie néoglucogénique (c'est-à-dire la synthèse de glucose à partir de substrats non glucidiques comme le glycérol) [Vella et al., 2002] qui en excès induit une production exagérée de glucose hépatique favorisant l'apparition d'une hyperglycémie et donc un diabète [Van den Berghe et al., 2006].

L'insuline semble aussi favoriser la sécrétion d'adiponectine permettant la préservation des effets métaboliques bénéfiques de cette hormone [Kadowaki et al., 2005]. En effet, dans différents modèles de rongeurs insulino-résistants, l'administration de l'adiponectine induit en aiguë ou en chronique une oxydation des lipides intratissulaires, une déplétion des organes des dépôts lipidiques anormaux et une diminution de l'insulino-résistance [Kadowaki et al., 2005].

L'insuline, en inhibant la transcription et l'expression des facteurs pro-inflammatoires protégerait la cellule des phénomènes toxiques dus aux dépôts lipidiques (lipotoxicité) mais aussi à l'hyperglycémie chronique (glucotoxicité), qui conduisent à la production de radicaux libres hautement toxiques pour les cellules [Dandona et al., 2001 ; Shi et al., 2006].

L'insuline exercerait également un rôle sur l'immunité acquise, en particulier l'immunité cellulaire en favorisant le phénotype Th2 permettant une augmentation de l'immunité humorale, donc une production d'anticorps [Viardot et al., 2007].

6.2.2. L'insuline et le système nerveux central

L'insuline en traversant la barrière hémato-encéphalique [Banks et al., 1997] stimule ses récepteurs largement exprimés dans le système nerveux central, notamment au niveau hypothalamique zone responsable de la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Ainsi les effets centraux de l'insuline vont être associés à des effets métaboliques. L'insuline en agissant au niveau de ses récepteurs centraux, va inhiber la prise alimentaire et augmenter les dépenses énergétiques. Par cette action l'insuline va exercer des effets anorexigènes et thermorégulateurs en augmentant la libération de la leptine, et en inhibant la sécrétion du neuropeptide Y [Alain, 2001 ; Pigeyre, 2007].

Par ailleurs la stimulation neuronale par l'insuline est transmise au niveau du foie via le nerf vague [Plum et al., 2006]. L'insuline joue donc un rôle important dans l'homéostasie énergétique sur le système nerveux central. Il est en effet clairement établi que les effets de l'insuline sur le cerveau sont essentiels à la croissance et à la vie [Plum et al., 2006].

L'action de l'insuline sur le système nerveux sympathique permet en outre un contrôle indirect sur la capture et l'utilisation du glucose au niveau périphérique (muscle). Mais cette action permet aussi un contrôle de la vasodilatation musculaire (figure 26). L'insuline active donc le système nerveux autonome sympathique et a un effet vasodilatateur des artères musculaires. Ces deux actions biologiques sont propres à l'insuline et indépendantes du métabolisme oxydatif du glucose dans le muscle [Vollenweider et al., 1993].

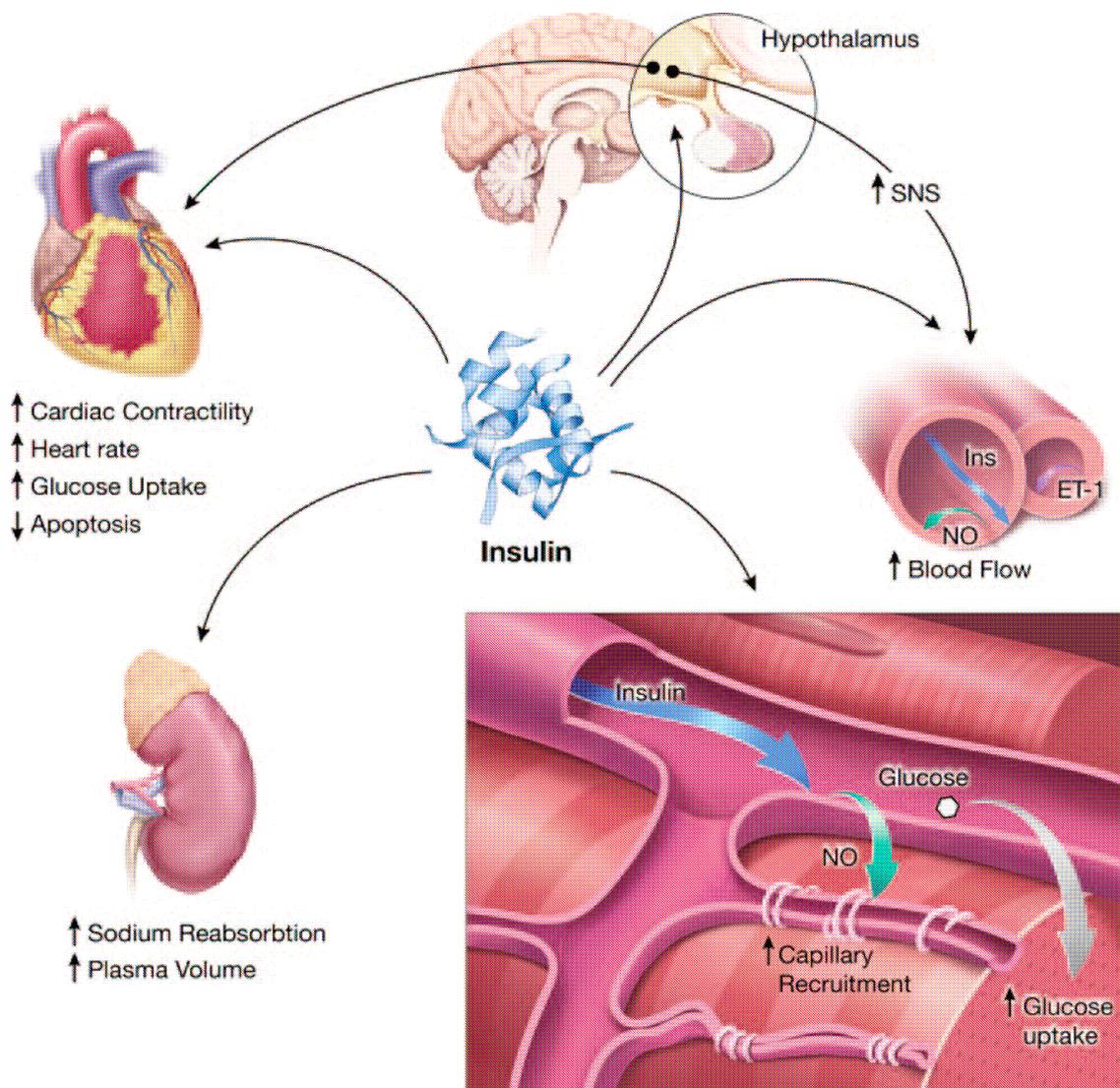


Figure 26 : Schéma des actions de l'insuline sur les vaisseaux et le système nerveux. SNS : système nerveux sympathique ; Ins : insuline ; ET-1 : endothéline-1 ; glucose uptake : capture du glucose ; blood flow : flux sanguin. D'après [Muniyappa et al., 2007]

6.2.3. L'insuline et les électrolytes

L'insuline ne semble pas avoir d'effet direct sur la régulation hydroélectrolytique. Toutefois, il semblerait qu'elle augmente les effets membranaires de l'aldostérone et de la vasopressine sur le transport épithélial du sodium ainsi que sur la captation du potassium et du phosphore par les cellules. Ces effets sont accentués en présence d'une hyperglycémie [Bouglé et al., 2009]. Par ailleurs, grâce à la normalisation de la glycémie, l'insuline améliore la fonction rénale et diminue le recours à l'épuration extrarénale [Van den Berghe et al., 2001; Van den Berghe et al., 2006].

6.2.4. Insuline et coagulation

L'insuline pourrait avoir un rôle dans la modulation physiologique de la fonction plaquettaire, et l'insulinopénie chronique pourrait expliquer l'augmentation de l'agrégation plaquettaire observée chez les patients diabétiques [Trovati et al., 1988]. Plusieurs études ont en effet mis en évidence le fait que l'insuline possède une action anti-thrombotique et profibrinolytique, aux moyens de différents phénomènes tels que la diminution de l'agrégation plaquettaire, la diminution de l'interaction entre les plaquettes et le collagène [Trovati et al., 1988 ; Westerbacka et al., 2002 ; Chaudhuri et al., 2004]. De même l'insuline exercerait une action inhibitrice vis-à-vis du thromboxane A2 [Aljada et al., 2002] ainsi que sur l'activité de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) [Collet et al., 2003]. Or le PAI-1 est connu pour être un inhibiteur physiologique puissant de la fibrinolyse, qui est notamment élevé au cours du diabète de type 2 et des maladies cardio-vasculaires [Chadli-Chaieb et al., 2009].

7. Insuline et effets cardiovasculaires

7.1. Effets sur l'endothélium

L'insuline, en plus de ses effets métaboliques présente aussi des effets vasculaires. Ceux-ci sont principalement médiés par la libération du monoxyde d'azote (NO). Au niveau de l'endothélium, l'insuline stimule la production contrôlée du NO par phosphorylation de la eNOS (*endothelial nitric oxid synthase*) [Zeng et al., 1996] et par l'inhibition de la iNOS (*inducible nitric oxid synthase*). L'activation de l'eNOS via la voie d'activation PI3K/Akt aboutit à une vasorelaxation. Par ailleurs l'insuline par la voie de la MAPK stimule la sécrétion de l'endotheline-1 (ET-1), puissant vasoconstricteur [Marasciulo et al., 2006] sécrété par les cellules endothéliales aux effets antagonistes du NO. Cette action aboutit à une vasoconstriction [Potenza et al., 2005]. L'insuline semble donc jouer un rôle très important dans la balance vasoconstriction/vasodilatation endothéliale (figure 21) et dans la préservation de la microcirculation tissulaire [Andreelli et al., 2006].

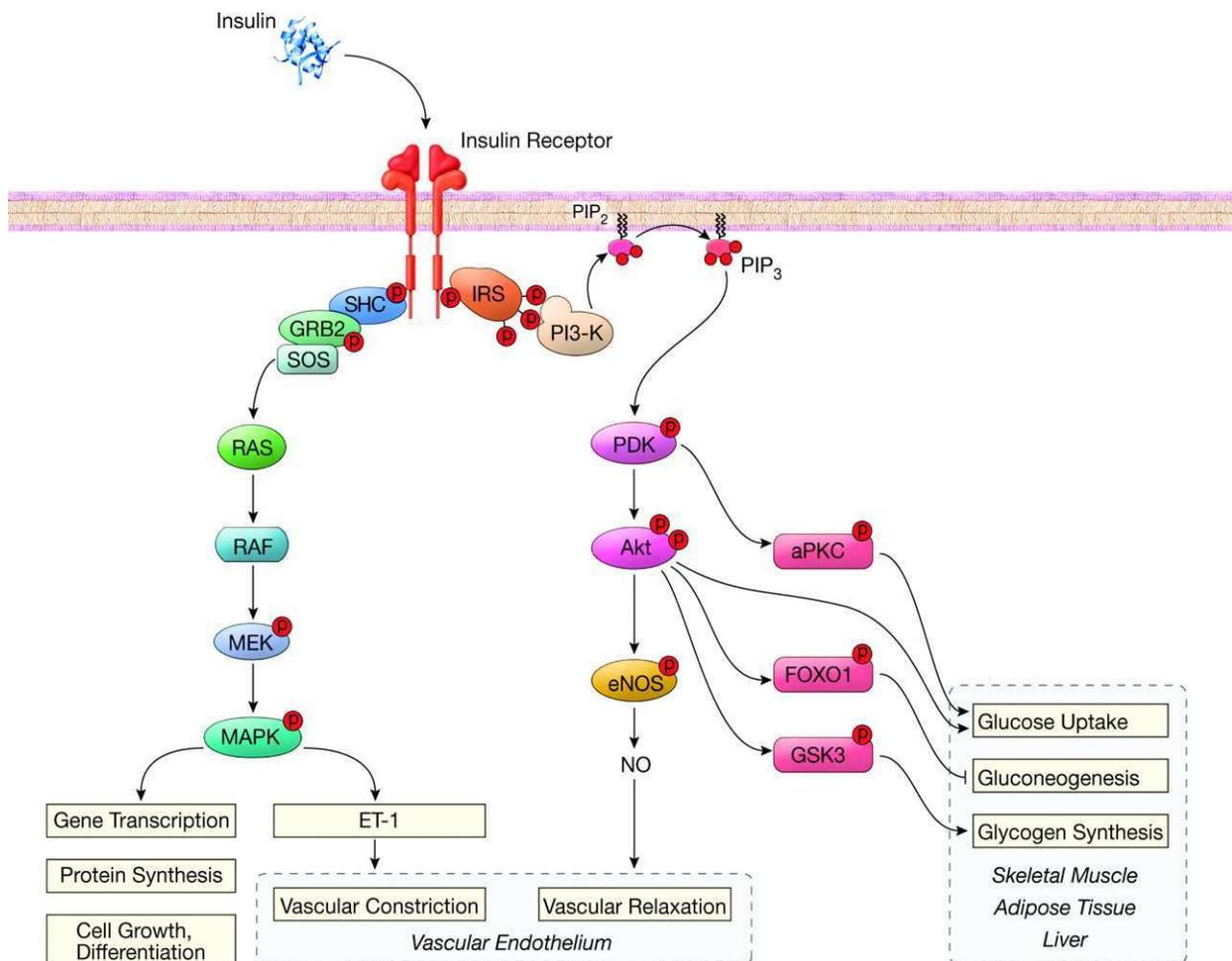


Figure 21 : Voies de signalisation de l'insuline pour une action endothéliale.

IRS : *Insulin Receptor Substrate* ; NO : *nitric oxide* ; eNOS : *endothelial Nitric Oxide Synthase* ; PDK : *phosphoinositide-dependent protein kinase* ; PKC : *Protein Kinase C* ; ET-1 : *endothelin-1*. D'après [Muniyappa et al., 2007]

7.2. Effets sur le myocyte

7.2.1. Effet inotrope positive

Les mécanismes d'actions et effets bénéfiques de la perfusion de glucose-insuline-potassium (GIK) sur la fonction myocardique sont complexes. La perfusion du GIK pourrait avoir un effet bénéfique par le biais d'un meilleur rendement énergétique obtenu en favorisant le métabolisme glucidique et en contrant les effets délétères des acides gras libres [Taegtmeyer, 1995 ; Opie, 1999 ; Grimaldi et al., 2003 ; Rami et al., 2004]. L'insuline régule le métabolisme cardiaque en agissant à la fois sur le transport de glucose (augmentation de sa disponibilité au niveau intracellulaire), le métabolisme lipidique (baisse la lipolyse périphérique) et la synthèse protéique [Muniyappa et al., 2007].

L'insuline présente également une action inotrope positive sur le muscle cardiaque en particulier en cas d'ischémie myocardique ou lors de défaillance post-opératoire de pontage aorto-coronaire [Lucchesi et al., 1972 ; Farah et al., 1981 ; Pierce et al., 1985 ; Reikeras et al., 1985 (c) ; Avatshi et al., 1987 ; Fisher et al., 1987 ; Baron et al., 1993 ; Bergstra et al., 2006 ; Mehta et al., 2005]. L'insuline exercerait ainsi un effet cardioprotecteur direct au cours de la reperfusion par un effet anti-apoptotique [Gottlieb et al., 1999].

En effet l'insuline améliore l'inotropisme cardiaque à la fois dans les études *in vivo* [von Lewinski et al., 2005], mais aussi *in vitro* [Maier et al., 1999]. Cet effet semble notamment médié via la voie de l'Akt [O'Neill et al., 2005], et par la sensibilisation des myofilaments au calcium [von Lewinski et al., 2005]. Par ailleurs, la voie de signalisation PI3K/Akt semble également jouer un rôle important dans la croissance du myocarde [Belke et al., 2002]. Toutefois la surexpression continue de Akt est associée à des cardiopathies hypertrophiques [Walsh, 2006] conduisant à une dysfonction cardiaque et à l'insuffisance cardiaque [Shiojima et al., 2005]. Les effets bénéfiques sur la contractilité cardiaque seraient donc dépendants de l'ampleur et de la durée d'activation de l'Akt [McMullen et al., 2003 ; O'Neill et al., 2005]. De plus, grâce à la production de NO via la voie PI3K/Akt/eNOS [Gao et al., 2002] l'insuline semble bénéfique notamment par ses effets vasodilatateurs (périphérique et coronaire) [Coggins et al., 2001 ; Dawson et al., 2002 ; Vincent et al., 2002 ; Vincent et al., 2004] entraînant une hausse du flux sanguin coronaire [Meyer et al., 1997 ; Ren et al., 1999].

7.2.2. Effet sur la Na,K-ATPase

L'insuline augmente l'activité de la pompe Na,K-ATPase selon différents mécanismes [Longo, 1996 ; Djemli-Shipkolye et al., 2000 ; Longo et al., 2001 ; Sweeney et al., 2001]. En effet

l'insuline participe à la modulation de plusieurs échangeurs ioniques localisés sur la membrane plasmique des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle [**Chalon et al., 1995**].

L'insuline après fixation sur son récepteur (RI) stimule la pompe Na,K-ATPase via des mécanismes (voies de signalisation) secondaires (figure 22). Parmi les éléments majeurs de stimulation de cette pompe, on trouve la concentration intracellulaire en sodium. Celle-ci, lorsqu'elle atteint des valeurs extrêmes (élevées ou basses) [**Weil et al., 1991**], stimule l'activité de l'enzyme Na,K-ATPase. L'action de l'insuline sur la concentration intracellulaire en sodium peut être elle-même secondaire à l'une ou l'autre des stimulations suivantes, à savoir une action sur l'échangeur Na^+/H^+ membranaire, une action sur le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, soit enfin par une action au niveau du canal sodique [**Sweeney et al., 1998**]. L'insuline va également, par son action au niveau cellulaire stimuler la pompe Na,K-ATPase par différents moyens : en permettant une translocation (mobilisation) de l'enzyme vers la membrane plasmique (notamment au niveau du muscle squelettique) ; en stimulant l'expression des gènes codant pour l'enzyme ; ou alors par la mise en jeu de phénomène de phosphorylation. Ce dernier élément fait intervenir les protéines kinase A et C (PKA et PKC) qui vont permettre la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine de la sous-unité α de la Na,K-ATPase, favorisant ainsi la translocation de l'enzyme au niveau membranaire [**Sampson et al., 1994 ; Chibalin, 2007**]. Tous ces mécanismes sont des effets indirects.

De même il a été identifié que l'utilisation de la perfusion de glucose-insuline-potassium (GIK) permettait une amélioration de la fonction myocardique altérée au moyen notamment d'une stimulation de la Na,K-ATPase myocardique par l'insuline. Cette stimulation augmente la recapture du potassium mais permet aussi une stabilisation de la membrane cellulaire réduisant le nombre d'arythmie observé [**Isetta et al., 2005**]. La stimulation de la Na,K-ATPase par l'insuline aurait également pour conséquence une relaxation du muscle lisse vasculaire contribuant à un effet vasodilatateur [**Chalon et al., 1995**].

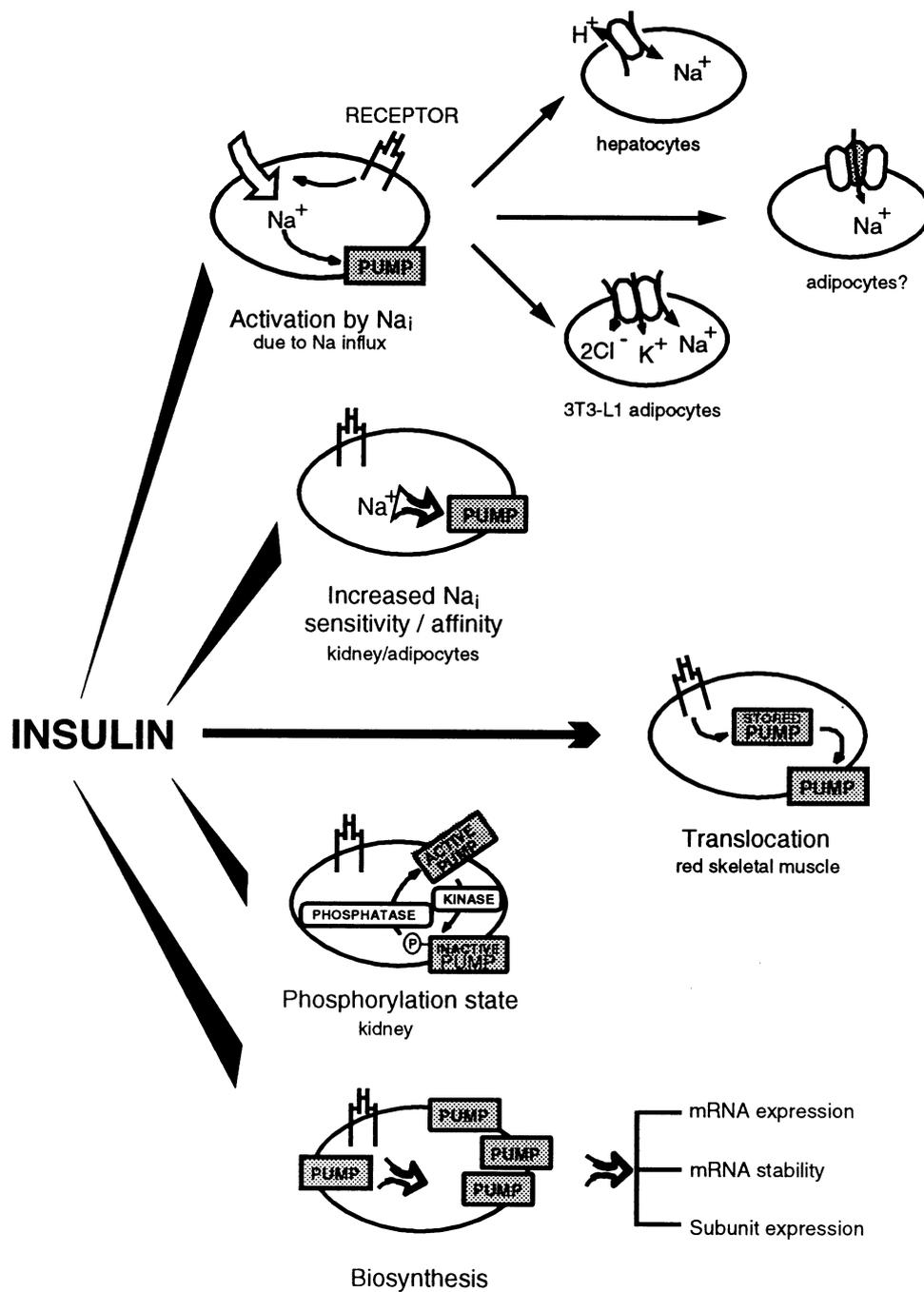


Figure 22 : Mécanismes généraux envisagés d'interaction entre l'insuline et la Na,K-ATPase. Illustration des voies de signalisation selon les différents tissus. (Na_i = sodium intracellulaire, PUMP = Pompe Na,K-ATPase). D'après [Ewart et al., 1995 ; Sweeney et al., 1998]

VI. Effet de l'insuline au cours d'une intoxication à la digoxine

La première observation rapportée d'une intoxication à la digoxine associée à une présence d'insuline et de glucose est celle de notre cas clinique.

Récemment, en avril 2004 nous avons observé, au service de Réanimation Médicale de l'Hôpital de Hautepierre, le cas d'une jeune femme de 35 ans hospitalisée après l'ingestion de 17,5 mg de digoxine, 3,4 g de propranolol, 400 mg de dompéridone et de 180 mg de bromazépan dans le cadre d'une tentative d'autolyse. Lors de la prise en charge initiale, 5 heures après l'ingestion, la patiente est dans le coma (score Glasgow 6). A l'admission, la pression artérielle est normale 115/80 mmHg, la fréquence cardiaque à 40c/min est corrigée par l'administration d'atropine, la glycémie capillaire est indétectable. L'ECG inscrit une bradycardie sinusale à 50 battements/ min, un BAV du 1^{er} degré. L'ensemble des paramètres biologiques sont normaux à l'exception d'une hypoglycémie sévère à 0,04 g/L; une administration de 300 g de glucose par 24h sera nécessaire pour obtenir l'euglycémie. La concentration plasmatique initiale de digoxine est de 9,2 ng/mL (dose toxique entre 3 et 4ng/ml) et celle de propranolol de 706 ng/mL. L'évolution est marquée par une parfaite stabilité hémodynamique sans l'adjonction de vasopresseur ni d'anticorps monoclonaux anti-digoxine (Digidot[®]). Le BAV et la bradycardie s'amendent en quelques heures. Nous n'avons à aucun moment observé des troubles de la conduction (arythmie, fibrillation ventriculaire), ni d'arrêt cardiaque qui sont les complications classiques lors des intoxications graves à la digoxine. A son réveil, la patiente avoue une injection SC d'au moins 50 UI d'insuline (traitement paternel). La question d'un éventuel effet protecteur de l'insuline sur l'apparition des signes de toxicité de la digoxine et du propranolol est alors posée [Bilbault et al., 2005].

Cette observation confirme les données d'une équipe allemande [von Mach et al., 2006], selon laquelle le surdosage par l'insuline est plus fréquent chez les femmes (54 %) et chez les sujets de 30–40 ans. L'intoxication est dans 89 %, 5 % et 2 % des cas, respectivement volontaire, accidentelle et criminelle ; dans les 4 % des cas restants les circonstances sont inconnues [von Mach et al., 2004]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que lors de la tentative de suicide par intoxication à l'insuline les doses utilisées étaient souvent élevées [Spiller, 1998 ; Baud et al., 2006].

Lors des ces intoxications à l'insuline on retrouve fréquemment d'autres médicaments, notamment des benzodiazépines (38 %), éthanol (16 %), antihypertenseurs (13 %) et antidépresseurs (10 %) [von Mach et al., 2004]. De plus, le délai entre le moment de

l'injection et la découverte du surdosage en insuline est souvent tardif. En effet, 15 % des patients sont pris en charge dans les deux à trois heures suivant l'injection et 50 % dans les six heures [von Mach et al., 2004].

L'observation clinique réalisée au niveau du service de Réanimation Médicale de l'Hôpital de Haute-pierre ainsi que les travaux cités précédemment et ceux de [Ewart et al., 1995; Vér et al., 1997; Hansen et al., 2000], suggèrent l'idée d'une cible d'action commune entre la digoxine et l'insuline. Celle-ci serait la pompe Na,K-ATPase cardiaque, qui en présence d'insuline modifierait sa structure ce qui aurait pour conséquence une baisse d'affinité de la digoxine (sur cette enzyme), d'où une action cardiaque moindre voir nulle de la digoxine.

OBJECTIFS

Au vu des observations cliniques et des mécanismes d'actions de la digoxine et de l'insuline nous avons fait l'hypothèse que l'administration d'une perfusion d'insuline-glucose pourrait exercer un effet cardiaque protecteur lors d'une intoxication aiguë à la digoxine.

Cet élément a été étudié aux travers d'expérimentations sur l'animal (étude *in vivo* chez le rat), et au niveau cellulaire (étude *in vitro* sur les cardiomyocytes).

Pour cela :

1. Nous avons mis au point initialement, un modèle de clamp euglycémique/hyperinsulinique permettant au cours des expérimentations d'avoir un état hyperinsulinique sans pour autant que celui-ci ne soit létale, ni ne provoque d'hypoglycémie (d'où l'instauration d'un niveau euglycémique),
2. puis nous avons étudié *in vivo* l'effet de la perfusion d'insuline-glucose (clamp euglycémique/hyperinsulinique) en prétraitement et post-traitement d'une intoxication aiguë à la digoxine sur un modèle de rat. L'efficacité de la perfusion est appréciée par l'évaluation de la mortalité chez les animaux.
3. enfin, au niveau cellulaire (cardiomyocytes, MODE-K), nous avons identifié *in vitro* les mécanismes d'interactions cellulaires de l'action de l'insuline sur la pompe Na,K-ATPase, en présence et en absence de la digoxine. L'approche de ces mécanismes moléculaires passe par des études sur l'enzyme isolée, par la mise au point de culture d'une lignée cellulaire entérocytaire et, de culture primaire de cardiomyocytes, lesquelles seront soumises aux différentes conditions expérimentales.

2^{ème} PARTIE :

TRAVAUX DE RECHERCHE

En l'absence de données dans la littérature, et avec comme seule observation celle réalisée dans le service de réanimation, nous avons voulu vérifier l'hypothèse d'un potentiel effet cardioprotecteur de l'insuline lors d'une intoxication aiguë à la digoxine. Pour cela, nous avons mis au point un modèle de clamp euglycémique/hyperinsulinique stable et sans effets néfastes. Ce clamp devant constituer un modèle à la perfusion de l'insuline-glucose en pré et en post-traitement lors de l'intoxication aiguë à la digoxine.

I. Mise en place d'un clamp euglycémique/hyperinsulinique

1. Matériel

1.1. Animaux et anesthésie

- Rats Wistar femelles de 250 à 350 gr (animalerie Faculté de Médecine de Strasbourg).
- Anesthésique 27% v/v de : Rompun[®] (Xylazine 2%, Bayer, Puteaux, France) + Imalgène[®] (Ketamine, Merial, Lyon, France) ; par voie (IP) intraperitonéale (1ml/kg).

1.2. Produits et matériels

- Insuline humaine (100U/mL, Actrapid[®], Novo nordisk, Danemark).
- Glucose G 50% et G 30% (Braun, Boulogne, France).
- Cathéter 22G de voie d'abord jugulaire.
- Monitoring ECG à l'aide des logiciels d'acquisition Notocord HEM 3.1 et Softampli 48. Analyse et suivi des tracés sur écran (appareil aimablement prêté par le Dr JC Roegel).
- Lecteur de contrôle glycémique (Ascensia[™], Conform[™], Bayer).
- Couverture aluminium + lampe, pour garder une température corporelle à 37°C.
- Héparine choay 25 000UI/5mL (Sanofi Winthrop, France), dilué dans du NaCl 0,9% (Braun, Boulogne, France) à 2% v/v.

1.3. Kit de dosage

- Kit Mercodia Insulin ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Suède)
- Tube BD Microtainer PST LH[™] (Franklin laken, USA), à l'intérieur desquels sont effectués nos prélèvements.

2. Méthodes

2.1. Conditionnement de l'animal

Le rat à jeun depuis la veille est couché sur le dos (figure 27), après anesthésie avec Rompun®/Imalgène® 27% v/v par une dose de 1 ml/kg en IP. Un suivi ECG est effectué avec analyse du tracé en D1D2D3.

Un cathéter de 22G est posé au niveau de la jugulaire interne, voie qui permettra d'administrer les médicaments selon le modèle étudié.

Les produits sont administrés par perfusion continue au moyen de pousse seringue électrique type Alaris IVAC P3000 (Alaris medical systeme, Hampshire, Royaume-Uni).

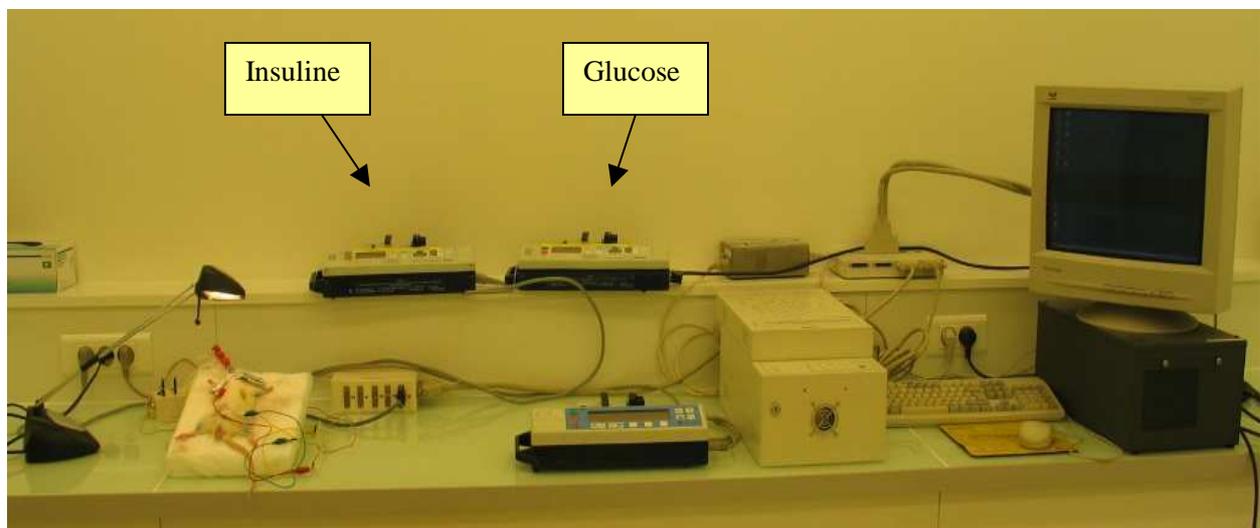


Figure 27 : Dispositif du branchement du modèle expérimental

L'ensemble des prélèvements est réalisé au niveau de la queue du rat.

- La glycémie est mesurée avec le glucomètre Ascensia™ Glucodisc™.
- L'insulinémie est mesurée par technique ELISA au moyen du kit Mercodia insulin®.
- La kaliémie est dosée au sein du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire de l'Hôpital de Hautepierre par électrodes ion-spécifiques.

La glycémie est mesurée toutes les 15 min, l'insulinémie est dosée toutes les 30 min. Immédiatement après recueillement, les prélèvements pour le dosage de l'insulinémie sont centrifugés 5 min à 11500 tr/min, puis conservés à -80°C, jusqu'au jour du dosage.

2.2. Suivi biologique

2.2.1. Insulinémie

Elle est dosée à l'aide du test Mercodia Insulin[®], par technique immunologique enzymatique à double site, en phase solide. On réalise un « sandwich direct », dans lequel deux anticorps monoclonaux sont dirigés contre deux déterminants antigéniques distincts de l'insuline. En phase d'incubation, les molécules d'insuline de l'échantillon réagissent avec les anticorps anti-insuline correspondants fixés aux puits de microfiltrations.

2.2.2. Glycémie

Elle est mesurée à l'aide de capteurs Ascensia[™] Glucodisc[™], électrodes qui vont capter le courant électrique produit par la réaction du glucose avec les agents réactifs. La réaction du glucose sanguin avec la glucose oxydase, couplée à une réaction d'oxydoréduction avec le ferricyanure de potassium, génère un courant électrique proportionnel au taux glycémique.

2.2.3. Kaliémie

Elle est dosée avec l'analyseur de la série ABL[™] 700 (Radiometer Medical ApS, Copenhagen, Danemark). La mesure est faite par potentiométrie par électrode ion-spécifique.

2.3. Clamp euglycémique/hyperinsulinique

Objectif : être en hyperinsulinisme sans être en dose létale.

Une fois l'animal anesthésié, un cathéter est posé au niveau de la jugulaire interne du rat. Cette voie d'abord permettra d'administrer l'insuline (Actrapid[®]) et le glucose (G 30% ou G 50%) selon le modèle étudié. On perfuse le G 30% pour une dose d'insuline de 50 UI/kg/h, et le G 50% pour les doses de 100 et 200 UI/kg/h.

Selon une technique proche des travaux de [Miles *et al.*, 1995] une perfusion d'insuline à débit constant est réalisée à l'aide d'un pousse seringue électrique (50, 100, 200 UI/kg/h) afin d'obtenir un état d'hyperinsulinisme à plateau constant de 2 heures (vérification *à posteriori* par le dosage de l'insulinémie).

Afin de maintenir une normoglycémie et d'éviter l'hypoglycémie induite par l'insuline, on administre simultanément du glucose (G 50%) à un débit ajusté par rapport à la valeur de la glycémie du rat.

3. Résultats

3.1. Perfusion de glucose et d'insuline

Administration concomitante d'insuline à débit fixe, et de glucose à débit variable afin de maintenir un état euglycémique (0,8 à 1 g/L). Trois doses d'insuline ont été étudiées : 50, 100 et 200 UI/kg/h.

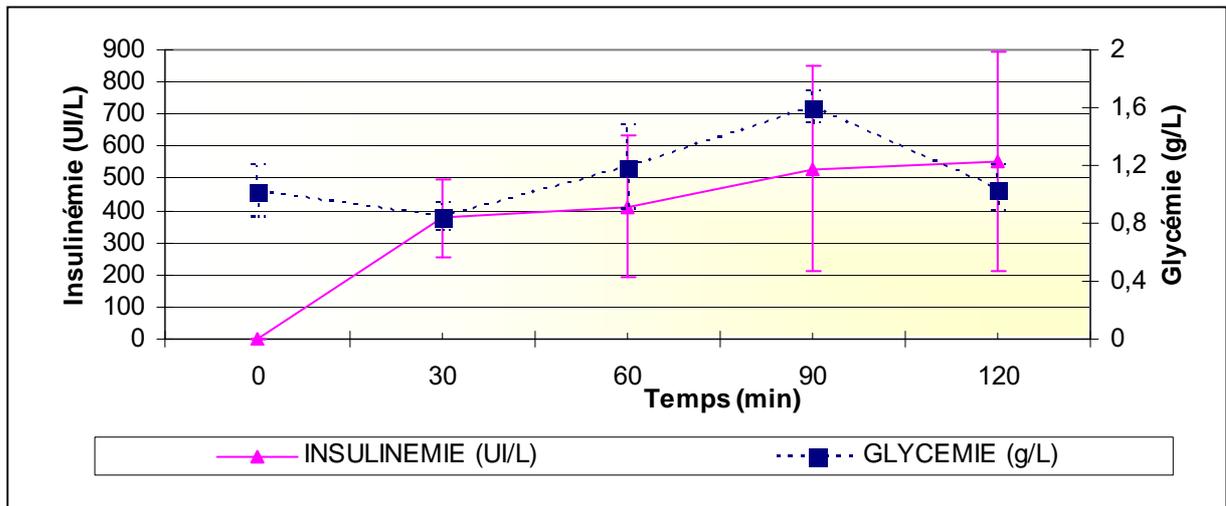


Figure 28 : Clap euglycémique/hyperinsulinique 50 UI/kg/h

La perfusion continue d'une dose de 50 UI/kg/h (figure 28) avec un suivi sur deux heures permet d'avoir un bon suivi de la glycémie (moyenne des glycémies sur 2h est de $1,02 \pm 0,19$ g/L), tandis que le plateau hyperinsulinique ne semble se stabiliser qu'après 90 min de perfusion.

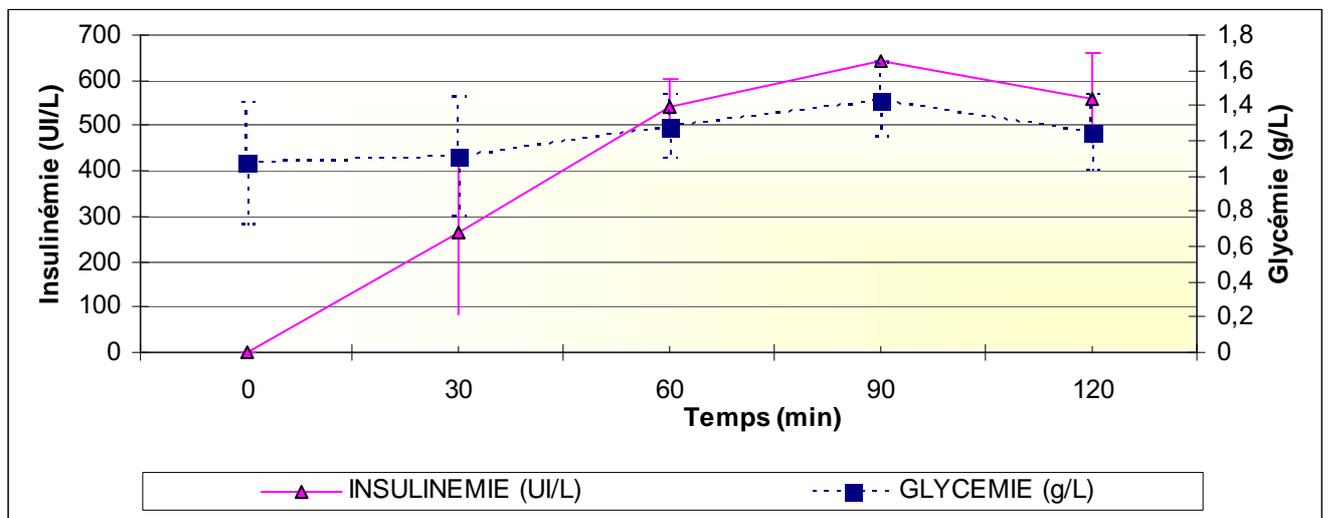


Figure 29 : Clap euglycémique/hyperinsulinique 100 UI/kg/h

L'administration d'une dose de 100 UI/kg/h (figure 29) en perfusion continue donne des valeurs de glycémies bien contrôlées avec un bon niveau euglycémique (moyenne des glycémies sur 2h est de $1,20 \pm 0,30$ g/L). Les valeurs des insulinémies montrent un plateau hyperinsulinique qu'après une heure de perfusion.

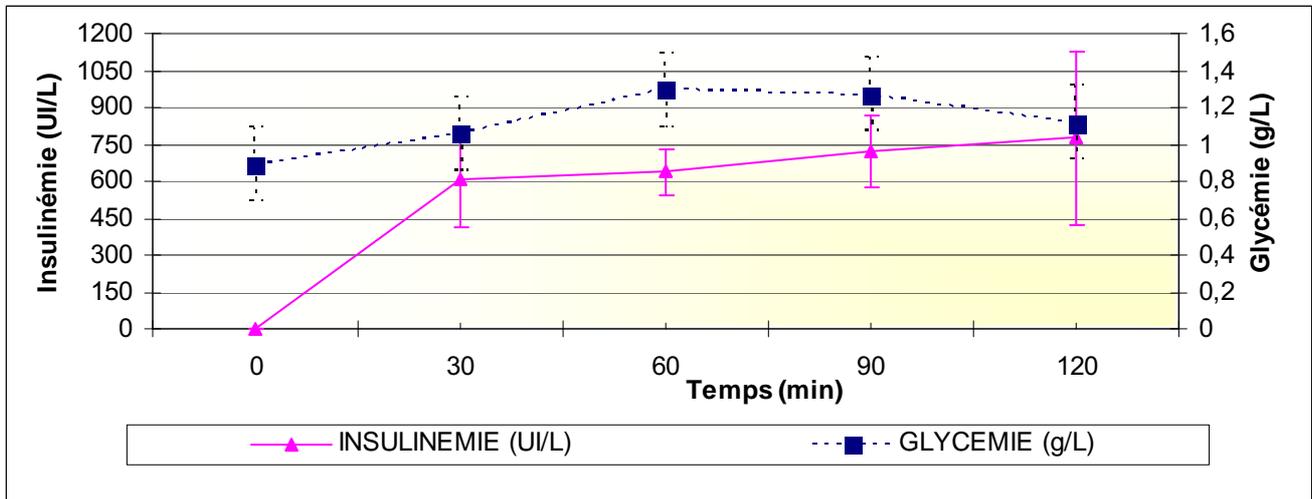


Figure 30 : Clap euglycémique/hyperinsulinique 200 UI/kg/h

Le clamp à 200 UI/kg/h (figure 30) d'insuline administrée en perfusion continue donne des valeurs de glycémies stables, correspondant à un niveau euglycémique (moyenne des glycémies sur 2h est de $1,13 \pm 0,17$ g/L). Le plateau hyperinsulinique est quand à lui obtenu seulement après 30 min de perfusion.

On constate que sous perfusion continue d'insuline (à débit fixe) et de glucose (à débit variable) les valeurs des glycémies sont bien contrôlées, avec maintien d'un état euglycémique durant toute la période d'étude. Le moment où l'on observe le plateau hyperinsulinique est également dose dépendante (plus la dose d'insuline est importante plus le plateau survient de manière précoce).

L'administration de l'insuline en perfusion continue avec ajustement de l'euglycémie par suivi glycémique sur deux heures permet d'avoir un bon niveau de glycémie pour l'ensemble des modèles étudiés. De plus l'état hyperinsulinique provoqué n'a eu aucune conséquence létale sur les rats durant la période de suivie (2h).

3.2. Suivi de la kaliémie au cours du clamp euglycémique/hyperinsulinique

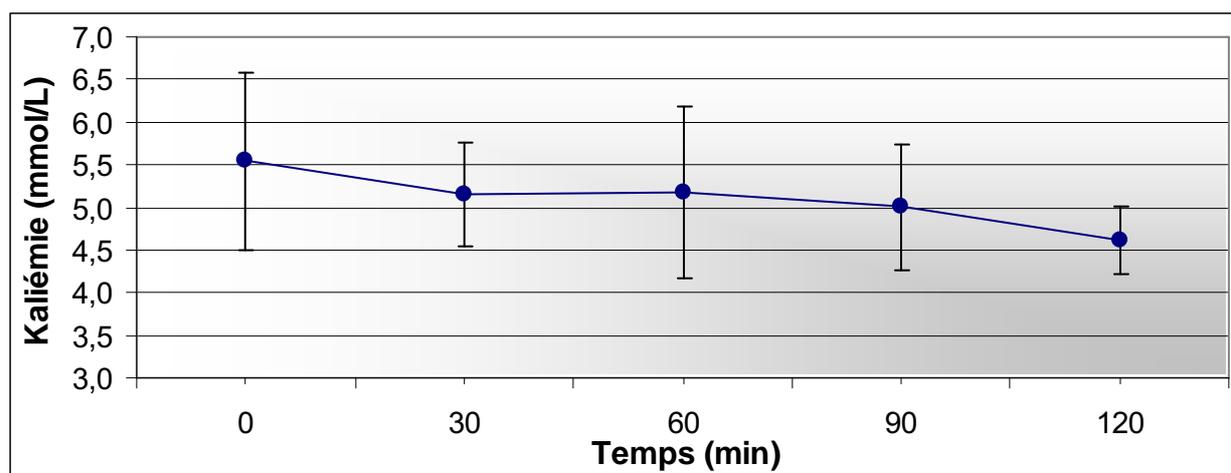


Figure 31 : Evolution de la kaliémie au cours du clamp euglycémique/hyperinsulinique à 100 UI/kg/h (n= 4)

On constate que l'administration d'une dose de 100 UI/kg/h (figure 31) d'insuline ne provoque pas d'hypokaliémie. Les concentrations en potassium sanguin bien qu'elles diminuent, restent tout de même dans les zones physiologiques normales (entre 3,5 et 5,3 mmol/L).

3.3. Analyse des données électrocardiographiques

Tableau VIII : Paramètres hémodynamiques de rat témoin à To, AVANT la pose du cathéter et APRES la pose du cathéter : (n=10)

	AVANT		APRES	
Temps (min)	0	Max- Min	0	Max- Min
Fc (batt/min)	302 ± 67	390 - 198	303 ± 63	384 - 220
espace PR (ms)	53 ± 4	61 - 48	52 ± 7	62 - 42

On constate que la pose du cathéter n'influe pas l'état hémodynamique (tableau VIII) et ne provoque pas de trouble du rythme (figure 32).

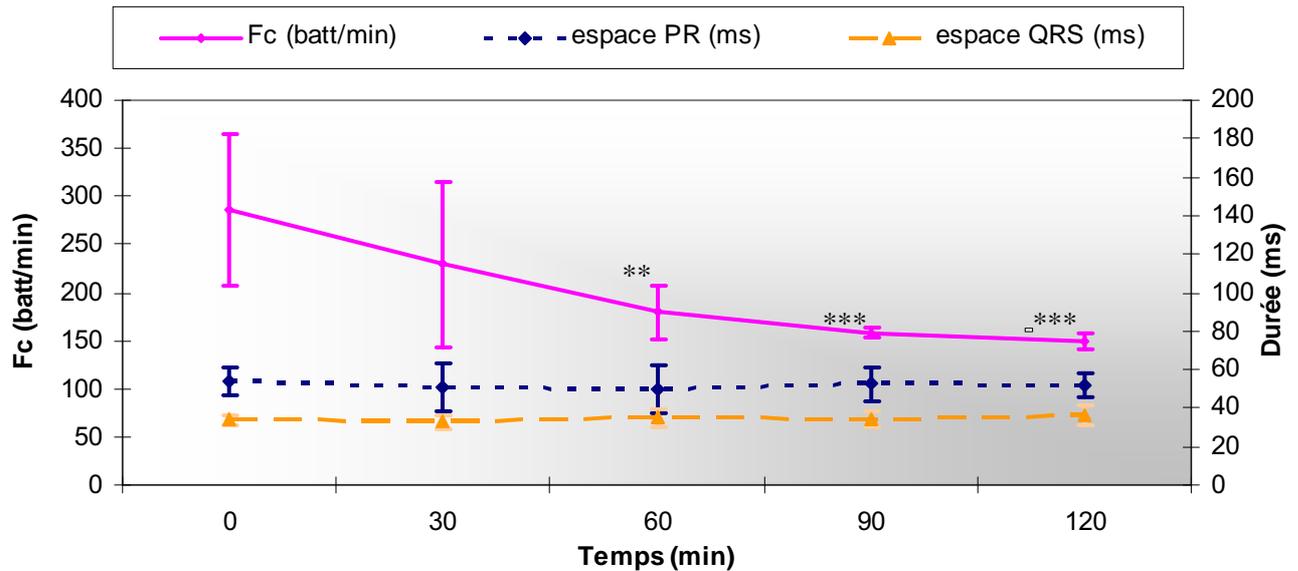


Figure 32 : Modification ECG, clamp euglycémique/hyperinsulinique à 100 UI/kg/h d'insuline (n=5)

** $p \leq 0,001$ et *** $p \leq 0,0001$ de différence significative avec la Fc du témoin.

La comparaison entre la Fc du groupe témoin (recevant uniquement du sérum physiologique) et le groupe recevant l'insuline à 100 UI/kg/h montre une différence à partir de T=60min, respectivement de 303 ± 63 batt/min et 180 ± 50 batt/min, sans que l'on puisse trouver d'explication.

Lors du clamp à 100 UI/kg/h, aucun trouble de la conduction n'est survenu, à l'exception d'une légère bradycardie qui survient à 60min.

Le clamp à 50 et 200 UI/kg/h présente le même profil électrocardiographique que celui à 100 UI/kg/h d'insuline. Ce profil traduit l'absence d'effet dose sur les manifestations électrocardiographique.

L'administration d'insuline en perfusion continue (en clamp) permet d'avoir un bon contrôle de l'état glycémique par ajustement du débit de glucose [Kline et al., 1995 ; Miles et al., 1995 ; Yuan et al., 1999 ; Carroll et al., 2001 ; Boyer et al., 2002]. Dans les trois groupes de clamps, l'état hyperinsulinique apparaît très précocement. Quant au plateau on constate qu'il survient d'autant plus rapidement que la dose est élevée. On a donc une bonne relation dose/réponse pour les 3 doses d'insulines testées. Aucune de ces trois doses n'a été létale pour les animaux, en effet aucun rat n'est mort au cours de ces expérimentations. L'analyse de

l'ECG, après avoir pris soin d'éliminer les paramètres tels que l'hypothermie et l'hypokaliémie pouvant eux-mêmes provoquer une modification électrocardiographique, ne montre aucun changement majeur si ce n'est une légère bradycardie.

II. Effet du clamp euglycémique/hyperinsulinique sur une intoxication aiguë à la digoxine

Au cours de cette partie nous avons étudié les effets d'un clamp euglycémique/hyperinsulinique, en prétraitement et en post-traitement, dans un modèle d'intoxication aiguë à la digoxine chez le rat anesthésié.

Dans l'étude en prétraitement, la perfusion de digoxine (3 mg/h) a été instaurée au plateau euglycémique/hyperinsulinique, soit une heure après le début de la perfusion de glucose et d'insuline. Le décès après administration de digoxine est survenu rapidement dans le groupe digoxine seule (D ; 15 ± 12 min) contrairement au groupe prétraité par glucose- insuline (GID) où il est survenu plus tardivement, en moyenne après 38 ± 3 min ($p < 0,001$). Trente minutes après le début de la perfusion de digoxine, 100% des animaux du groupe GID étaient vivants tandis que, 80% des animaux du groupe D ayant reçu uniquement la digoxine seule étaient morts ($p < 0,001$). L'analyse électrocardiographique (ECG) a montré qu'à trente minutes, 78% des animaux du groupe D avaient une disparition de l'onde P alors qu'elle est toujours présente chez l'ensemble des rats du groupe GID ($p < 0,001$). Les valeurs de la digoxinémie au moment de la mort étaient supérieures dans le groupe GID par rapport à celui du groupe D, respectivement $15,6 \pm 9,2$ mg/ml et $8,9 \pm 5,4$ mg/ml. S'agissant de la kaliémie, on a observé dès la cinquième minute après le début de la perfusion de digoxine une augmentation significative dans le groupe D comparativement au groupe GID, respectivement $7,1 \pm 1,2$ mmol/L et $4,4 \pm 0,4$ mmol/L ($p < 0,001$).

Dans l'étude en post-traitement, le clamp euglycémique/hyperinsulinique a débuté 20 min après le début de la perfusion de digoxine (0,6 mg/h). Cette perfusion a entraîné la mort de l'ensemble des animaux du groupe digoxine seule (D) après 80 ± 10 min. Pour les animaux du groupe digoxine-insuline-glucose (DIG), post-traités par le clamp euglycémique/hyperinsulinique, 60% des rats décédaient à 137 ± 40 min et les 40% restant survivaient au-delà de 180 min ($p < 0,001$). Par ailleurs quatre-vingt minutes après le début de l'administration continue de digoxine, 100% des animaux du groupe DIG étaient en vie, alors que dans le groupe D, 80% des rats étaient morts. Le tracé ECG montre que, quatre-vingt minutes après le début de l'administration de digoxine l'onde P avait disparu chez 80% des animaux du groupe D, alors qu'elle était toujours présente chez l'ensemble des animaux du groupe DIG ($p < 0,001$). Au moment de la mort des animaux, la digoxinémie était supérieure dans le groupe DIG comparativement à celle du groupe D, respectivement $10,7 \pm 8,3$ et $8,5 \pm 4,6$ mg/ml. S'agissant

de la kaliémie, trente minutes après le début de l'administration de digoxine, elle était significativement augmentée dans le groupe D comparativement à celle du groupe DIG, respectivement $6,9 \pm 0,5$ et $4,9 \pm 0,3$ mmol/L ($p < 0,001$).

Ces résultats expérimentaux, suggèrent l'existence d'un effet bénéfique d'une perfusion d'insuline-glucose comme traitement de l'intoxication aiguë par digoxine. Ce traitement pourrait retarder l'apparition des troubles du rythme cardiaque à l'origine du décès des patients.

1. Travail publié dans Toxicology

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans la revue de *Toxicology* (2006) présentée ci-dessous.



Short communication

Cardio protective effect of glucose–insulin infusion on acute digoxin toxicity in rat

R. Oubaassine^a, P. Bilbault^b, J.C. Roegel^c, E. Alexandre^d, S. Sigrist^a,
T. Lavaux^b, A. Jaeger^b, M. Pinget^a, L. Kessler^{a,*}

^a *Laboratory of Cellular and Genetic Therapy, European Centre of Diabetes Study, Strasbourg, France*

^b *Intensive Care Unit, University Hospital, Strasbourg, France*

^c *Forenap Therapeutic Discovery, Rouffach, Strasbourg, France*

^d *Foundation of Transplantation, Strasbourg, France*

Received 30 January 2006; received in revised form 13 April 2006; accepted 14 April 2006

Available online 27 April 2006

Abstract

We recently observed a case of digoxin and insulin self-poisoning without cardiac repercussion. We raised the hypothesis that insulin may have a cardio-protective effect in case of digoxin toxicity. We have therefore evaluated the effect of glucose–insulin infusion on mortality and ECG abnormalities during acute digoxin toxicity in rats. Before and after a hyperinsulinemia–euglycemia clamp, rats in glucose–insulin–digoxin (GID) group ($n=10$) received an intravenous infusion of 12 ml/h or 2.5 ml/h digoxin (0.25 mg/ml) respectively until death occurred. Animals receiving digoxin or saline solution intravenously served as control ($n=10$). ECG recording was performed in all animals over the entire period. Serum insulin and digoxin concentrations were measured by ELISA method after digoxin administration. When digoxin was administered after the clamp, all animals in GID group were alive, whereas 80% of animals in the digoxin group were dead ($p<0.001$) after 30 min. The administration of Digoxin provoked rapid death of rats in the digoxin group in 15 ± 12 min whereas in GID group the survival period was significantly increased to 38 ± 3 min ($p<0.001$). Twenty minutes after digoxin administration, P waves disappeared for 78% of animals in digoxin group while they were present in all rats of GID group ($p<0.001$). Animal death occurred after a digoxin infusion volume of 7.7 ± 0.6 ml and 3.0 ± 2.4 ml in GID and digoxin group respectively ($p<0.001$). Five minutes after digoxin administration, potassium plasmatic level increased significantly in digoxin group as compared to GID group: 7.1 ± 2 mmol/l versus 4.4 ± 0.4 mmol/l ($p<0.001$). When digoxin was infused before the clamp, 40% of animals in GID group were alive after 180 min and the other 60% died after 137 ± 40 min whereas death of rats in the digoxin group occurred within 80 ± 10 min ($p<0.001$). The death of animals was preceded by the P waves disappearing. Thirty minutes after digoxin administration, the potassium plasmatic level increased significantly in the digoxin group as compared to the GID group: 6.9 ± 0.5 mmol/l versus 4.9 ± 0.3 mmol/l ($p<0.001$). At the time of death, both volume of digoxin infusion and serum digoxin concentration were increased in GID group as compared to digoxin group: 5.7 ± 1.6 ml versus 3.3 ± 0.4 ml ($p<0.001$) and 10.7 ± 8.3 mg/l versus 8.5 ± 4.6 mg/l.

Conclusion: Glucose–insulin infusion delayed the abnormalities in cardiac conduction and improved rat survival after acute digoxin toxicity. These results suggest a cardioprotective effect of insulin in case of acute digoxin toxicity.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Digoxin; Acute toxicity; Glucose–insulin infusion; Cardio-protective effect

* Corresponding author at: Department of Endocrinology and Diabetology, University Hospital, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, Cedex, France. Tel.: +33 3 88 11 60 52; fax: +33 3 88 11 62 63.
E-mail address: laurence.kessler@medecine.u-strasbg.fr (L. Kessler).

1. Introduction

Digoxin poisoning is common but potentially lethal because of its cardiac toxicity. Although digoxin-specific Fab fragments administration is the treatment of choice for severe digoxin poisoning, this treatment is very expensive and not available in all the care units and in all the countries (Bateman, 2004).

We recently observed a case of digoxin and insulin self-poisoning which did not develop life-threatening features despite high digoxin serum levels. A 35-year-old woman ingested in a suicide attempt 17.5 mg digoxin, 3.4 g propranolol, 400 mg domperidon and 180 mg bromazepam. When the emergency medical unit arrived at her home, 5 h post-ingestion, the patient was in a coma (Glasgow Coma Score = 6) with vomiting. Blood pressure was 115/80 mmHg and pulse rate was 40 beats/min. The initial finger stick glucose level was undetectable, which was confirmed by the measure of venous glucose level at 0.22 mmol/l. After intravenous infusion of 9 g glucose, the blood glucose level increased to 2.2 mmol/l. The patient was immediately intubated. ECG recording showed a 1st degree atrio-ventricular block. Other biomedical investigations, chest X-ray, blood gases, creatinine, electrolytes (kalemia = 3.6 mmol/l) were normal. Serum digoxin was 9.2 µg/ml and decreased slowly. Propranolol level was 706 ng/ml. Over the following 24 h, infusion of 300 g glucose was necessary to obtain euglycaemia. Blood pressure remained normal and cardiac rhythm ranged between 44 and 70 beats/min without catecholamine or atropine. No biological abnormality and in particular no hyperkalemia were observed. When the patient regained consciousness, she confirmed that she had self-injected 50 IU of regular insulin.

Glucose–insulin infusion has been also proposed for the treatment of some antiarrhythmic poisonings, in particular with calcium channel blockers (Megarbane et al., 2004; Shepherd and Klein-Schwartz, 2005). Others studies reported the beneficial effect of glucose–insulin infusion on cardiac function and outcome during left ventricular acute ischaemia (Bedetti et al., 2005). Electrophysiological effect of insulin has been reported on normal cardiac tissues. Insulin stimulates the sarcolemmal Na⁺-pump activity or the sarcolemmal ATPase activity in cardiac muscle (LaManna and Ferrier, 1981). Vér et al showed that insulin can modify the expression of Na⁺/K⁺-ATPase isoforms in the left ventricle of diabetic rats (Vér et al., 1997). On the other hand, the cardiac effect of digoxin is mediated by the inhibition of the Na⁺/K⁺-ATPase leading to an increase in intracellular calcium (Sticherling et al., 2000). These data suggest

that insulin and digoxin could have a common action target: the Na⁺/K⁺-ATPase.

We raised the hypothesis that for our patient, administration of insulin may have had a cardio-protective effect against digoxin toxicity. In the present study we evaluated the effect of glucose–insulin infusion on mortality and ECG abnormalities during acute digoxin poisoning in rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Eight-weeks-old female Wistar rats (Depré, Saint Doulchard, France) weighing between 250 and 300 g were anaesthetized with intraperitoneal injection of 29 mg/kg xylazine 2% (Rompun, Bayer, Puteaux, France) and 39 mg/kg ketamine 10% (Imalgen, Merial, Lyon, France). An overhead lamp was used to maintain body temperature near 37 °C. Limb-lead-needle electrodes were used to record ECG (DI, DII and DIII bipolar derivations). The amplified and filtered ECG signals (0.5–3.0 Hz cut-off frequencies: Bessel type filter, order 2; 50 Hz notch filter (–30 dB); SESAMS, Logelbach, France) were digitized at 256 Hz on a signal processor board (16 bit resolution) and stored in digital form on a Personal Computer using the HEM software (Notocord, Croissy sur Seine, France). A 22G catheter (Insyte-W, Vialon, Madrid, Spain) was inserted in the jugular vein of fasting rats to infuse glucose, insulin (Actrapid: 100 IU/ml, Novonordisk, Copenhagen, Denmark) and digoxin (Nativelle, Procter Gamble Pharmaceuticals, Neuilly, France).

2.2. Experimental protocol

Three groups of animals were studied: glucose–insulin–digoxin (GID) group, digoxin group and control (*n* = 10 in each group).

2.2.1. Glucose–insulin infusion pre-treatment

Animals in the GID group weighing 277 ± 25 g received an intravenous infusion of 100 IU/kg/h insulin with glucose (50 mg/100 ml) infused at 0.55 ml/h to maintain a glycaemia between 5.5 and 6.6 mmol/l. After a 1 h period of glycaemia stabilization, they received an intravenous infusion of 12 ml/h digoxin (0.25 mg/ml) until death occurred. In the digoxin group, animals weighing 268 ± 20 g were perfused with saline solution (0.9 ml/h) for one hour before digoxin intravenous infusion. Animals receiving only normal saline solution served as control.

2.2.2. Glucose–insulin infusion post-treatment

Animals in the digoxin group (weigh: 275 ± 17 g) received an intravenous infusion of 2.5 ml/h digoxin (0.25 mg/ml) until death occurred. After 20 min of digoxin infusion, 100 IU/kg/h insulin with glucose (50 mg/100 ml) was infused intravenously

at 0.55 ml/h to maintain a glycaemia between 5.5 and 6.6 mmol/l in animals of GID group (weigh: 287 ± 16 g). In the digoxin group, animals were perfused with saline solution (0.9 ml/h) 20 min after digoxin administration. Animals receiving only normal saline solution served as control.

Immediately after anaesthesia, ECG recording was started in all groups and monitored continuously until animal death occurred.

2.3. Biochemical analysis

After anaesthesia, blood glucose level was measured every 15 min using tail vein capillary blood glucose sample (Asencia Confirm, Bayer, Puteaux, France). Insulin and potassium plasmatic levels were measured by ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Sweden) and potentiometer methods respectively every 30 min. Serum digoxin concentration was measured by ELISA method (Radiometer Medical Aps, Copenhagen, and Denmark) during the first 5 min then every 30 min following digoxin administration and post-mortem.

2.4. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation. All statistical analysis including Kaplan Meyer survival curves for the survival period and the P wave disappearance were performed using Sigma Stat for Windows (v. 3.1, SPSS, Chicago, IL, USA). Analysis of variance was used for comparison between digoxin and GID groups for pulse rate and QRS interval. Significance was taken when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Animal survival

3.1.1. Glucose–insulin infusion pre-treatment

Thirty minutes after digoxin administration, all the animals in the GID group were alive whereas 80% of animals in the digoxin group were dead ($p < 0.001$) (Fig. 1A). All animals in control group were alive during the experiment. Digoxin administration provoked a faster death in digoxin group (15 ± 12 min) compared to GID group (38 ± 3 min; $p < 0.001$). Forty-two minutes after digoxin infusion, all animals in both groups were dead. Death occurred after infusion of 7.7 ± 0.6 ml digoxin in GID group versus 3.0 ± 2.4 ml digoxin in digoxin group ($p < 0.001$). At the time of death, serum digoxin concentration was higher in GID group as compared to digoxin group: 15.6 ± 9.2 mg/l versus 8.9 ± 5.4 mg/l. During digoxin infusion in GID group, blood glucose and plasmatic insulin levels were clamped to 1.2 ± 0.3 g/l and 582 ± 53 UI/l, respectively. Five minutes after digoxin administration, potassium plasmatic levels increased significantly

in digoxin group from 4.7 ± 0.3 to 7.1 ± 2 mmol/l ($p < 0.001$) while it remained stable in GID group: 4.6 ± 0.3 mmol/l versus 4.4 ± 0.4 mmol/l. Thirty minutes after digoxin administration, potassium plasmatic level rose to 7.95 ± 1.28 mmol/l in the GID group ($p < 0.001$).

3.1.2. Glucose–insulin infusion post-treatment

When digoxin was infused before the clamp, 40% of animals in GID group were alive after 180 min and the others 60% were dead after 137 ± 40 min whereas death of rats in digoxin group occurred in 80 ± 10 min ($p < 0.001$). Eighty minutes after digoxin administration, all animals in GID group were alive while 80% of animals in digoxin group were dead ($p < 0.001$) (Fig. 1B). At the time of death, both volume of digoxin infusion and serum digoxin concentration were increased in the GID group as compared to digoxin group: 5.7 ± 1.6 ml versus 3.3 ± 0.4 ml ($p < 0.001$) and 10.7 ± 8.3 mg/l versus 8.5 ± 4.6 mg/l. Thirty minutes after digoxin administration, potassium plasmatic level increased significantly in digoxin group as compared to GID group: 6.9 ± 0.5 mmol/l versus 4.9 ± 0.3 mmol/l ($p < 0.001$).

3.2. ECG analysis

3.2.1. Glucose–insulin infusion pre-treatment

Five minutes after digoxin infusion, the pulse rate decreased significantly from 331 ± 34 to 160 ± 135 beats/min ($p < 0.01$) in digoxin group whereas pulse rate remained stable at 246 ± 59 beats/min versus 257 ± 62 beats/min in GID group. In control group, the pulse rate was 292 ± 53 beats/min. In addition, there is no ECG recording abnormality in control group. QRS duration significantly increased from 47 ± 17 to 59 ± 16 ms ($p < 0.05$) in digoxin group whereas it was not modified in GID group (33 ± 3 ms versus 35 ± 4 ms). In addition, before death, ECG recording (DI) revealed second- or third-degree atrioventricular block in digoxin group (Fig. 2A). In both groups, P waves disappearing preceded the death by 2–5 min. Twenty minutes after digoxin administration, P waves disappeared in 78% of animals in digoxin group whereas it remained present in all the rats of GID group ($p < 0.001$) (Fig. 3A).

3.2.2. Glucose–insulin infusion post-treatment

Sixty minutes after digoxin infusion, QRS duration significantly increased from 32 ± 2 to 55 ± 29 ms ($p < 0.05$) in digoxin group whereas it was not modified in GID group (31 ± 2 ms versus 34 ± 3 ms). Eighty minutes after digoxin infusion, pulse rate decreased

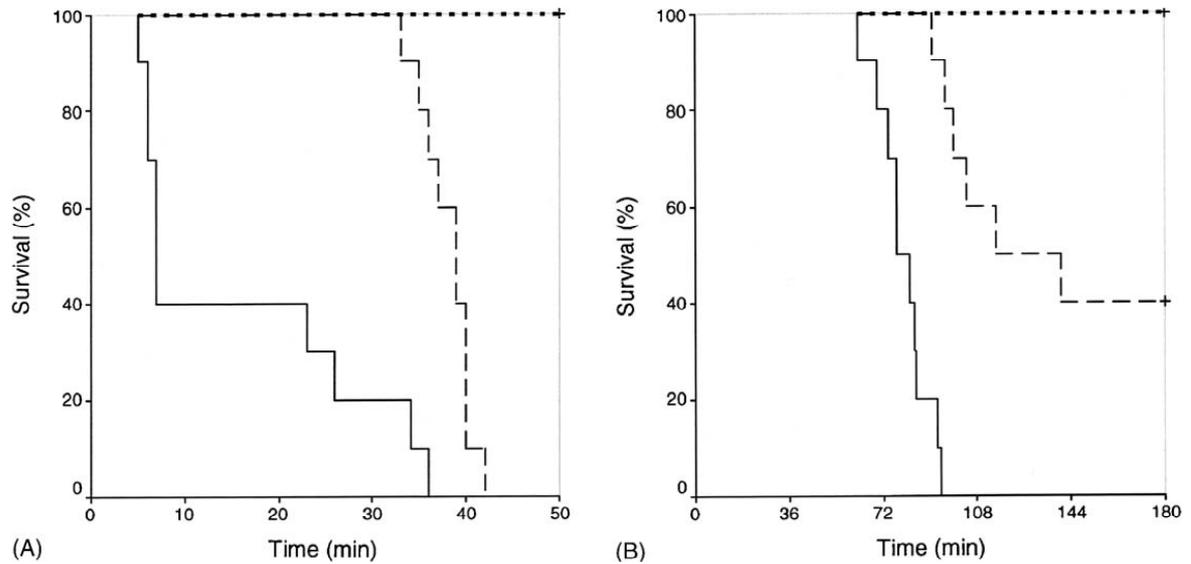


Fig. 1. Rat survival in control group (···) and after acute digoxin toxicity without (—) and with (---) insulin glucose infusion pre- (A) or post-treatment (B).

significantly in the digoxin group as compared to GID group: 147 ± 156 beats/min versus 324 ± 116 beats/min ($p < 0.05$). Before the death of animals, abnormalities of ECG recording (DI) were observed in digoxin

group, such as second- or third-degree atrioventricular block and loss of P wave (Fig. 2B). Eighty minutes after digoxin administration, P wave disappeared in 80% of animals in digoxin group while P wave was

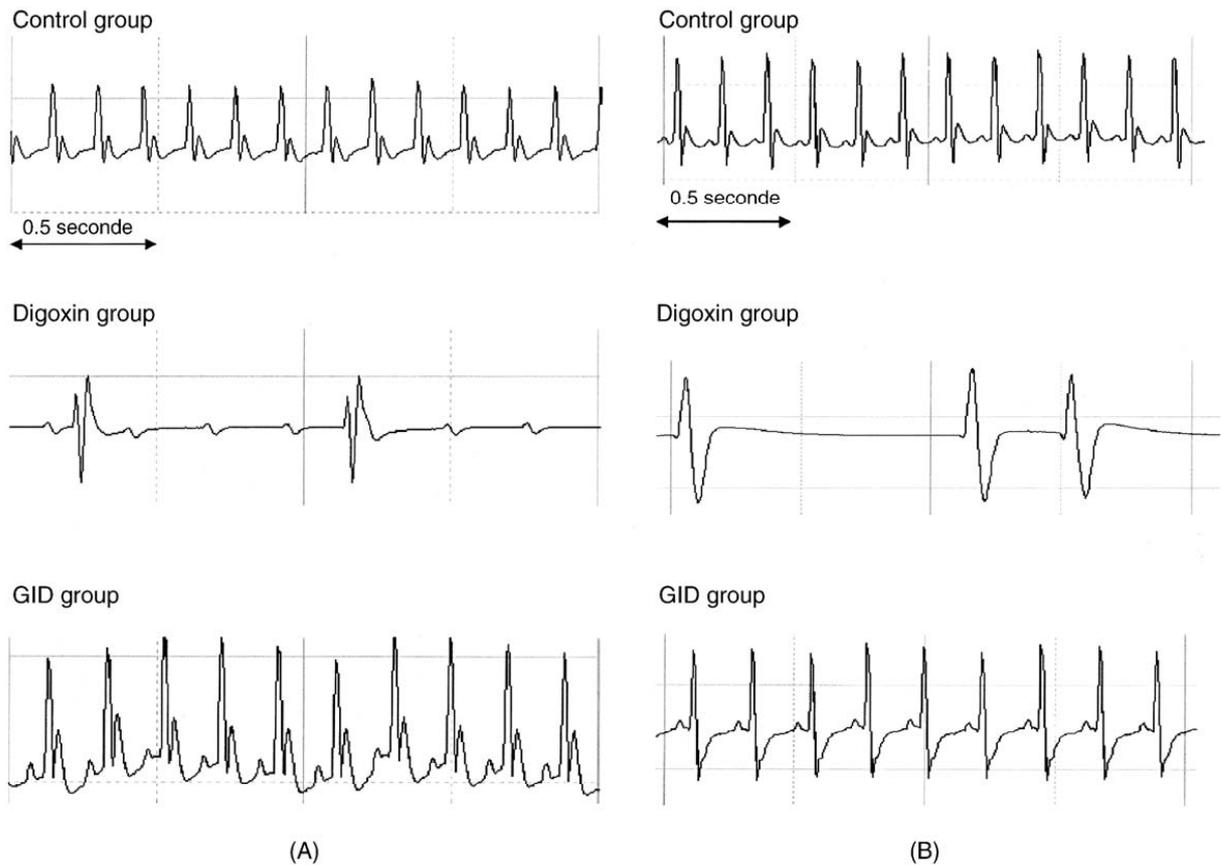


Fig. 2. ECG-recordings of control rat and after acute digoxin toxicity with insulin glucose infusion pre- (A) or post-treatment (B).

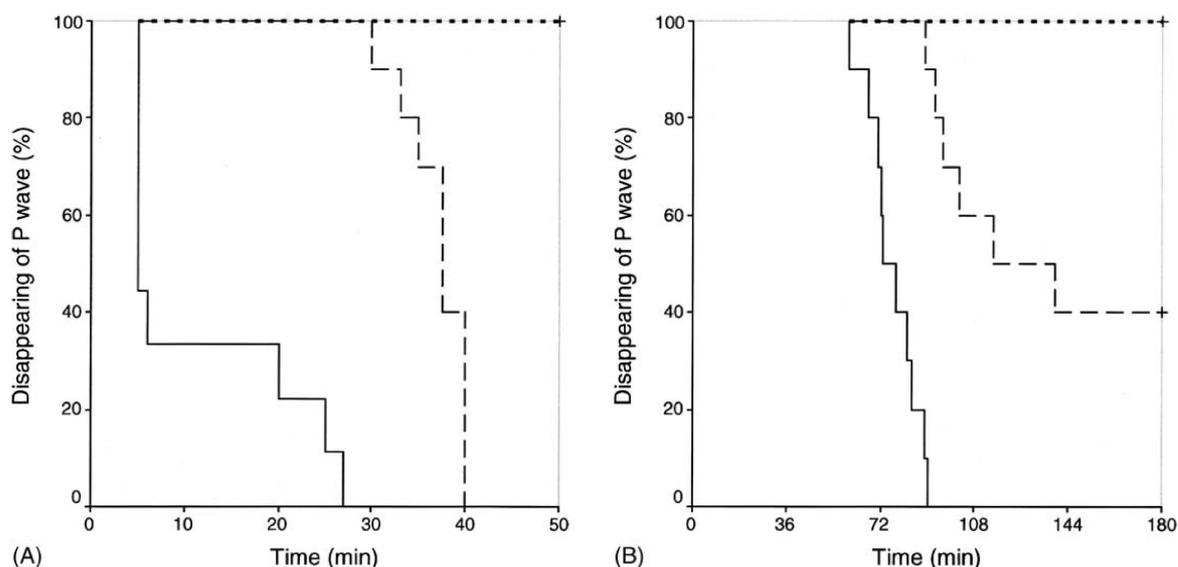


Fig. 3. P waves disappearing in control group (· · ·) and after acute digoxin toxicity without (—) and with (---) insulin glucose infusion pre- (A) or post-treatment (B).

observed in all animals of GID group ($p < 0.001$) (Fig. 3B).

4. Discussion

This study demonstrates that glucose–insulin infusion pre- and post-treatments delay the abnormalities of cardiac conduction and increases rat survival after an acute digoxin poisoning.

Fifteen minutes after digoxin infusion, animals without glucose–insulin pre-treatment died from acute digoxin cardiac toxicity. Indeed, the death of animals was preceded by an increase in potassium plasmatic levels together with a disappearance of the P waves. Maitai et al. (1995) reported in a model of acute digoxin toxicity in rats that the lethal dose of digoxin was 2.91 mg/kg/h with a 12 ml/h infusion rate while in our study 2.83 mg/kg/h digoxin administration was required with the same infusion rate. After 1 h of euglycemia and hyperinsulinemia, the death of animals occurred 38 min after administration of a 2.5-fold higher digoxin infusion volume than that observed in digoxin group. However, serum digoxin concentrations were not statistically different between both groups. These data can be explained by the haemodilution induced by the infusion volume significantly higher in the GID group. After glucose–insulin infusion, the rat death could be explained by the neurological effect of digoxin particularly important in rat models (Bahrmann and Greff, 1981) and/or by the vascular overloading due to the volume of infusion required for digoxin administration. During the digoxin infusion, we did not observe clinical signs of neurological effect

such as convulsions, . . . However, the 7 ml infusion volume required for digoxin administration could explain a vascular overloading and the animal death. Furthermore the ECG abnormalities and the increase in potassium levels observed immediately before death also suggested that digoxin cardiac toxicity could be involved in the late death of rats in GID group. We did not observe the classical ECG abnormalities of hyperkalemia (tall, pointed and tented T wave, T wave disappearing, ST-segment elevation, . . .) in GID group. In digoxin poisoning, hyperkalemia reflects the severity of Na^+/K^+ -ATPase pump blockage resulting from a release of intracellular potassium and not from an increase of the total potassium pool. This suggests that rats died from digoxin poisoning rather than hyperkalemia.

After digoxin administration, the death of animals in digoxin group occurred between 7 and 36 min suggesting an heterogeneous response to acute digoxin toxicity. These results could be explained by the existence of a genetic polymorphism of enzymes involved in the digoxin metabolism (Verstuyft et al., 2003). This difference in response to acute digoxin toxicity was also observed for the ECG abnormalities. When the animals were pre-treated with glucose–insulin, this heterogeneous effect disappeared and the animal's death occurred between 33 and 42 min after digoxin administration. This observation suggests a common target between insulin and digoxin. Indeed, VÉR et al. demonstrated that insulin treatment enhances Na^+/K^+ -ATPase activity in the left ventricle of the normal and diabetic rat's hearts (VÉR et al., 1997). Consequently, insulin might have modified the access of digoxin to Na^+/K^+ -ATPase binding site,

leading to a reduction of digoxin pharmacological effects.

Insulin-glucose infusion administered after digoxin poisoning also significantly increased the survival rate of animals and delayed the ECG recording abnormalities. In addition, 40% of animals were alive after three hours of experiment. It's of importance to point out that the lethal dose was similar for insulin-glucose infusion pre- and post-treatment. Because of a potential common target between insulin and digoxin, the data of insulin-glucose post-treatment suggests a neutralisation or a transfer of digoxin from this target. The protective effect of insulin glucose infusion against digoxin acute toxicity could be particularly relevant for clinical management of digoxin poisoning.

In conclusion, glucose-insulin pre- and post-treatments have a cardio-protective effect on the acute toxicity of digoxin in the anaesthetized rat. Further experimental investigations are necessary to confirm the action mechanism of insulin in this model.

References

- Bahrmann, H., Greeff, K., 1981. Evaluation of cardiac glycosides in the intact animal. In: Greeff, K. (Ed.), *Cardiac Glycosides. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 56/1. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 117–152.
- Bateman, D.N., 2004. Digoxin-specific antibody fragments: how much and when? *Toxicol. Rev.* 23, 135–143.
- Bedetti, G., Pizzi, C., Gabrieli, L., Varga, A., Pisanisi, E., Bugiardini, R., et al., 2005. The beneficial effect of insulin, glucose, and dipyridamole on regional left ventricular function early after acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 102, 255–258.
- LaManna, V.R., Ferrier, G.R., 1981. Electrophysiological effects of insulin on normal and depressed cardiac tissues. *Am. J. Physiol.* 240, 636–644.
- Maitai, C.K., Njoroge, D.K., Munenge, R.W., 1995. Interaction between nifedipine and digoxin in rats. *East Afr. Med. J.* 72, 75–76.
- Megarbane, B., Karyo, S., Baud, F.J., 2004. The role of insulin and glucose (hyperinsulinaemia/euglycaemia) therapy in acute calcium channel antagonist and beta-blocker poisoning. *Toxicol. Rev.* 23, 215–222.
- Shepherd, G., Klein-Schwartz, W., 2005. High-dose insulin therapy for calcium-channel blocker overdose. *Ann. Pharmacother.* 39, 923–930.
- Sticherling, C., Oral, H., Horrocks, J., Chough, S.P., Baker, R.L., Kim, M.H., et al., 2000. Effects of digoxin on acute, atrial fibrillation-induced changes in atrial refractoriness. *Circulation* 102, 2503–2508.
- Vér, Á., Szántó, I., Bányász, T., Csermely, P., Végh, E., Somogyi, J., 1997. Changes in the expression of Na⁺/K⁺-ATPase isoenzymes in the left ventricle of diabetic rat hearts: effect of insulin treatment. *Diabetologia* 40, 1255–1262.
- Verstuyft, C., Schwab, M., Schaeffeler, E., Kerb, R., Brinkmann, U., Jaillon, P., et al., 2003. Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 58, 809–812.

2. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons démontré dans un modèle de rat que la perfusion d'insuline-glucose en pré ou post-traitement d'une intoxication aiguë de digoxine, retarde le délai d'apparition des troubles cardiaques et rallonge la durée de survie des animaux. La perfusion semble également avoir une action sur le type de troubles cardiaques qui apparaissent. En effet, nous n'avons pas observé de BAV chez les animaux traités par l'insuline-glucose. Or l'apparition d'un tel signe témoigne d'une gravité d'intoxication et de la mortalité potentielle qu'elle représente si celle-ci n'est pas prise en charge.

2.1. Choix du modèle expérimental

2.1.1. Dose et animal

Dans notre modèle d'étude, nous avons utilisé des doses extrêmement élevées de digoxine (2,8 mg/kg/h) mais également d'insuline (50 à 200 UI/kg/h), cela afin d'évaluer l'effet d'un hyperinsulinisme sur une intoxication aiguë grave à la digoxine. Dans ce modèle, la glycémie a été stabilisée à des valeurs normales par la réalisation d'un clamp euglycémique/hyperinsulinique.

Par ailleurs, selon [Bahrman *et al.*, 1981] le choix du rat dans un modèle d'intoxication à la digoxine ne paraît pas le plus adapté en raison de la sensibilité des rats aux effets neurologiques de la digoxine. En effet la digoxine peut provoquer des convulsions, voir un arrêt respiratoire par paralysie. Ces derniers peuvent provoquer la mort du rat avant l'apparition des signes cardiaques. Toutefois au cours de nos expérimentations, nous n'avons observé aucune de ces manifestations.

2.1.2. Modèle d'infusion

La réalisation d'une perfusion d'un clamp euglycémique/hyperinsulinique, ainsi que la perfusion de la digoxine à débit fixe n'a pas été le choix premier. En effet, en l'absence de modèle animaux, et sur la base de notre observation clinique, nous avons opté initialement pour une administration des produits en bolus, ce schéma reproduisant les conditions cliniques et le profil cinétique de l'intoxication observée en clinique. Cependant l'expérimentation associée aux éléments pharmacologiques étant différents de l'environnement clinique, nous avons abandonné ce mode d'administration. En effet pour notre étude le bolus de digoxine ne permettait pas d'avoir une administration contrôlée et stable. De même il était difficile de réaliser un bon contrôle glycémique ainsi qu'une bonne

maîtrise pharmacologique du plateau insulinique. Face à ces difficultés, et en s'appuyant sur les travaux de [Maitai et al., 1995], nous avons fait le choix d'une administration de la digoxine en perfusion continue à débit fixe. Pour l'administration de l'insuline et du glucose nous avons préféré réaliser une perfusion continue en clamp euglycémique/hyperinsulinique comme décrit dans plusieurs travaux [Kline et al., 1995 ; Miles et al., 1995 ; Yuan et al., 1999 ; Carroll et al., 2001 ; Boyer et al., 2002]. Ce clamp a ainsi permis d'observer une bonne relation dose/réponse. Le modèle au débit d'insuline à 100 UI/kg/h dont le plateau survient à 1h, est le clamp expérimental le plus adapté car il nous permet dans un temps relativement correct de mieux conditionner l'animal. C'est pourquoi nous l'avons choisi comme modèle de référence.

2.1.3. Le post-traitement

L'idée que le traitement d'une intoxication survienne après celle-ci nous a conduit à évaluer l'effet d'une perfusion du clamp en post traitement de l'intoxication, ceci afin de confirmer l'effet cardioprotecteur de l'insuline-glucose constaté dans le prétraitement. En effet dans ce dernier modèle nous avons pu montrer qu'après une heure de clamp euglycémique/hyperinsulinique à 100 UI/kg/h d'insuline, le délai de survie face à une intoxication grave à la digoxine augmentait de manière très significative ($p < 0,001$) comparativement à des animaux n'ayant pas été prétraités par l'insuline-glucose, soit un délai respectivement de 38 ± 3 min *versus* 15 ± 12 min.

Dans le modèle des animaux post-traités, le clamp euglycémique/hyperinsulinique a débuté 20 min après l'administration de la digoxine à un débit de 2,5 ml/h, soit un débit de perfusion de la digoxine plus faible que dans le modèle précédant où il était de 12 ml/h. Cela a permis d'éviter que les animaux ne décèdent dans le premier quart d'heure. Les données montrent qu'une perfusion de digoxine entraîne le décès au bout de 80 ± 10 min de l'ensemble des animaux du groupe digoxine, tandis que parmi les animaux du groupe post-traités par une perfusion euglycémique/hyperinsulinique, 60% décèdent à 137 ± 40 min et les 40% restants survivent au-delà de 180 min ($p < 0,001$).

2.2. Observations expérimentales

2.2.1. Motif du décès

Dans le groupe prétraité par la perfusion d'insuline-glucose l'analyse de l'ECG montre que la Fc diminue de façon significative à partir de 37,5 min. A cette période le volume de digoxine perfusé pourrait expliquer l'apparition du décès. En effet les rats ont un volume sanguin

d'environ 12 ml or en l'espace de 30 min tous les animaux reçoivent 8 ml de la solution contenant la digoxine, soit les trois-quarts de leur volume sanguin. D'ailleurs l'ensemble des animaux de ce groupe meurt au bout de $38 \pm 2,8$ min. Cette mort, survenant quasiment au même moment serait probablement due à la surcharge volémique qui pourrait entraîner un œdème aigue pulmonaire occasionnant une hypoxiémie artérielle responsable de trouble du rythme.

Par ailleurs, certains animaux du modèle post-traités par la perfusion d'insuline-glucose ne décèdent qu'après la fin de la période de suivie expérimentale. La survenue de cette mort peut être imputable à l'apparition d'une hypoglycémie du fait de la durée d'action de l'insuline utilisée qui est d'environ 50 min, ceci pour les animaux qui décèdent dans l'heure. Toutefois la raison la plus probable reste l'intoxication à la digoxine. En effet, à l'arrêt des perfusions l'animal n'a plus de protection insulinique face à la présence de digoxine. Dans ces conditions la demi-vie plasmatique de 36 heures de la digoxine peut expliquer la mort des animaux.

2.2.2. Hétérogénéité dans la réponse à l'intoxication à la digoxine

Dans le modèle de prétraitement à l'insuline-glucose, nous avons observé une hétérogénéité de réponse face à une intoxication aiguë grave à la digoxine dans le groupe recevant la digoxine seule. En effet, le décès apparaît de manière distincte selon les rats, soit à la 7^{ème} soit à la 36^{ème} minute. Cette hétérogénéité semble certainement due à l'existence d'un polymorphisme génétique des enzymes de métabolisation [Verstuyft et al., 2003]. En effet, une induction de la métabolisation provoque une élimination de la quantité de digoxine, ce qui aura pour conséquence une baisse de la digoxinémie et donc un effet létal plus tardif. Cependant cette hétérogénéité observée dans le groupe digoxine seule, disparaît lorsque les rats sont prétraités par un clamp euglycémique/hyperinsulinique. D'ailleurs le délai d'apparition du décès est proche chez ces animaux, entre 33 et 42 minutes. Cela peut s'expliquer par une action sur une cible commune entre l'insuline et la digoxine [Vér et al., 1997]. En effet, l'insuline en agissant sur la pompe Na,K-ATPase pourrait occuper ou modifier le site de liaison de la digoxine sur cette enzyme. L'accès au site sur la pompe Na,K-ATPase étant transformé, la digoxine perd de ses effets pharmacologiques.

2.2.3. *La kaliémie*

Au cours de notre étude nous avons constaté que la kaliémie des rats traités par un clamp euglycémique/hyperinsulinique à 100 UI/kg/h pendant 2 heures, reste dans un intervalle de concentration normale. Or un hyperinsulinisme provoque une hypokaliémie. Donc cette normokaliémie pourrait s'expliquer par la présence d'une légère hémolyse suite aux prélèvements effectués. Par ailleurs, le dosage de la kaliémie chez les rats recevant la digoxine seule n'a pu être réalisé au-delà de la 5^{ème} minute, car trop souvent le sang et/ou les prélèvements étaient hémolysés rendant le dosage impossible. De même lors de l'administration de la digoxine nous avons observé une hématurie, qui pourrait être l'expression clinique l'hémolyse. Le suivi de la kaliémie est un élément important car l'observation d'une hyperkaliémie est un bon témoin de l'intoxication à la digoxine, qui inhibe la Na,K-ATPase. Ainsi une normokaliémie est synonyme d'une cardioprotection face à une imprégnation digoxinémique.

Les résultats de cette étude expérimentale suggèrent l'existence d'un effet bénéfique d'une perfusion d'insuline-glucose lors d'une intoxication aiguë grave à digoxine. Par conséquent au vu de ces résultats et des données de la littérature, l'insuline pourrait avoir une action (directe et/ou indirecte) sur la pompe Na,K-ATPase, qui est la cible d'action de la digoxine. Ainsi l'existence au niveau du cardiomyocyte d'une cible d'action commune entre la digoxine et l'insuline suggère que l'effet cardioprotecteur de l'insuline pourrait être dû soit à une neutralisation ou un déplacement de la digoxine par rapport à son site d'action.

L'insuline agit-elle directement sur le site d'action de la digoxine au niveau de la pompe Na,K-ATPase ? La mise en évidence du mécanisme d'action de l'insuline sur cette pompe, sous forme isolée et au niveau du cardiomyocyte, constitue la seconde partie de notre travail.

III. Etude *in vitro* du mécanisme cellulaire des effets de l'insuline dans l'intoxication à la digoxine

Au cours de ces travaux, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux effets de l'insuline sur l'activité enzymatique de la Na,K-ATPase isolée et purifiée, en absence ou en présence de la digoxine (ou de l'ouabaine). Puis dans un second temps, nous avons étudié dans des cultures de cellules MODE-K et de cardiomyocytes de rats nouveau-nés, l'interaction de l'insuline avec la Na,K-ATPase en absence ou en présence de la digoxine (ou de l'ouabaine).

L'activité enzymatique de la Na,K-ATPase purifiée a été étudiée par colorimétrie (Fiske&Subbarow) et par luminométrie (test à la luciférase) en présence d'insuline et/ou de digoxine. L'interaction moléculaire directe entre insuline et Na,K-ATPase a été étudiée en résonance de plasmon de surface (RPS) avec le BIACORE®3000 et, en western blot. La toxicité cellulaire de la digoxine et de l'ouabaine, a été étudiée par FACS en absence et en présence d'insuline (10^{-11} à 1,75 mg/ml). Un immunomarquage de cardiomyocytes de rats nouveau-nés analysé en microscopie à ApoTome® a permis d'observer des effet fonctionnel de l'insuline en présence de la digoxine et de l'ouabaine sur l'enzyme après incubation à différents temps (60 min et 24 h).

L'insuline de manière dose-dépendante peut contrebalancer la production de phosphate inorganique dans le test de l'activité enzymatique (Fiske & Subbarow) en présence de la digoxine, de même la mesure de l'activité par luminométrie (test à la luciférase) montre qu'en présence d'insuline en co-traitement avec la digoxine, sur la Na,K-ATPase, la concentration en ATP diminue, cela témoigne d'une activité de l'enzyme. Ces données sont en faveur d'une part, d'une interaction direct entre l'insuline et la Na,K-ATPase purifiée et, d'autre part, d'une levé de l'inhibition induite par la digoxine. Les données de cytométrie en flux (FACS) ont montrés que la digoxine (10^{-6} M) avait un effet pro-apoptotique sur les cellules MODE-K et les cardiomyocytes (de rats adultes), et que cet effet pouvait être prévenu par de l'insuline à la dose de 1,75 mg/ml. Cette amélioration est observée uniquement en présence de la digoxine et pas d'ouabaine. L'étude en RPS (BIACORE®) a révélé une interaction directe, spécifique de l'insuline avec la Na,K-ATPase. Le western blot a révélé une diminution de l'immuno-réactivité de l'enzyme à la présence d'insuline seul, témoignant d'une interaction directe entre l'insuline et la Na,K-ATPase. L'immunomarquage réalisé sur les cardiomyocytes de rats nouveau-nés au moyen d'anticorps anti-sous-unité $\alpha 1$ et anti-sous-unité $\beta 1$ de la Na,K-

ATPase a objectivé une augmentation de l'immunoréactivité de la sous-unité $\alpha 1$ en présence d'insuline (10^{-3} mg/ml) plus digoxine (10^{-6} M) *versus* en présence de digoxine seule (10^{-6} M), ceci principalement au temps T 24h.

L'insuline pourrait ainsi interagir directement avec la pompe Na,K-ATPase en levant l'inhibition provoquée par la digoxine. Cet effet direct de l'insuline pourrait être lié à une interaction préférentielle avec la sous-unité $\beta 1$ de la Na,K-ATPase, cela, mérite toutefois de plus ample investigation.

1. Travail en soumission dans PNAS (2009)

Les résultats obtenus sont en cours de soumission dans la revue *PNAS*. L'article est présenté ci-dessous

Classification : biological sciences, pharmacology

Insulin interacts directly with Na⁺/K⁺ ATPase that participates probably in prevention of digoxin intoxication.

Oubaassine R^{1,3}, Weckering M⁴, Kessler L^{1,3}, Pinget M^{1,3}, Roegel JC⁴, and Eftekhari P^{2,4}

¹) CEED, bld René Leriche, F-67033 Strasbourg Cedex 2,

²) CNRS UPR 9021, Laboratory of Immunology and Therapeutic Chemistry, 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg Cedex,

³) Centre Hospitalier Universitaire, F-67098 Strasbourg Cedex,

⁴) NewTHERA, 6 rue principale, F-68127 Niederentzen.

Corresponding author : Pierre Eftekhari
NewTHERA,
Bld René Leriche
BP 30029
F-67033 Strasbourg Cedex2
peftekhari@newthera.com
Tel: +33 388 162002
Fax: +33 388 126770

Abstract

The cardio-protective effect of insulin on digoxin intoxication *in vivo* prompted us to study whether insulin could interact directly with Na,K-ATPase. We studied the effects of digoxin, ouabain and insulin on Na,K-ATPase activity, conformation and immunoreactivity. We looked also for their effects on cell viability using flow cytometry techniques. Finally, the interaction of digoxin and insulin with Na,K-ATPase was also investigated using surface plasmon resonance (SPR)

Digoxin inhibited Na,K-ATPase activity while insulin had no proper effect but decreased the inhibitory effect of digoxin. Western blot analysis showed that insulin (10^{-3} mg/ml) alone decreased not yet significantly Na,K-ATPase α_1 subunit immunoreactivity (IR) but neither digoxin nor ouabain. Insulin (10^{-3} mg/ml) alone decreased in the same manner as digoxin and ouabain Na,K-ATPase β_1 subunit IRs while co-incubation with digoxin and insulin increased β_1 subunit IRs. But co-incubation with ouabain and insulin decreased subunit IRs in a comparable manner as ouabain or insulin alone. SPR experiments performed on the isolated enzyme, confirmed a direct interaction of digoxin and insulin with Na,K-ATPase. Insulin (10^{-1} , 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-11} mg/ml) could also alter the effect of digoxin (10^{-6} M) on neonatal cardiomyocytes. In adult rat cardiomyocytes cultures, insulin (1.75 to 0.8 mg/ml) could protect cardiomyocytes from digoxin (10^{-6} M) effects on cell viability. On the contrary, ouabain at the dose of 10^{-6} M had no significant effect neither on neonatal nor adult rat cardiomyocytes. Finally, in immunohistological studies, neonatal cardiomyocytes treated with digoxin, ouabain or insulin decreased significantly the enzyme's IRs. Co-incubation with digoxin and insulin restored subnormal Na,K-ATPase subunits' IRs. This was not the case when cell were co-treated with ouabain plus insulin. All these data point towards the particularity of Na,K-ATPase in different organs as well as at different ages and raise important issues about elaboration of new therapeutics for digoxin cardio-toxicity in particular and cardiac diseases in general

The Na,K-ATPase is an ubiquitous cation pump transmembrane enzyme that plays a key role in maintaining cellular homeostasis (1,2,3,4). For instance, it is responsible for the well-established observation that cells contain high concentrations of potassium ions but low concentrations of sodium ions. It is an heterodimeric enzyme composed of two subunits (α and β) (5,6) with a catalytically active α subunit with a molecular mass of 97-116 kDa, and a glycosylated β subunit with a molecular mass of 35-55 kDa (7-9); in addition there may be a small γ peptide (7-11 kDa) with modulatory function (10,11). Na,K-ATPase transports three Na^+ out of the cell and two K^+ into the cell by using energy derived from hydrolysis of ATP (12). During each cycle one ATP is cleaved (13). The resulting cation gradient participates in Na/Ca exchange, Ca^{2+} -ATPase activity and Ca^{2+} -channel activity. Thus Na,K-ATPase participates in the tuning of cellular Ca^{2+} level and is coupled to critical physiological functions (15-18).

Inhibition of the Na,K-ATPase resulting in an increase of intracellular Ca^{2+} is commonly held to underlie inotropy but also cardiac arrhythmia (19-21). Such effects are well known to be produced by cardiac glycosides (for example digoxin and ouabain) (22,23), drugs which are widely used in the treatment of congestive heart failure and certain forms of arrhythmias (24,25). However, cardiac glycosides have a narrow margin of safety between therapeutic and toxic doses (26).

Many hormones regulate Na,K-ATPase activity. It is the case, for instance, of insulin which is well known to stimulate Na,K-ATPase activity (27-30) via translocation of Na,K-ATPase from an intracellular storage to the cell surface and increase of intracellular Na^+ (31,32); insulin increases the intracellular Na^+ through stimulation of Na^+ channels, Na^+/H^+ exchanger and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter. Other mechanisms leading to stimulation of the Na,K-ATPase by insulin are increase Na^+ sensitivity, biosynthesis and/or phosphorylation (33). For the latter, it has been shown that protein kinase A (PKA) and C (PKC) may have a role in the insulin-mediated activation of Na,K-ATPase (34-36).

Furthermore, insulin has also an inotropic effect (37-39). Its administration at high dose in combination with a glucose infusion (to maintain a hyperinsulinaemia/euglycemia) has been proposed as an adjunctive approach in the management of overdose of calcium channel antagonist and beta-blocking poisoning (40-42). Up to now there is no evidence on direct interaction of insulin with Na,K-ATPase.

Recently, we observed a case of digoxin and insulin self-poisoning without cardiac repercussion (43). Thereafter, in a rat model, we observed glucose-insulin infusion in pre and post-treatment to delay cardiac arrhythmia/failure occurrence and increase survival after an acute digoxin poisoning (44). These cardioprotective effects of insulin could be related to a common action on Na,K-ATPase.

In order to better understand the mechanism of action of insulin in presence of digoxin, we studied the effects of digoxin, ouabain and insulin on Na,K-ATPase activity, conformation and expression using Western blot and immunocytochemistry techniques. We also have studied their interaction with Na,K-ATPase using surface plasmon resonance (SPR) and looked for their effects on cell viability using flow cytometry techniques (FACS).

Results

Na,K-ATPase activity

Activity of purified Na,K-ATPase from pig brain could be inhibited with digoxin as assessed by ATP luminescence assay (10^{-6} M ; figure 1) (and Fiske and Subbarow method (10^{-12} ~ 10^{-3} M) ; résultats complémentaires figure 33). Insulin (10^{-3} mg/ml) had no effect on purified Na,K-ATPase activity but could blunt (10^{-6} M) the enzyme inhibition by digoxin (Figure 1).

Na,K-ATPase subunits' immunoreactivities using Western blotting

Na,K-ATPase α_1 subunit immunoreactivity did not change (20 μ g/well) with either digoxin (10^{-6} M) or ouabain (10^{-6} M) pre-incubation. In contrast, insulin (10^{-3} mg/ml) pre-incubation resulted in a decrease, not yet significantly in α_1 subunit immunoreactivity. This suggests a direct interaction between insulin and Na,K-ATPase α_1 subunit (figure 2 A & B).

Pre-incubation with digoxin (10^{-6} M) resulted in a decrease of Na,K-ATPase β_1 subunit immunoreactivity. The latter was not observed in presence of insulin (10^{-3} mg/ml). Interestingly, while insulin (10^{-3} mg/ml) alone decreased in the same manner as digoxin and ouabain Na,K-ATPase β_1 subunit immunoreactivity, it failed to counter act the inhibitory effect of ouabain (10^{-6} M). Taken together one would speculate on the direct interaction of insulin with either or both Na,K-ATPase subunits.

SPR study of insulin and digoxin interaction with Na,K-ATPase

Using Biacore we could capture Na,K-ATPase either through α_1 or β_1 subunit using specific antibodies. Digoxin could bind to Na,K-ATPase (KA/KD $2.01 \times 10^8 / 4.98 \times 10^{-9}$) only when it

was captured through anti- α_1 antibodies (table1, figure 4). Insulin could bind purified Na,K-ATPase captured either through α_1 or β_1 subunits, but with a higher affinity with the latter (KA/KD of $9.21 \times 10^5 / 1.09 \times 10^{-6}$ M, and $8.09 \times 10^{11} / 1.24 \times 10^{-12}$ M, respectively; table 1, figure 6 and 7). Insulin appeared to bind to the enzyme in an all or non manner. This might be due to a saturated response because of too high doses. In these experiments, digoxin and insulin concentrations were chosen based on their effects on enzyme activity using the Fiske and Subarrow method. Thus, further experiments would be required to find an optimal insulin concentration range for which a clear dose response effect would be observed.

Table1: Biacore kinetic values for digoxin and insulin binding to Na,K-ATPase captured either with anti- α_1 or β_1 subunits antibodies.

Antibody/Drug	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)
Anti- α_1 /Digoxin	$1,32 \times 10^6$	$6,60 \times 10^{-3}$	65,1	$2,01 \times 10^8$	$4,98 \times 10^{-9}$
Anti- β_1 /Insulin	$4,28 \times 10^9$	$5,30 \times 10^{-3}$	79,3	$8,09 \times 10^{11}$	$1,24 \times 10^{-12}$
Anti- α_1 /Insulin	$9,61 \times 10^3$	0,0104	44,1	$9,21 \times 10^5$	$1,09 \times 10^{-6}$

Cell viability studies using $DIOC_6$ / FACS analysis

Digoxin altered both neonatal (Figure 8a) and adult (Figure 8b) rat cardiomyocytes viability. In neonatal rat cardiomyocytes, digoxin at 10^{-6} M ameliorated cell viability as compared to the control. In presence of 10^{-1} mg/ml of insulin, it decreased cell viability. In presence of 10^{-6} and 10^{-11} mg/ml of insulin, it improved cell viability. The optimal beneficial effect of digoxin/insulin co-treatment was with at 10^{-11} mg/ml of insulin (Figure 8a).

In adult cardiomyocytes, digoxin at 10^{-6} M induced cell death. In presence of insulin (0.1, 0.87 and 1.75 mg/ml), it improved cell viability. The optimal beneficial effect of digoxin/insulin co-treatment was with 1.75 mg/ml of insulin (Figure 8b).

Ouabain at 10^{-6} M did alter neither neonatal (Figure 8c) nor adult (Figure 8d) rat cardiomyocytes viability. In neonatal cardiocytes, co- treatment with ouabain 10^{-6} M and insulin (either 0.1, 0.87 or 1.75 mg/ml) did not significantly alter cell viability (Figure 7c).

Unexpectedly, in adult rat cardiomyocytes, co- treatment with ouabain 10^{-6} M and insulin (either 0.1, 0.87 or 1.75 mg/ml) did decreased cell viability. Here, no clear dose response was observed (Figure 8d).

Immunocytochemistry

Pretreatment of neonatal rat cardiomyocytes with either 10^{-6} M of digoxin or 10^{-3} mg/ml of insulin decreased Na,K-ATPase α_1 and β_1 subunits immunoreactivities. This was observed already after 1 h of incubation. However, these effects differed to some extent over time. Treatment of cells with digoxin decreased both α_1 (yellow) and β_1 (green) subunits immunoreactivities after 1 and 24h compared to basal signal. When cardiomyocytes were co-treated with digoxin (10^{-6} M) and insulin 10^{-3} mg/ml, Na,K-ATPase α_1 and β_1 subunits immunoreactivities blossomed after 24 h as compared with digoxin and insulin alone. No comparable “antagonism” was observed when cells were co-treated with ouabain and insulin (Figure 9).

Discussion

The Na,K-ATPase is formed of two non-covalently linked subunits, one α -subunit, which contains the binding sites for ATP, Na^+ and K^+ ; and one β -subunit that is required for the proper membrane insertion of the α -subunit. Rodent heart expresses α_1 and α_2 as well as β_1 and β_2 subunits (45).

Cardiac Na,K-ATPase is involved in excitation–contraction coupling through Na^+ balance against Ca^{2+} (46). The heart of heterozygous mice lacking α_1 -subunits are hypocontractile. The heart of heterozygous mice lacking α_2 -subunits are hypercontractile (47). The Na,K-ATPase β_2 homozygous knockout mice have enlarged ventricle but no reduction in Na,K-ATPase activity (48).

The enzyme's α_1 -subunit is the pharmacological receptor for cardiac glycosides such as digoxin (49). Digoxin is a selective inhibitor for Na,K-ATPase that is used for treatment of congestive heart failure and certain arrhythmias. In absence of medical control, the risk of digoxin intoxication is important. Recently, we observed a case of digoxin and insulin self-poisoning without cardiac repercussion (43). Thereafter, in a rat model, we observed glucose-insulin infusion in pre and post-treatment to delay cardiac arrhythmia/failure occurrence and increase survival after an acute digoxin poisoning (44). Therefore, we sought to test for a direct interaction of digoxin with the Na,K-ATPase.

In this study, we have on one hand used pig purified Na,K-ATPase to study the direct interaction of digoxin, ouabain and insulin with the Na,K-ATPase. Thereafter, we explored these interactions at the cellular level using both neonatal and adult rat cardiomyocytes primary cultures, and a rat enterocyte cell line (MODE-K) (complementary results figures 35 and 36). Digoxin was observed to bind directly Na,K-ATPase in accordance with previous reports. Insulin upon its binding directly Na,K-ATPase could alter the latter. When the enzyme was captured with the α_1 -subunit, digoxin could bind the enzyme with rather high affinity. The latter was also true with insulin. On the contrary, when the enzyme was captured from β_1 subunit no interaction between digoxin and the enzyme could be observed. This could partially be due to the importance of β_1 subunit as adhesion molecule both in cell membrane and as gap junction (50) that would upon its binding to the specific anti- β_1 -antibody induce conformational changes on the rest of Na,K-ATPase subunit preventing digoxin to bind the enzyme. Another plausible explanation would be that the interaction of digoxin with the enzyme is ATP dependent. The latter would be necessary for its interaction with the enzyme α_1 subunit (51-53). The SPR assay buffer was in absence of the ATP. This would suggest that digoxin would be able to bind Na,K-ATPase β_1 -subunit in absence of ATP. There is an enormous body of literature on the cardiac glycosides structure/activity relationship highlighting their heterogeneous binding mechanisms to cardiac Na,K-ATPase (54-56).

Insulin was observed to bind likely to both Na,K-ATPase α_1 and β_1 subunits. Whether there is a preference for one of the subunits remains elusive. This interaction with Na,K-ATPase was independent of ATP. Western blot analyses (in absence of ATP) confirmed these SPR results. Digoxin, ouabain and insulin could decrease Na,K-ATPase β_1 -subunit immunoreactivity. Co-incubation of digoxin and insulin resulted in subnormal β_1 -subunit immunoreactivity. Neither digoxin nor ouabain changed α_1 -subunit immunoreactivity while insulin decreased the latter alone as well as in co-incubation with digoxin or ouabain.

Discrepancies between digoxin and ouabain were also observed in cell viability experiments using FACS technology. Both neonatal and adult rat cardiomyocytes were sensitive to digoxin but not ouabain. In neonatal cardiomyocytes, digoxin at 10^{-6} M improved cell viability. This is in line with already published reports underlining the lack of digoxin and ouabain toxicity in myocardium of neonatal rat (57). Co-treatment with 10^{-6} M digoxin and the highest dose of insulin (10^{-1} mg/ml) was toxic. On the contrary, digoxin 10^{-6} M with 10^{-6} and 10^{-11} mg/ml insulin improved cell viability. In adult rat cardiomyocytes, the same dose of digoxin (10^{-6} M) induced cell death and only high doses of insulin (0.1, 0.85 and 1.75 mg/ml) prevented this effect. Ouabain has no toxic effect both in neonatal and adult rat

cardiomyocytes. This could be due to a protective effect of ouabain. In fact, ouabain prevents starved or stressed cells from autophagy and death (58). Cardiomyocytes 24 h before experiments were harvested mechanically and transferred to treated FACS tubes in order to prevent cell adherence which puts the cells under biochemical and physical stress. This might also be due to different binding sites, one with high affinity competing with digoxin to bind Na,K-ATPase and one with low affinity with allosteric binding properties inhibiting in addition the enzyme activity. This has already been shown with ouabain binding with different affinities to different sites of Na,K-ATPase pump (57).

In adult cardiomyocytes, digoxin, but not insulin decreased α_1 and β_1 -subunits immunoreactivities 1h after incubation. Co-incubation with digoxin and insulin restored the latter but probably only due to insulin functional effect. In contrast co-incubation of cells with digoxin and insulin Na,K-ATPase α_1 -subunit immunoreactivity blossomed after 24 h as compared with digoxin and insulin alone. While the changes of signal after 1h might indicate changes in α_1 and β_1 -subunits immunoreactivities, the blossoming signal detected in particular for α_1 -subunit might involve protein turnover. Interestingly, the effect of coincubation with digoxin and insulin was mainly on Na,K-ATPase α_1 -subunit immunoreactivity. This could be on one hand due the methodology. We are using indirect immune-read out i.e. the protein expression is evaluated indirectly with a specific antibody. The quality of signal is somehow dependent on the nature and physico-chemical properties of the antibody. Overall, β_1 -subunit immune-detection was weak. Another plausible explanation would be the presence of ATP, which would improve the interaction of cardiac glycosides with the enzyme α_1 -subunit. Denatured insulin failed to prevent the effect of digoxin. It had neither any effect on cells treated with ouabain.

One of the major issues of this work is the differences in doses used and the lack of dose response relationships. These could be explained by the fact that Na,K-ATPase conformation and expression differ between brain and heart. While the direct interactions between digoxin, ouabain and insulin with Na,K-ATPase were studied on purified enzyme from pig brain, the physiological studies were performed on rat cardiomyocytes. Another important point to consider is also the difference in “maturity” of Na,K-ATPase regarding cardiac glycoside sensitivity between neonatal and adult cardiomyocytes. Another important point is that the working doses from initially were determined based on Na,K-ATPase activity experiments, which has later shown to be a rather insufficient approach and has needed to be corrected for each single experiment.

Taken together, the present results confirmed the binding of cardiac glycosides to Na,K-ATPase and, for the first time, showed a direct binding of insulin to Na,K-ATPase. Insulin could hinder or prevent the effects of digoxin (and vice versa) but not of ouabain. Whether insulin could bind preferentially β_1 -subunit remained elusive. Digoxin, ouabain and insulin bind all to the enzyme yet not onto the same binding side. All these data appear of particular interest for elaboration of new therapeutics for digoxin cardio-toxicity in particular and cardiac diseases in general

Methods

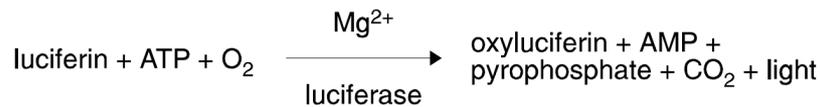
Adult male (250-300 g body weight) and neonate (2-3 day old) Wistar rats were purchased from Centre d'élevage Depré (Saint Doulchard, France). They were housed in CEED animal care facilities with controlled photoperiod (12 h light / 12 h darkness, light on from 07:00 to 19:00) and temperature (23-25°C) with free access to water and food. All animals received human care in compliance with the Recommendation from the Guiding Principles in the Care and Use of Laboratory Animals. All procedures and materials prepared from animals were performed in accordance with institutional policies and guidelines.

Drugs and reagents

Lyophilized, purified (single band electrophoretically) ouabain-sensitive Na,K-ATPase from membrane fractions of porcine cerebral cortex. Digoxin, ouabain, insulin from bovine pancreas and trypsin were purchased from Sigma Aldrich Chimie. Antibodies against Na,K-ATPase α_1 (mouse monoclonal, clone C-464.6) and β_1 (mouse monoclonal, clone 1-464.8) subunits were purchased from Millipore. Antibodies against actin α -smooth muscle (mouse monoclonal, clone A4) were purchased from Sigma-Aldrich Chimie. Collagenase IV and DNase were purchased from Roche diagnostics.

Na,K-ATPase activity assay

Na,K-ATPase activity is determined using a bioluminescence assay. This assay uses recombinant firefly luciferase and its substrate D-luciferin for quantitative determination of ATP. It is based on ATP requirement for luciferase to produce light (emission maximum ~560 nm at pH 7.8) through the reaction:



The activity of the Na,K-ATPase is studied with a luminometer (luciferase test) following the consumption of ATP by the isolated enzyme from porcine cortex. Digoxin was dissolved in water and methanol (80% / 20%) at concentrations 10^{-6} M. Different concentration of bovine brain Na,K-ATPase enzyme was incubated either alone or with digoxin solvent, digoxin 10^{-6} M, insulin 10^{-3} mg/ml or both digoxin and insulin together in luminescence microtitre plate. The reaction was read after 5min of incubation at room temperature.

To verify, whether the interaction of digoxin with the enzyme is reversible a second set of experiment were performed. Different concentrations of digoxin $10^{-3} \sim 10^{-12}$ M were incubated with the fixed concentration of purified Na,K-ATPase (10^{-3} M) in absence or presence of insulin (10^{-3} mg/ml). After 5 min incubation at room temperature 50 μ l of each mixture from each assay tube was isolated kept at -20°C . The rest was dialysed against TBS over night at 4°C . The day after enzyme's activity was measured using the same method as above.

Na,K-ATPase subunits' immunoreactivities using Western blotting

Twenty μg of whole pig brain purified Na,K-ATPase were incubated either with digoxin (10^{-6} M), ouabain (10^{-6} M), insulin (10^{-3} mg/ml), digoxin (10^{-6} M) plus insulin (10^{-3} mg/ml) or ouabain (10^{-6} M) plus insulin (10^{-3} mg/ml) for 1h in Tris buffer saline (pH 7.4) at 37°C . Na,K-ATPase α and β -subunits were separated in absence of sodium dodecyl sulphate (SDS) and 2- β mercaptoethanol on 10% polyacrylamide gel according to the procedure of Laemmli, 1970; Moseley *et al.*, 1996 and Tamiya *et al.*, 2003 (60-62). After running, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane at 100 V for 60 minutes in transfer buffer containing Tris-HCl (25 mM), glycine (192 mM) and 20% methanol at pH 8.3. Thereafter, the membranes were incubated in Tris saline buffer solution supplemented with 0.1% Tween 20 (TBS-T) overnight at 4°C . Non specific binding was blocked by incubating the membrane 1h at room temperature with a solution containing 3% fat free milk in TBS-T with blocking buffer. The membrane were thereafter incubated for 1 h at room temperature either with mouse monoclonal antibody specific to the Na,K-ATPase α_1 -subunit (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or mouse monoclonal anti- β_1 -subunit antibodies at room temperature for 1h. Then, the membrane was

washed 3 times in TBS-Tween 20 for 10 min and incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies rat anti-mouse gamma specific IgG (dilution 1:10 000) for 1 h at room temperature on and end over end blender. The membranes were then washed with TBS-T 4 times for 5 min. A Biorad bio-imager chemiluminescence apparatus was used to reveal the bound antibodies by incubating the PVDF membrane with enhanced chemiluminescence substrates (ECL, Millipore) for 1 min.

SPR binding analysis of molecular interaction (Biacore)

For surface Plasmon resonance (SPR) experiments, we used a BIACORE 3000 device. A CM5 chip was prepared as follow; flow cell 1 (FC1) was activated with NHS/EDC and saturated with ethanol amine. The FC1 served as control. FC2 was activated with NHS/EDC in order to immobilise streptavidin. On to FC3 using same covalent interaction Na,K-ATPase (Sigma Aldrich Chimie) was immobilised. The FC4 was left as such, as a supplementary control. Thereafter, biotinylated anti-rabbit or anti-mouse antibodies were injected only onto FC1 and FC2. After performing a complete wash cycle the latter was followed by a specific anti- α_1 -subunit monoclonal antibody or specific anti- β_1 -subunit rabbit polyclonal antibodies. After a full wash without regeneration, whole pig brain purified Na,K-ATPase was injected over the flow cells. After a complete wash again without regeneration cycle, either digoxin (10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} M) or insulin (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} mg/ml) were injected over the flow cells. The specific binding was calculated from the addition of digoxin or insulin interaction signal onto the specific signal obtained upon the capture of Na,K-ATPase by either anti- α_1 -subunit or anti- β_1 -subunit antibodies.

Cell culture and Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of cell viability

Neonatal and adult cardiomyocytes were isolated and cultured as previously reported by Chlopčíková *et al.*, 2001 (65) ; Poindexter *et al.*, 2001 (66) ; Poindexter *et al.*, 2006 (67) and Stephen *et al.*, 2009 (68). Briefly, the hearts were removed and harvested ventricles were washed in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) and glucose 1%. Thereafter, each heart was finely minced and enzymatically digested to obtain single dissociated cells. The enzymatic solution buffer was composed of DMEM, collagenase (type IV) (0.02%), trypsin (0.2%) and DNase (0.002%). The digestion was followed by repetitive pipetting for 10 min and incubated for 15 min at 37°C. The digestion was stopped by diluting the mixture with

DMEM supplemented with DNase (0.002%) and glucose 1%. Cells were mixed by repetitive pipetting for 15 min, and centrifuged thereafter at 900 g for 10 Min. Supernatant was isolated and diluted in 15 ml of in complete culture medium composed of DMEM with L-glutamine supplemented with 4.5 g/L glucose, 1% pyruvate Na, 10% foetal calf serum (FCS) and antibiotics (penicillin G 100 U/ml, streptomycin 0.1 mg/ml, GIBCO). The cells were thereafter dispatched at the density of 1×10^6 cells/ well in a 24 well plate and incubated at 37°C under atmosphere of 5% CO₂ for 72h. Myocytes began beating spontaneously after 3–4 days.

Four or 5 days after incubation, the cells were incubated with digoxin 10^{-6} M or ouabain 10^{-6} M associated or not with different concentration of insulin (1.75 to 10^{-11} mg/ml) in a final volume of 1 ml complete DMEM. Cells incubated in the absence of drugs but with the same volume of corresponding solvents served as controls. The cells were thereafter incubated for 24 h at 37°C and humidified atmosphere with 5% CO₂. At the end of the incubation period, cells were washed with PBS and stained with DiOC₆. Briefly, following washing with PBS, the cells were centrifuged and incubated in PBS with 40 nM DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide). The suspension was incubated in the dark at 37°C for 15 minutes before flow cytometric analysis. The changes in the inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cells fluorescence signals were determined immediately after staining using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). The analysis was performed using CELLQUEST software (Becton Dickinson). For each sample, 10.000 cells were acquired and analyzed.

Immunocytochemistry

Neonatal cardiomyocytes were isolated and cultured as above mentioned for FACS experiments. Cardiomyocytes were treated between day 4th and 5th for 60 min or 24 h either with digoxin 10^{-6} M, ouabain 10^{-6} M, insulin 10^{-3} mg/ml, co-treatment with insulin 10^{-3} mg/ml + digoxin 10^{-6} M or co-treatment insulin 10^{-3} mg/ml + ouabain 10^{-6} M. The control wells were treated either with corresponding vehicles.

At the end of the incubation period, the cells were fixed in 4% formaldehyde solution in PBS for 15 minutes at 37°C, washed 2 times with PBS, before permeabilizing with PBS containing 0.1% Triton[®] X-100 for 5 min at room temperature. Cells were thereafter blocked for 30 minutes in PBS supplemented with 10% normal goat serum (NGS). Meanwhile anti- α smooth muscle, and anti Na,K-ATPase antibodies against α_1 and β_1 subunits were labelled with Zenon

Labeling complex (Molecular Probes) according to manufacturer recommendation. In the Zenon Labeling complex, monoclonal anti-Na,K-ATPase α 1 subunit was conjugated to the Zenon Alexa fluor 488 mouse IgG₁ labeling reagent, monoclonal anti-Na,K-ATPase β 1 was conjugated to the Zenon Alexa fluor 555 mouse IgG_{2a} labeling reagent and monoclonal anti-actin α -smooth muscle was conjugated to the Zenon Alexa fluor 647 mouse IgG_{2a} labeling reagent. Cells were thereafter incubated with fluorescence labelled primary antibodies in PBS containing 10% NGS at dilution 1:1000. DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) was added to stain the nuclei (1:200) for 60 min at room temperature. Images were taken using the 488-, 555-, and 647 nm laser lines of a Leica confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems) equipped with a 63x oil immersion objective. Apotome images were taken using Axiovision software (Zeiss). Microscope equipped with Apotome for optical sectioning and 63x Plan Aplanachromat oil immersion objectives. Images were prepared for presentation with Adobe Photoshop.

Acknowledgment

This work has been financed by CEED and NewTHERA. We thank in particular Miss Akkiz Bekel and Miss Marjorie Weckering (NewTHERA) for their technical assistance.

Legend to the figures

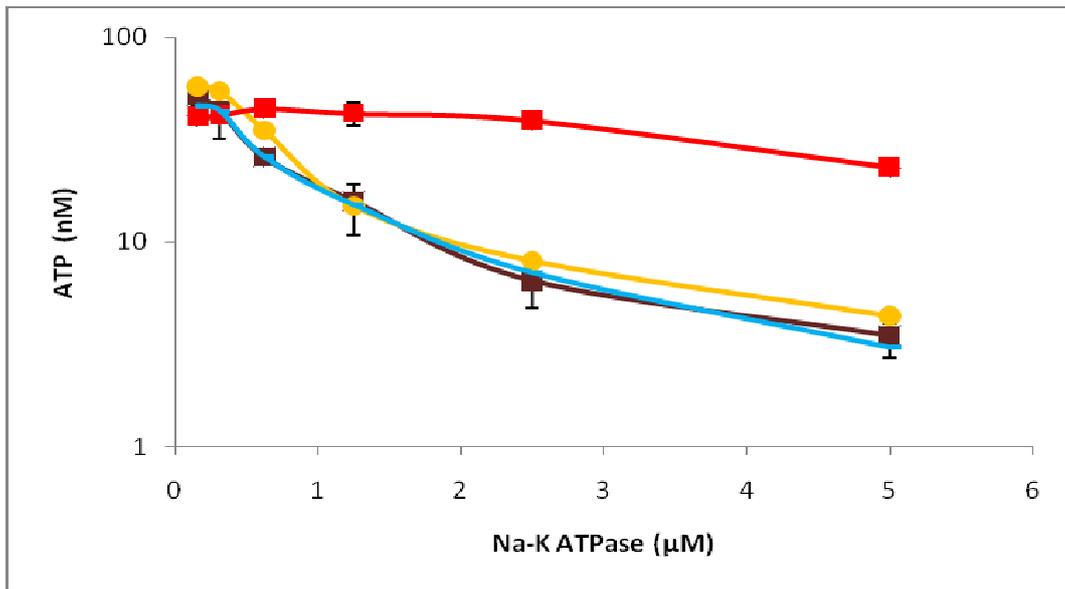


Figure 1a: As assessed in an ATP luminescence assay, Na,K-ATPase activity (purple) is inhibited with digoxin (10^{-6} M) (red). Insulin (10^{-3} mg/ml) blunts this inhibitory effect of digoxin (blue). Insulin at this concentration did not modified Na,K-ATPase activity (ochre). These results are the mean of three independent experiments.

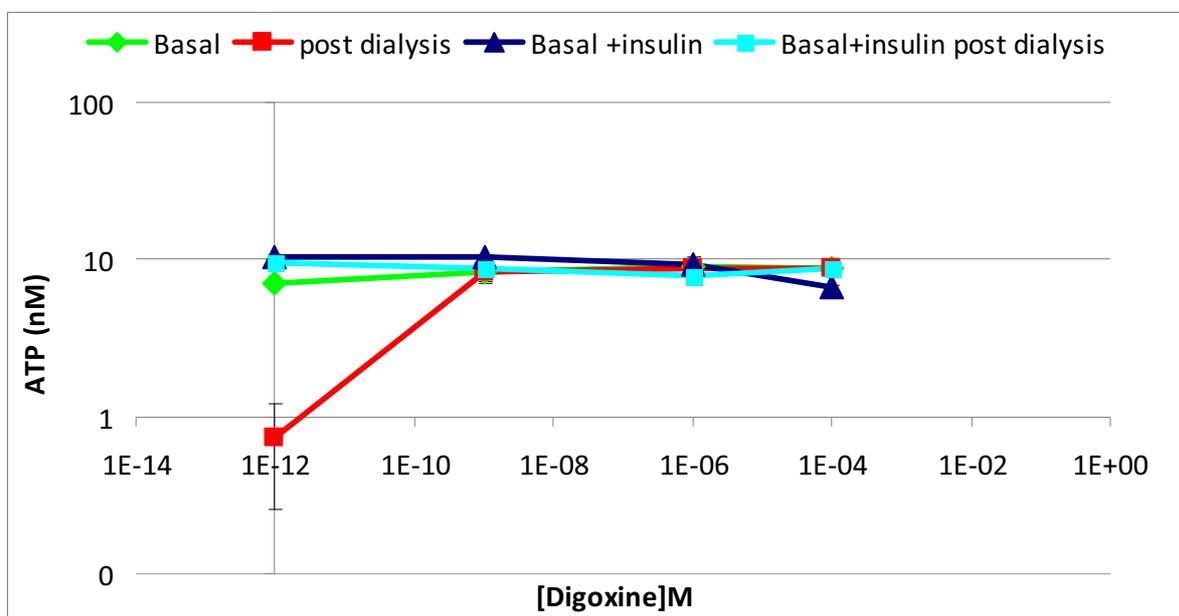
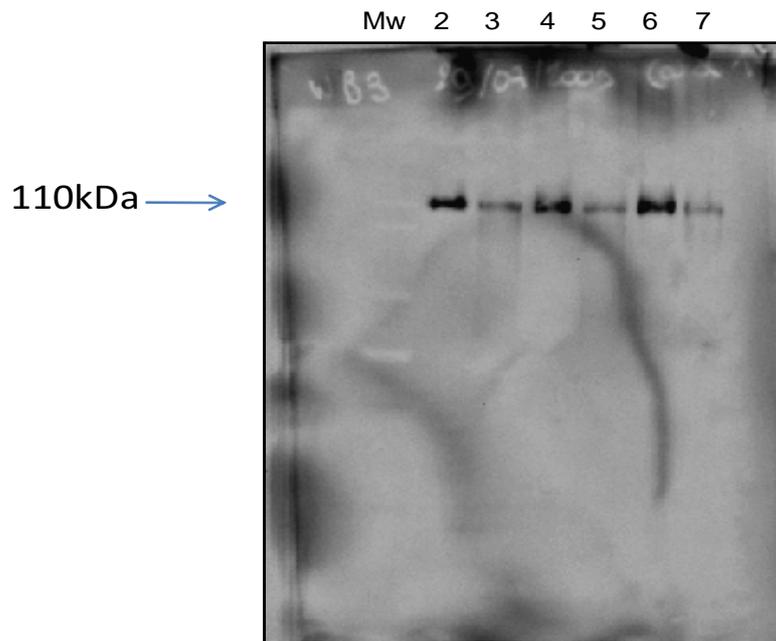


Figure 1b: As assessed in an ATP luminescence assay, Na,K-ATPase activity (10^{-3} M) is inhibited with digoxin (10^{-3} ~ 10^{-12} M). This interaction is reversible only at lowest dose of digoxine. In presence of insulin (10^{-3} mg/ml) the inhibitory effect of digoxine after dialysis remained unchanged. These results are the mean of three independent experiments.

A



B

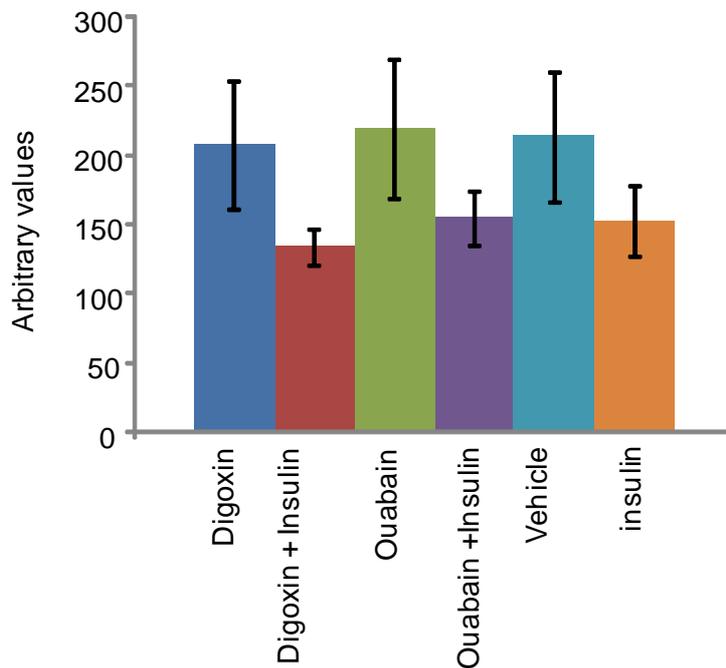
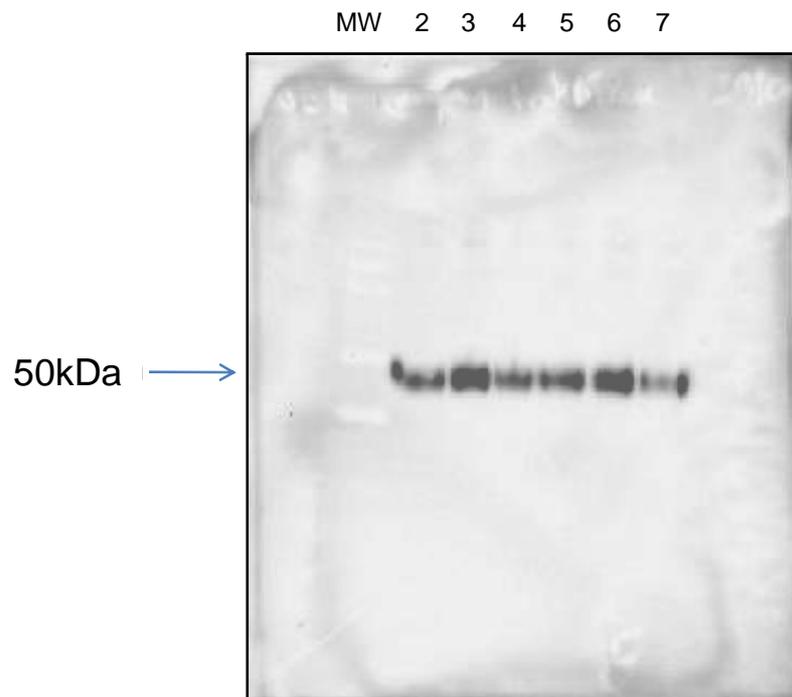


Figure 2 A & B: Digoxin at 10^{-6} M concentration does not change Na,K-ATPase α_1 -subunit's immunoreactivity (lane 2). So is also the case for ouabain (10^{-6} M; lane 4). Insulin (10^{-3} mg/ml) decreases α_1 -subunit immunoreactivity but is not significantly (MW = molecular marker). These results are the mean of three independent experiments.

A



B

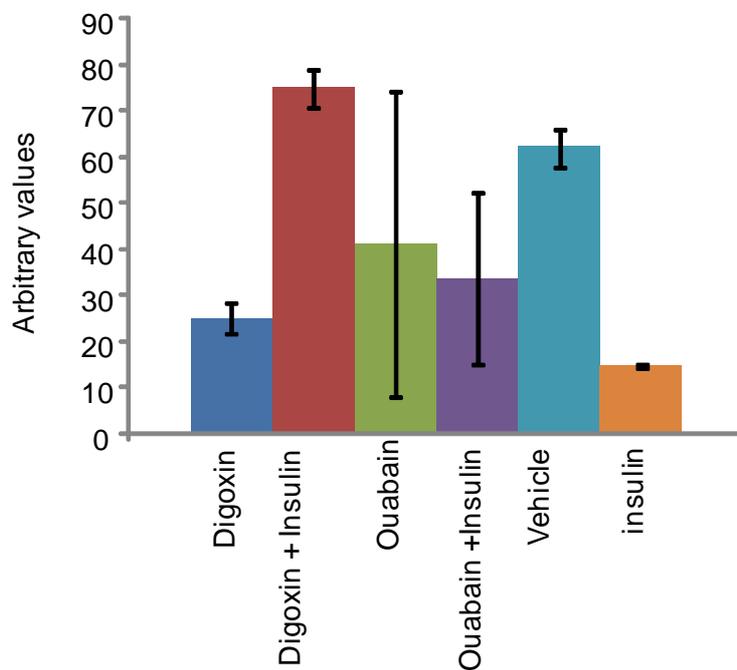


Figure 3 A & B: Digoxin (10^{-6} M) and, to a lesser extent, ouabain (10^{-6} M) decrease Na,K-ATPase β_1 -subunit's immunoreactivity. Insulin (10^{-3} mg/ml) blunts the effect of digoxin (and vice versa) but not the one induced by ouabain. Insulin alone decreases β_1 -subunit's immunoreactivity arguing for a direct interaction with Na,K-ATPase. These results are the mean of three independent experiments (MW = molecular marker).

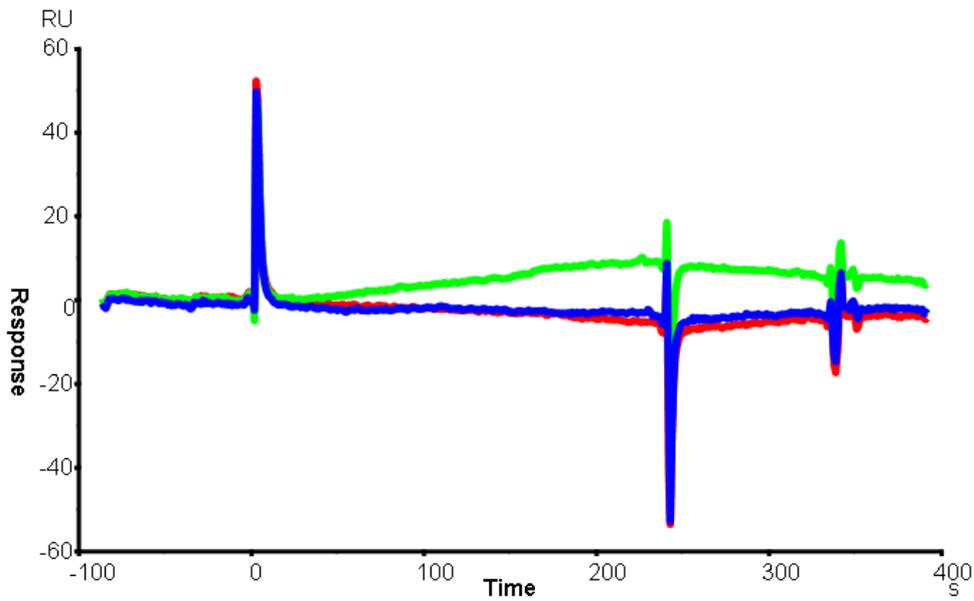


Figure 4: Interaction of digoxin with Na,K-ATPase captured through α_1 -subunit (BIACORE). Digoxin binds the Na,K-ATPase directly (10^{-6} M, green; 10^{-7} M, blue; 10^{-8} M, red).

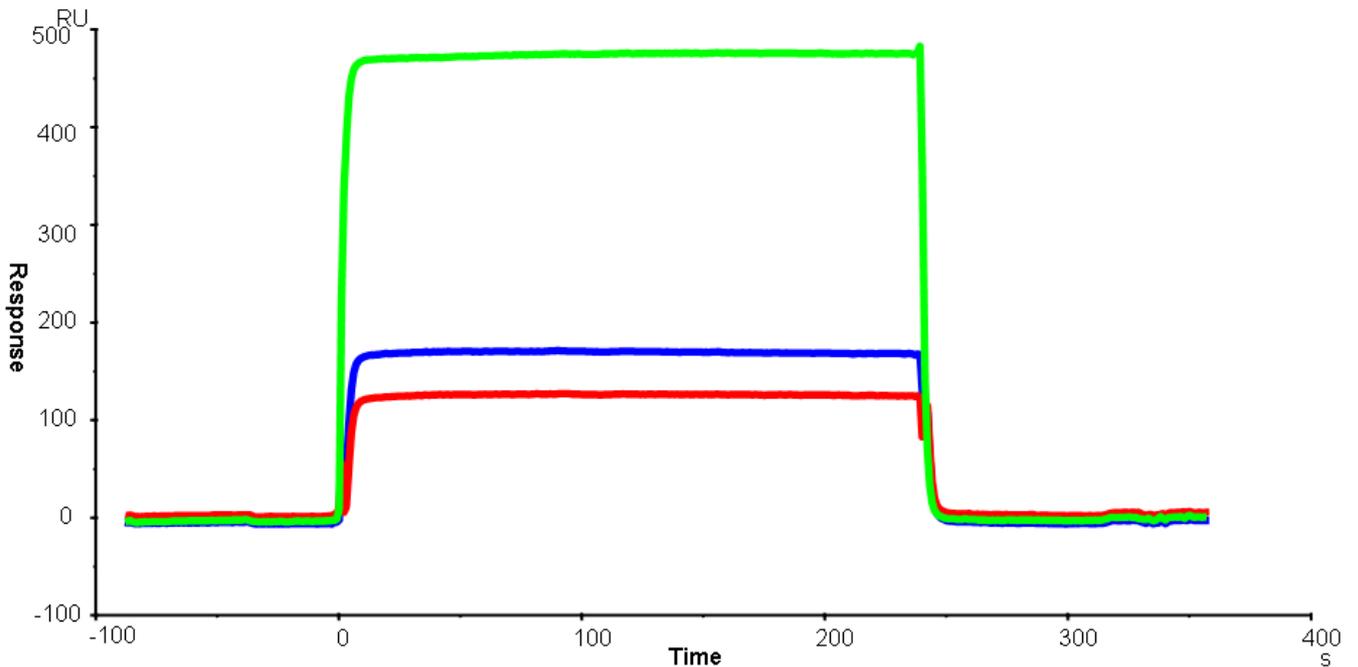


Figure 5: Interaction of digoxin with Na,K-ATPase captured through β_1 -subunit (BIACORE). Digoxin binds the Na,K-ATPase directly (10^{-6} M, green; 10^{-7} M, blue; 10^{-8} M, red).

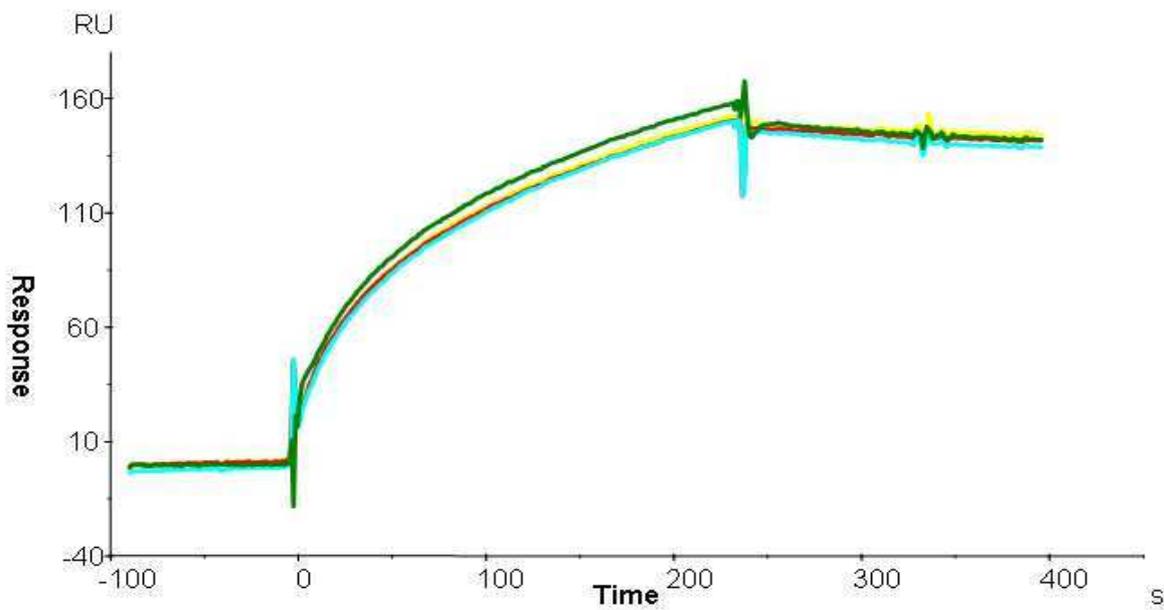


Figure 6: Interaction of insulin with Na,K-ATPase captured through α_1 -subunit (BIAcore). Insulin binds Na,K-ATPase directly, although there is no clear dose response relationship at the doses tested (10^{-3} mg/ml, green; 10^{-4} mg/ml, yellow; 10^{-5} mg/ml, sky blue; 10^{-6} mg/ml, red).

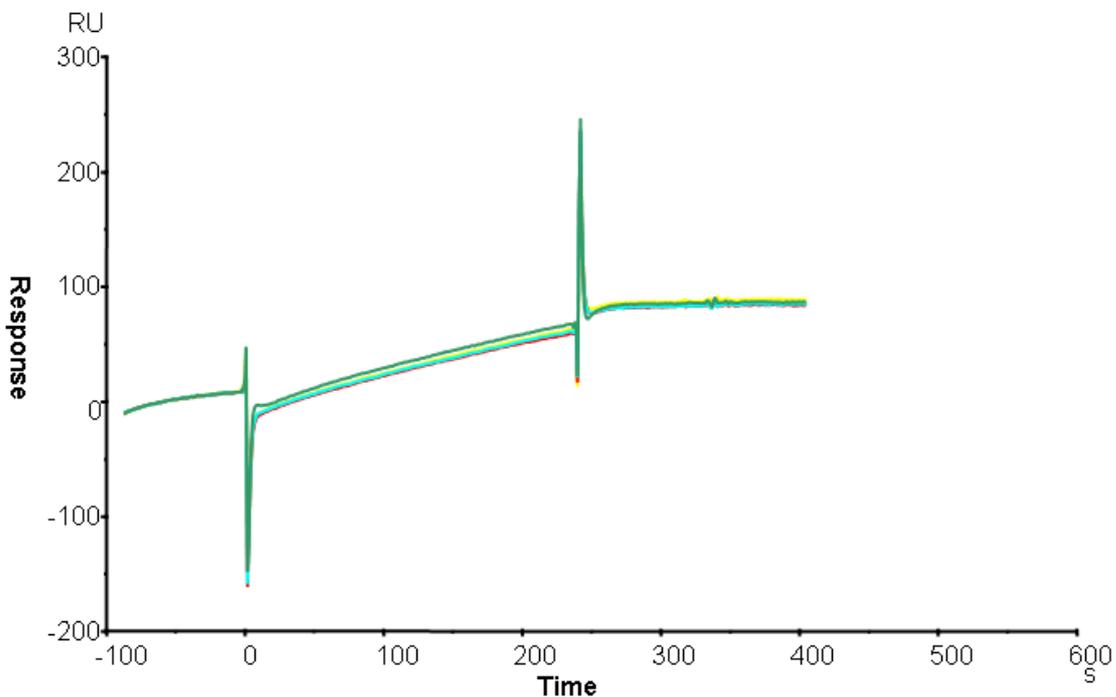


Figure 7: Interaction of insulin with Na,K-ATPase captured through β_1 -subunit (BIAcore). Insulin binds Na,K-ATPase with less affinity compared when captured through α_1 -subunit. There is no clear dose response relationship at the doses tested (10^{-3} mg/ml, green; 10^{-4} mg/ml, yellow; 10^{-5} mg/ml, sky blue; 10^{-6} mg/ml, red).

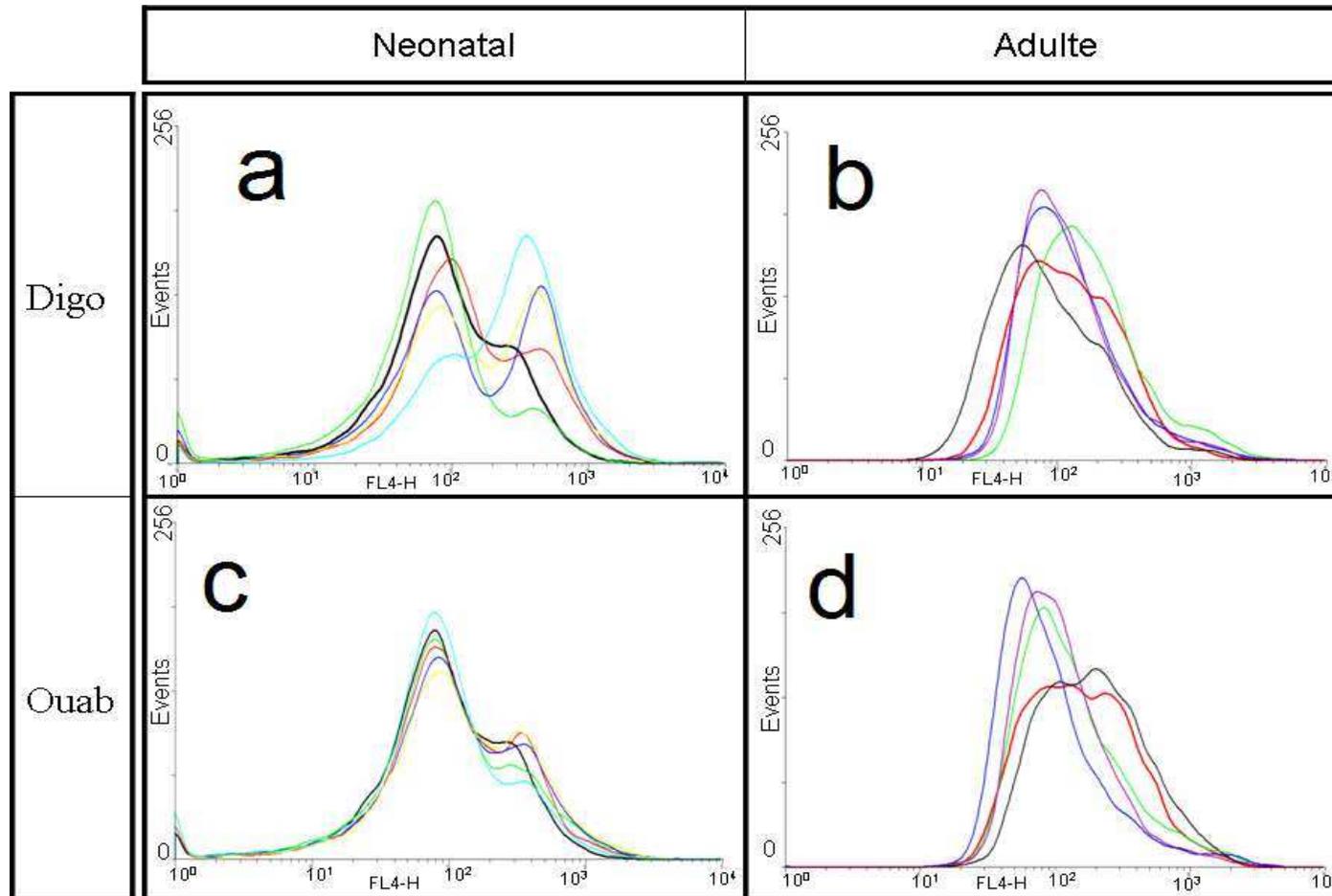


Figure 8 a, b, c, d: Cell viability studies using DIOC₆ on rat cardiomyocytes. Digoxin altered both neonatal (a) and adult (b) rat cardiomyocytes viability (Black = control, Red = digoxin 10⁻⁶ M). These effects could be prevented in adult rat cardiomyocytes with the highest doses of insulin which were used (a: Green = digoxin 10⁻⁶ M + insulin 10⁻¹ mg/ml, Blue = digoxin 10⁻⁶ M + insulin 10⁻⁶ mg/ml, Yellow = digoxin 10⁻⁶ M + insulin 10⁻⁷ mg/ml, Sky blue = digoxin 10⁻⁶ M + insulin 10⁻¹¹ mg/ml) (b: Red = control, Black = digoxin 10⁻⁶ M, Green = digoxin 10⁻⁶ M + insulin 1.75 mg/ml, Blue = digoxin 10⁻⁶ M + insulin 0.87 mg/ml, Purple = digoxin 10⁻⁶ M + insulin 0.1 mg/ml). Ouabain did not altered significantly neonatal (Black = control, Red = ouabain 10⁻⁶ M) (c) and adult (d) rat cardiomyocytes viability (c: Black = control, Red = ouabain 10⁻⁶ M, Green = ouabain 10⁻⁶ M + insulin 10⁻¹ mg/ml, Blue = ouabain 10⁻⁶ M + insulin 10⁻⁶ mg/ml, Yellow = ouabain 10⁻⁶ M + insulin 10⁻⁷ mg/ml, Sky blue = ouabain 10⁻⁶ M + insulin 10⁻¹¹ mg/ml) (d: Red = control, Black = ouabain 10⁻⁶ M, Green = ouabain 10⁻⁶ M + insulin 1.75 mg/ml, Blue = ouabain 10⁻⁶ M + insulin 0.87 mg/ml, Purple = ouabain 10⁻⁶ M + insulin 0.1 mg/ml). These results are representative of two independent experiments. 110

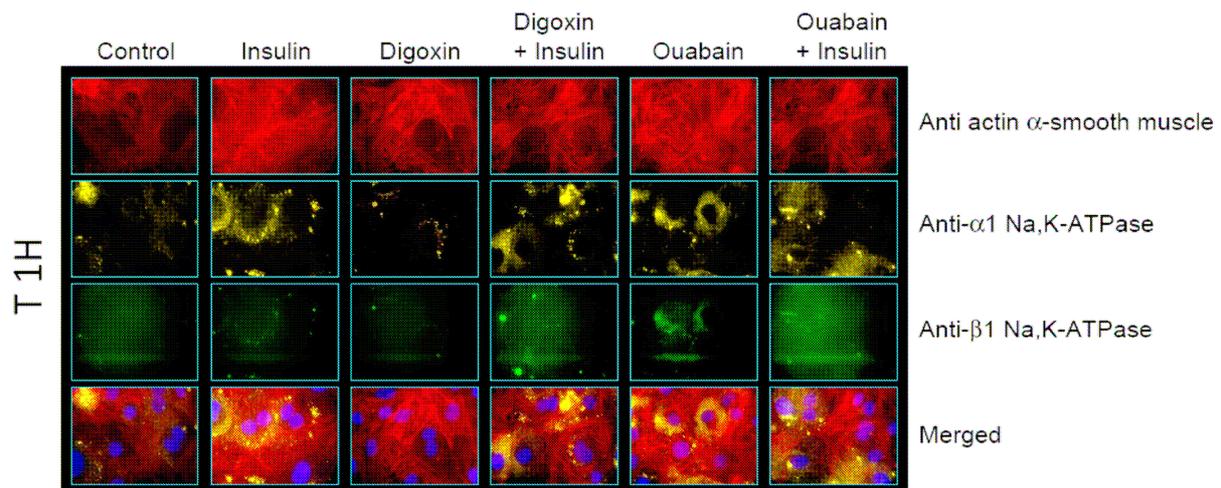


Figure 9 A

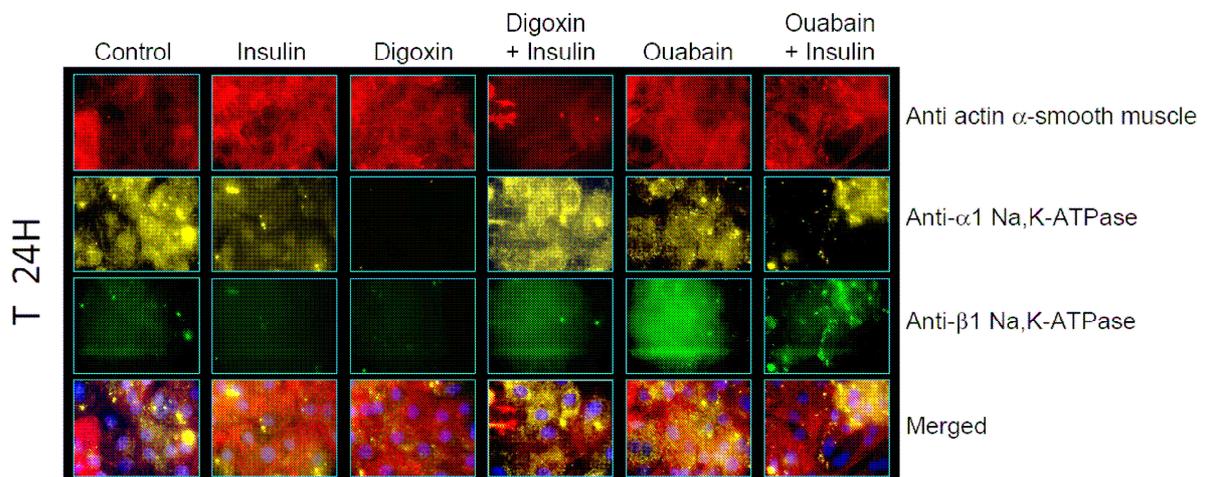


Figure 9 B

Figure 9: Changes in Na,K-ATPase α_1 (yellow) and β_1 (green) subunits as well as α -smooth muscle (red) expression after 1h (Figure 9A) and 24 h (Figure 9B) treatment with either 10^{-3} mg/ml of insulin (Ins), 10^{-6} M of digoxin (Dig), 10^{-6} M of ouabain (Ouab), co-treatment with insulin 10^{-3} mg/ml plus digoxin $1e^{-6}$ M (Ins+Dig) or co-treatment with insulin 10^{-3} mg/ml plus ouabain 10^{-6} M (Ins+Ouab). Note the changes in Na,K-ATPase immunoreactivity after treatment with insulin, digoxin and ouabain.

Figure 9 A: Insulin increased and digoxin decreased Na,K-ATPase α_1 (yellow) subunits immunoreactivity, though immunoreactivity with ouabain remained unchanged compared to the control. Furthermore, co-treatment with insulin and digoxin resulted in same Na,K-ATPase α_1 (yellow) subunit immunoreactivities compared with insulin and digoxin alone, however co-treatment with insulin and ouabain did not induced the same modification.

Figure 9 B: While both insulin and digoxin decreased Na,K-ATPase α_1 (yellow) subunits immunoreactivity immunoreactivity with ouabain remained unchanged compared to the control. Furthermore, co-treatment with insulin and digoxin resulted in increased Na,K-ATPase α_1 (yellow) subunit immunoreactivities compared with insulin and digoxin alone, however co-treatment with insulin and ouabain did not induced the same modification.

References :

1. Béguin P, Wang X, Firsov D, Puoti A, Claeys D, Horisberger JD, Geering K (1997) The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J* 16:4250-4260.
2. Djemli-Shipkolye A, Gallice P, Coste T, Jannot MF, Tsimaratos M, Raccah D, Vague P (2000) The effects ex vivo and in vitro of insulin and C-peptide on Na/K adenosine triphosphatase activity in red blood cell membranes of type 1 diabetic patients. *Metabolism* 49:868-872.
3. Skou JC (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 23:394-401.
4. Clarke RJ, Apell HJ, Kong BY (2007) Allosteric effect of ATP on Na(+),K(+)-ATPase conformational kinetics. *Biochemistry* 46:7034-44.
5. Jaisser F, Jaunin P, Geering K, Rossier BC, Horisberger JD (1994) Modulation of the Na,K-pump function by beta subunit isoforms. *J Gen Physiol* 103:605-623.
6. Lingrel JB, Kuntzweiler T (1994) Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 269:19659-19662.
7. Lingrel JB, Orłowski J, Shull MM, Price EM (1990) Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 38:37-89.
8. Lingrel JB, van Huysse JV, O'Brien W, Jewell-Motz E, Askew R, Schultheis P (1994) Structural-function studies of Na, K-ATPase. *Kidney Int* 45:32-39.
9. Sharabani-Yosef O, Bak A, Langzam L, Lui Z, Nir U, Braiman L, Sweadner KJ, Sampson SR (1999) Rat skeletal muscle in culture expresses the alpha1 but not the alpha2 protein subunit isoform of the Na⁺/K⁺ pump. *J Cell Physiol* 180:236-44.
10. Hansen O (2001) The alpha1 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase in rat soleus and extensor digitorum longus. *Acta Physiol Scand* 173:335-341.
11. Scheiner-Bobis G (2002) The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur J Biochem* 269:2424-2433.
12. Horvat A, Momić T, Petrović S, Nikezić G, Demajo M (2006) Selective inhibition of brain Na,K-ATPase by drugs. *Physiol Res* 55:325-338.
13. Gao J, Mathias RT, Cohen IS, Baldo GJ (1995) Two functionally different Na/K pumps in cardiac ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 106:995-1030
14. Gao J, Wymore RS, Wang Y, Gaudette GR, Krukenkamp IB, Cohen IS, Mathias RT (2002) Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. *J Gen Physiol* 119:297-312
15. Stahl WL, Harris WE (1986) Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. *Adv Neurol* 44: 681-693.

16. Askari FK, Hitomi Y, Xie Z (1997) Augmentation of ouabain sensitivity of rat liver Na/K-ATPase by in vivo adenovirus-mediated expression of the Na/K-ATPase alpha2 subunit. *FEBS Lett* 405:5-10.
17. Clausen T, Nielsen OB, Harrison AP, Flatman JA, Overgaard K (1998) The Na⁺,K⁺ pump and muscle excitability. *Acta Physiol Scand* 162:183-190.
18. Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127-1155.
19. Liu J, Tian J, Haas M, Shapiro JJ, Askari A, Xie Z (2000) Ouabain interaction with cardiac Na,K-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *J Biol Chem* 275:27838-27844.
20. Bers DM (2001) Cardiac inotropy and Ca mismanagement. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*, edited by DM Bers, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, pp. 273-331.
21. Rocchetti M, Besana A, Mostacciolo G, Ferrari P, Micheletti R, Zaza A (2003) Diverse toxicity associated with cardiac Na⁺/K⁺ pump inhibition: evaluation of electrophysiological mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 305:765-771.
22. Eichhorn EJ, Gheorghide M (2002) Digoxin. *Prog Cardiovasc Dis* 44:251-266.
23. Karadeniz A, Aytakin I, Akgul Y (2008) Effects of acute and subacute digoxin intoxication on haematological parameters and serum CK and LDH activities in dogs. *Revue Méd Vét* 159: 96-100.
24. Thomas R, Gray P, Andrews J (1990) Digitalis: its mode of action, receptor, and structure-activity relationships. *Adv Drug Res* 19:311-562.
25. Dostanic I, Lorenz JN, Schultz Jel J, Grupp IL, Neumann JC, Wani MA, Lingrel JB (2003) The alpha2 isoform of Na,K-ATPase mediates ouabain-induced cardiac inotropy in mice. *J Biol Chem* 278:53026-53034.
26. Dawson A, Buckley N (2007) Digoxin. *Medicine* 35:613-614.
27. Rosić NK, Standaert ML, Pollet RJ (1985) The mechanism of insulin stimulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase transport activity in muscle. *J Biol Chem* 260:6206-6212.
28. Féraille E, Rousselot M, Rajerison R, Favre H (1995) Effect of insulin on Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in rat collecting duct. *J Physiol* 488:171-180.
29. Longo N, Scaglia F, Wang Y (2001) Insulin increases the turnover rate of Na⁺-K⁺-ATPase in human fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:912-919.
30. Sweeney G, Klip A (2001) Mechanisms and consequences of Na⁺,K⁺-pump regulation by insulin and leptin. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47:363-372.

31. Weil E, Sasson S, Gutman Y (1991) Mechanism of insulin-induced activation of Na(+)-K(+)-ATPase in isolated rat soleus muscle. *Am J Physiol* 261:224-230.
32. Düfer M, Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2009) Activation of the Na,K-ATPase by insulin and glucose as a putative negative feedback mechanism in pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch* 457:1351-1360.
33. Sweeney G, Klip A (1998) Regulation of the Na,K-ATPase by insulin: why and how? *Mol Cell Biochem* 182:121-133.
34. Sampson SR, Brodie C, Alboim SV (1994) Role of protein kinase C in insulin activation of the Na-K pump in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol* 266:751-758.
35. Therien AG, Blostein R (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:541-566.
36. Chibalin AV (2007) Regulation of the Na,K-ATPase: Special implications for cardiovascular complications of metabolic syndrome. *Pathophysiology* 14:153-158.
37. Kearney MT, Cowley AJ, Stubbs TA, Evans A, Macdonald IA (1998) Depressor action of insulin on skeletal muscle vasculature: a novel mechanism for postprandial hypotension in the elderly. *J Am Coll Cardiol* 31:209-216.
38. Ren J, Walsh MF, Hamaty M, Sowers JR, Brown RA (1999) Augmentation of the inotropic response to insulin in diabetic rat hearts. *Life Sci* 65:369-380.
39. Marques I, Gomes E, de Oliveira J (2003) Treatment of calcium channel blocker intoxication with insulin infusion: case report and literature review. *Resuscitation* 57:211-213.
40. DeWitt CR, Waksman JC (2004) Pharmacology, pathophysiology and management of calcium channel blocker and beta-blocker toxicity. *Toxicol Rev* 23:223-238.
41. Mégarbane B, Karyo S, Baud FJ (2004) The role of insulin and glucose (hyperinsulinaemia/euglycaemia) therapy in acute calcium channel antagonist and beta-blocker poisoning. *Toxicol Rev* 23:215-222.
42. Lheureux PE, Zahir S, Gris M, Derrey AS, Penaloza A (2006) Bench-to-bedside review: hyperinsulinaemia/euglycaemia therapy in the management of overdose of calcium-channel blockers. *Crit Care* 10:212.
43. Bilbault P, Castelain V, P Lutun, Meziani F, Harlay ML, Mathien C, Pynn S, Schneider F, Jaeger A (2005) Is digoxin poisoning improved by insulin?. *J Toxicol Clin Toxicol* 42: 222.
44. Oubaassine R, Bilbault P, Roegel JC, Alexandre E, Sigrist S, Lavaux T, Jaeger A, Pinget M, Kessler L (2006) Cardio protective effect of glucose-insulin infusion on acute digoxin toxicity in rat. *Toxicology* 224: 238-243.

45. McDonough AA, Velotta JB, Schwinger RH, Philipson KD, Farley RA (2002) The cardiac sodium pump: structure and function. *Basic Res Cardiol* 97:19-24.
46. Dostanic I, Schultz Jel J, Lorenz JN, Lingrel JB (2004) The alpha 1 isoform of Na,K-ATPase regulates cardiac contractility and functionally interacts and co-localizes with the Na/Ca exchanger in heart. *J Biol Chem* 279:54053-54061.
47. James PF, Grupp IL, Grupp G, Woo AL, Askew GR, Croyle ML, Walsh RA, Lingrel JB (1999) Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell* 3:555-563.
48. Magyar JP, Bartsch U, Wang ZQ, Howells N, Aguzzi A, Wagner EF, Schachner M (1994) Degeneration of neural cells in the central nervous system of mice deficient in the gene for the adhesion molecule on Glia, the beta 2 subunit of murine Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 127:835-845.
49. Neshar M, Shpolansky U, Rosen H, Lichtstein D (2007) The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci* 80: 2093-2107.
50. Rajasekaran SA, Rajasekaran A K (2009) Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. *Front Biosci* 14:2130-2148.
51. Matsui H, Schwartz, A (1967) ATP-dependent binding of H³-digoxin to a Na + K⁺-ATP-ase from cardiac muscle. *Fed Proc* 26:398.
52. Matsui H, Schwartz A (1968) Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the (Na⁺-K⁺)-dependent ATPase from cardiac tissue. *Biochim Biophys Acta* 151:655-663.
53. Schwartz A, Matsui H, Laughter AH (1968) Tritiated digoxin binding to (Na⁺ + K⁺)-activated adenosine triphosphatase: possible allosteric site. *Science* 160:323-325.
54. Fullerton DS, Yoshioka K, Rohrer DC, From AHL, Ahmed K (1980) A Crystallographic, Conformational Energy, and Biological Study of Actodigin (AY-22,241) and Its Genin. *Mol Pharmacol* 17:43-51.
55. Yoda A (1974) Association and dissociation rate constants of the complexes between various cardiac monoglycosides and Na, K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci* 242:598-616.
56. Paula S, Tabet MR, Ball WJ Jr (2005) Interactions between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: three-dimensional structure-activity relationship models for ligand binding to the E₂-Pi form of the enzyme versus activity inhibition. *Biochemistry* 44:498-510.
57. Kennedy RH, Seifen E (1989) Aging: ouabain-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake rate and responsiveness to digoxin in rat left atrial muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 248: 104-110.
58. Čolović M, Krstić D, Krinulović K, Momić T, Savić J, Vujačić A, Vasić V (2009) Na,K-ATPase : activity and inhibition. *Russ J Phys Chem* 83: 1602-1608.

59. Ogawa H, Shinoda T, Cornelius F, Toyoshima C (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13742-13747.
60. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 217:680-685.
61. Moseley AE, Dean WL, Delamere NA (1996) Isoforms of Na,K-ATPase in rat lens epithelium and fiber cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:1502-1508.
62. Tamiya S, Dean WL, Paterson CA, Delamere NA (2003) Regional distribution of Na,K-ATPase activity in porcine lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4395-4399.
63. Chlopčíková S, Psotová J, Míketová P (2001) Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 145:49-55.
64. Poindexter BJ, Smith JR, Buja LM, Bick RJ (2001) Calcium signaling mechanisms in dedifferentiated cardiac myocytes: comparison with neonatal and adult cardiomyocytes. *Cell Calcium* 30:373-382.
65. Poindexter BJ, Feng W, Dasgupta A, Bick RJ (2006) Oleandrin produces changes in intracellular calcium levels in isolated cardiomyocytes; a real-time fluorescence imaging study comparing adult to neonatal cardiomyocytes. *J Toxicol Environ Health* 70: 568-754
66. Stephen MJ, Poindexter BJ, Moolman JA, Sheikh-Hamad D, Bick RJ (2009) Do binucleate cardiomyocytes have a role in myocardial repair? Insights using isolated rodent myocytes and cell culture. *Open Cardiovasc Med J* 3:1-7.

2. Résultats complémentaires

Les résultats présentés ci-dessous sont des données issues des travaux préliminaires. Ils ont contribué à la démarche scientifique et ont aidé à la mise en place des modèles expérimentaux.

2.1. Effet de l'insuline sur l'activité de la Na,K-ATPase

Afin de mettre en évidence une action directe de l'insuline nous avons étudié l'activité de la Na,K-ATPase. Cette activité a été mesurée par la méthode du réactif de Fiske & Subbarow. Mais face à la difficulté de mise en évidence de résultats francs et significatifs avec cette méthode, nous avons décidé de ne pas les intégrer à l'article mais de les mettre en données complémentaires. Dans le papier en soumission, il y figure les données d'activités obtenues avec une méthode enzymatique utilisant la luciférase.

2.1.1. Matériels et méthodes

L'activité de la Na,K-ATPase est mesurée selon la méthode décrite par [Haddock et al., 1995 ; Pocas et al., 2003] consistant à doser le phosphate inorganique (Pi~) libéré après hydrolyse de l'ATP. Brièvement on prélève environ 5 U d'enzyme que l'on solubilise dans 1,0 mL d'une solution de Tris buffer (10 mM, pH 7,4 à 37°C) contenant 1mM d'EDTA. Un aliquote de cette solution ainsi préparé (soit 10 µL) est additionné à 80 µL de la solution tampon qui se compose de : Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM and KCl 15 mM. Après 15 min à 37°C, la réaction enzymatique est initiée par ajout de 10 µL de Tris-ATP (50mM). La réaction est arrêtée après 10 min par ajout de 100 µL d'acide trichloroacétique glacé, ce qui permet de provoquer une précipitation de la protéine qui est ensuite séparée du surnageant par centrifugation de 1200 g pendant 4 min. Le (Pi~) contenu dans le surnageant est dosé selon la technique de Stanton, 1968. Elle consiste à additionner à 120 µL du surnageant contenu dans un ependorf, 420 µL d'une solution contenant de l'acide de molybdate à 0,1 M et du H₂SO₄ à 1,2 M. On y ajoute 120 µL du réactif Fiske & Subbarow (Sigma Chemical Co., Poole, UK). Après 15 min d'incubation à température ambiante, le phosphate inorganique (Pi~) libéré lors de la réaction est dosé à une longueur d'onde de 660 nm au moyen d'un spectrophotomètre (Biotech Kineticalc software). La concentration en phosphate est déterminée par la réalisation d'une gamme étalon de phosphate de potassium (0,01 à 0,2 mM).

Plusieurs groupes ont été étudiés :

- le groupe 1, contenant seulement de la digoxine (concentrations : 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷ M) solubilisé dans un mélange eau/méthanol (80%, 20%),

- le groupe 2, contenant uniquement de l'insuline avec une gamme de concentration de 1 to 10^{-23} mg/ml,
- et le groupe 3, contenant le mélange à la fois de digoxine (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} M) et d'insuline (1 à 10^{-23} mg/ml).

La même méthode a été réalisée en remplaçant la digoxine par l'ouabaïne dans des conditions identiques. L'ensemble de ces produits a été dissout dans la solution tampon avant d'être ajouté à l'enzyme. Le groupe contrôle contient uniquement l'enzyme et exempt des molécules étudiées (insuline, digoxine, ouabaïne).

2.1.2. Résultats

L'activité de l'enzyme isolée, Na,K-ATPase est fonction de la quantité de molécules d'ATP (Adénosine Triphosphate) qu'elle consomme par hydrolyse obtenant ainsi deux produits de réaction de l'ADP (Adénosine Triphosphate) et du P_i (phosphate inorganique). Ce phosphate libéré est corrélé à l'activité de cette enzyme, d'où son dosage. La quantité de P_i libérée est quantifiée par mesure de l'absorbance qu'il produit en réaction avec le réactif de Fiske & Subbarow. Ainsi plus l'activité de la pompe est intense plus la production de P_i augmente et plus l'absorbance est élevée.

L'expérimentation du groupe 1 a permis de montrer l'existence d'un effet dose de la digoxine sur l'enzyme. Ainsi la concentration de 10^{-6} M semble être une concentration charnière. A cette valeur, l'activité de la pompe semble assez importante pour être dosée tout en restant sous le plateau d'activité maximale. Cela vient également confirmer le choix de cette concentration dans les expérimentations réalisées en cytométrie en flux.

L'étude du groupe 2, qui avait pour intérêt d'étudier l'effet de l'insuline seule sur l'activité de la pompe a montré l'existence d'une variation de l'activité de la Na,K-ATPase en présence ou non d'insuline sans pour toutefois observer un effet dose dépendant avec l'insuline.

L'étude de l'effet sur l'activité de la Na,K-ATPase lors de la combinaison des deux molécules à savoir, l'insuline et la digoxine aux différentes conditions décrites est représentée dans la figure 33. On observe notamment qu'en présence d'insuline il y a une augmentation de l'activité de cette pompe par rapport à l'échantillon sans insuline (présence uniquement de la digoxine). Cet effet stimulant de l'insuline semble diminuer l'inhibition de l'enzyme produite par la digoxine, notamment lorsque cette dernière est présente à une concentration de 10^{-6} M. Quant à l'insuline, son effet est maximal aux concentrations de 10^{-2} et 10^{-3} mg/ml.

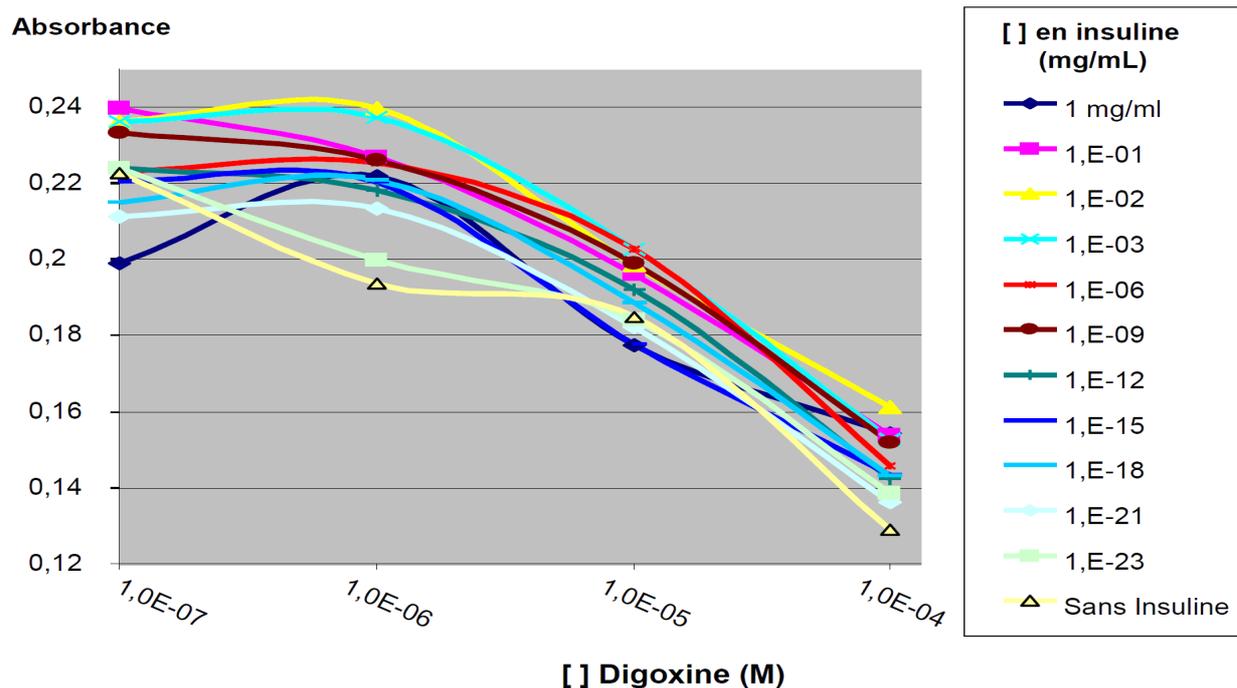


Figure 33 : Activité de la Na,K-ATPase en présence de digoxine en présence ou non d'insuline à différentes concentrations (n=10)

2.2. Effet de l'insuline face à l'intoxication à la digoxine sur des cellules MODE-K

2.2.1. Choix du modèle

Les cellules MODE-K, sont une lignée cellulaire entérocytaire de souris qui renferment dans leur membrane la pompe Na,K-ATPase. Etant une lignée cellulaire, elles possèdent l'avantage d'être plus facilement mises en culture. C'est d'ailleurs pour cette souplesse, à l'inverse d'une culture de cardiomyocyte, que nous avons commencé nos expérimentations par ce type cellulaire. C'est avec les MODE-K que nous avons mis au point notre protocole d'étude *in vitro* des effets de l'insuline face à une intoxication à la digoxine. C'est grâce à ce modèle que nous avons confirmé dans un premier temps l'effet bénéfique de l'insuline observé *in vivo* lors de la toxicité de la digoxine.

2.2.2. Résultats

L'effet de l'insuline sur les cellules MODE-K, en présence de la digoxine a été analysé par cytométrie en flux selon le même principe que celui utilisé pour les cardiomyocytes. Ces cellules ont été mises en culture dans un milieu classique (DMEM) supplémenté avec 1% d'antibiotique/antimycotique (ABAM, Gibco) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

L'expérimentation a consisté à soumettre des échantillons de ces cellules à différentes conditions pharmacologiques. Après la mise en culture et obtention d'un tapis cellulaire uniforme, les cellules MODE-K sont traitées par de la digoxine, de l'ouabaïne et de l'insuline selon différents schémas. L'objectif est d'évaluer l'impact d'une présence d'insuline sur ces cellules soumises à une agression par de la digoxine ou de l'ouabaïne. Le bénéfice de l'insuline est mesuré par la quantité de cellules échappant à l'apoptose. En effet, la digoxine et l'ouabaïne à concentrations toxiques vont être néfastes pour les cellules MODE-K, conduisant ces dernières vers l'apoptose cellulaire. Afin d'éviter que les concentrations utilisées en digoxine et en ouabaïne ne soit trop importantes et ne détruisent les cellules de manière irréversible, nous avons déterminé la concentration de ces molécules permettant d'avoir une action intermédiaire entre l'absence d'effet (contrôle) et un effet maximal (mort de toutes les cellules).

Les résultats obtenus (figure 34) dans la recherche de cette valeur avec la digoxine, ont permis de fixer à 10^{-6} M la concentration correspondant le mieux à nos critères. Cette valeur a également été utilisée pour l'ouabaïne afin de pouvoir faire un comparatif/contrôle entre l'effet de ces deux produits sur les cellules.

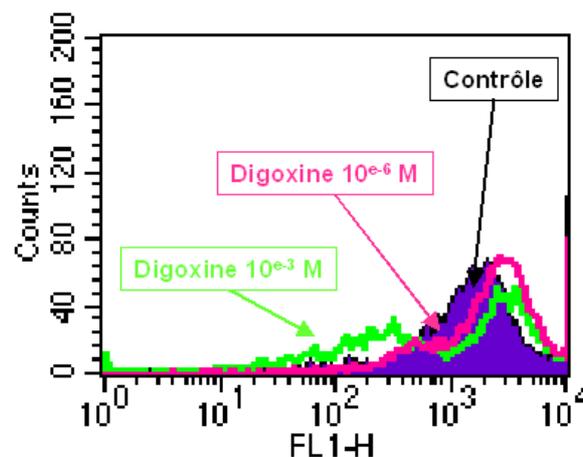


Figure 34 : Effet de la digoxine sur les cellules MODE-K
Résultats d'une expérience représentative de deux expériences.

Afin d'évaluer le bénéfice de l'insuline nous avons soumis les cellules MODE-K à de la digoxine (ou à l'ouabaïne) à une dose fixe de 10^{-6} M, puis nous y avons associé un traitement par l'insuline à différentes concentrations ($8,7 \times 10^{-4}$; 0,1 ; 0,87 et 1,75 mg/ml).

Pour chaque condition nous avons fait une mesure sur un échantillon de 10 000 cellules. Les résultats sont exprimés sous forme de graphique où les courbes représentent le nombre de cellules en fonction de leur l'intensité de fluorescence. Plus les courbes se décalent vers la

gauche plus les cellules entrent en apoptose et moins l'insuline a d'effet bénéfique. Inversement, un effet protecteur de l'insuline déplacera les courbes vers la droite du graphique.

Ainsi la figure 35, montre les résultats d'analyse d'un traitement des cellules MODE-K par de la digoxine et de l'insuline. On observe que lorsque les cellules sont traitées par de la digoxine (10^{-6} M) seule, la molécule exerce ces effets néfastes. En effet, les cellules entrent en apoptose ce qui est schématisée sur le graphique par un décalage de la courbe (rouge) vers la gauche par rapport à la courbe contrôle (noir). Par ailleurs, lorsqu'à cette concentration de 10^{-6} M de digoxine on associe une forte concentration d'insuline (1,75 mg/ml), on observe une protection de l'effet toxique de la digoxine. En effet nous observons un déplacement de la courbe (vert) vers la droite, ce qui suppose que l'insuline agit de manière bénéfique. On remarque également que cet effet de l'insuline est dose dépendant, en effet cette protection est observée de manière plus intense aux fortes concentrations alors qu'elle se minimise aux concentrations les plus faibles. Ainsi l'effet néfaste de la digoxine tend à s'amoinrir au fur et à mesure que la quantité d'insuline augmente.

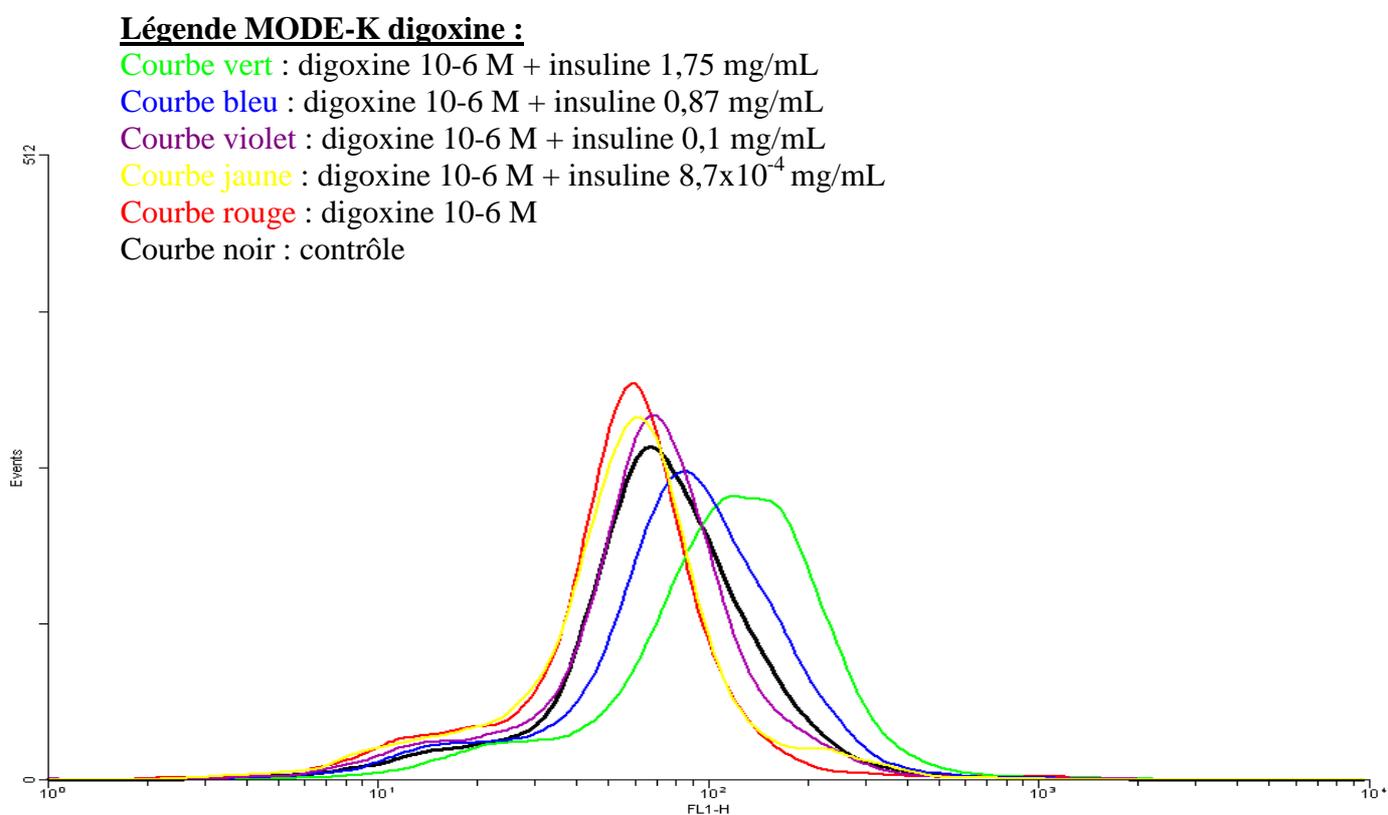


Figure 35 : Effet de l'insuline sur les cellules MODE-K en présence de la digoxine. Résultats d'une expérience représentative de deux expériences.

Concernant la figure 36, elle montre l'effet d'un traitement de l'insuline à différentes concentrations sur des cellules soumises à une concentration fixe de l'ouabaine (10^{-6} M). A l'inverse de l'expérimentation avec la digoxine, l'ouabaine n'induit pas d'apoptose précoce. Cet effet peut être dû au stress auquel les cellules ont été confrontées lors du prétraitement avec l'ouabaine. En effet l'ouabaine présente un effet protecteur lorsque les cellules se trouvent dans un état de stress physique [Čolović *et al.*, 2009]. Quant à l'effet bénéfique de l'insuline observé il est probablement dû aux multiples fonctions de l'insuline, sans un lien direct avec la pompe Na,K-ATPase.

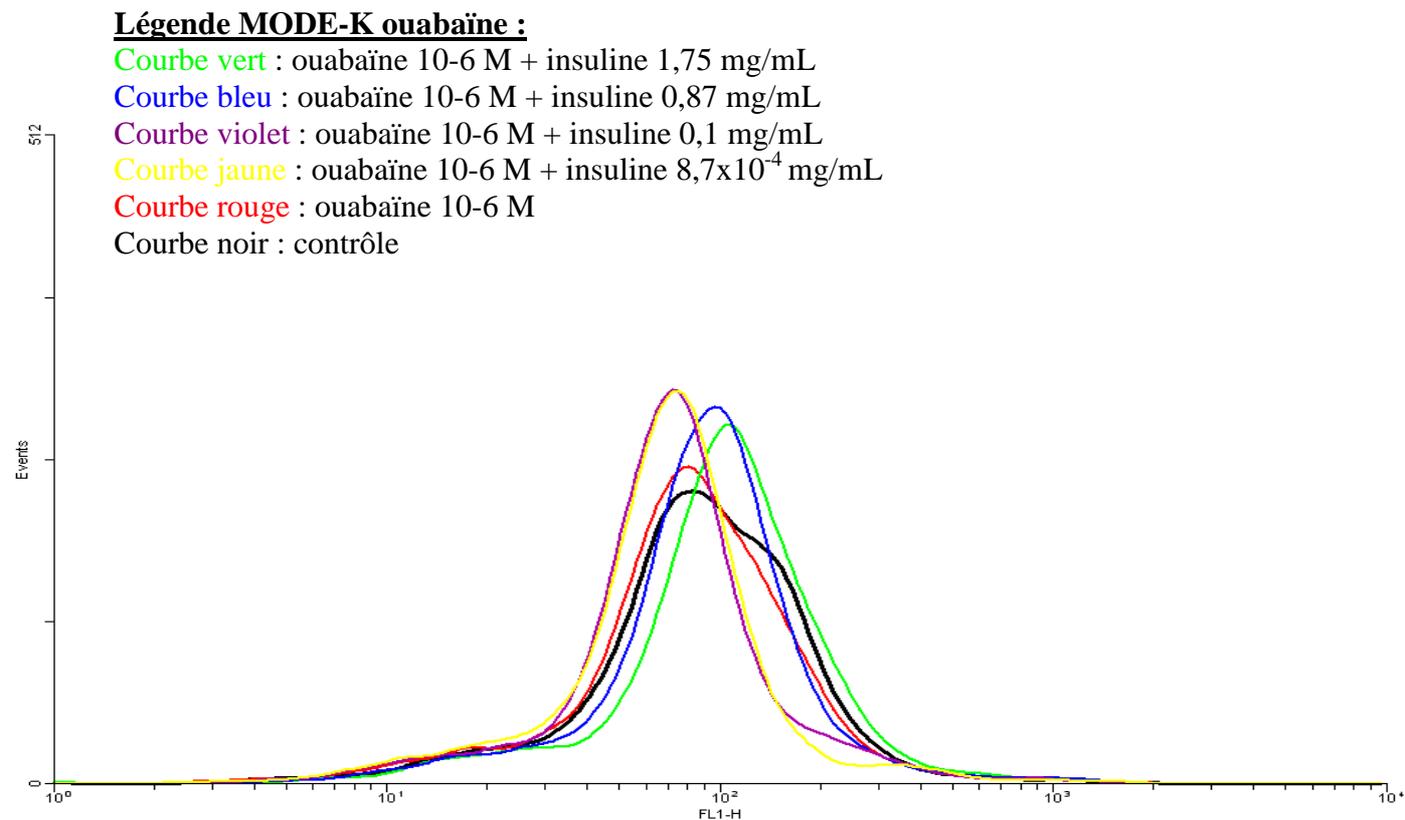


Figure 36 : Effet de l'insuline sur les cellules MODE-K en présence de l'ouabaine. Résultats d'une expérience représentative de deux expériences.

Ces données d'analyses de cytométrie en flux obtenues sur les cellules MODE-K, viennent confirmer nos précédents résultats obtenus dans notre étude *in vivo* réalisée chez les rats soumis à une intoxication aiguë à la digoxine pré et post-traités par une perfusion d'insuline-glucose. En effet, nous avons observé que lors de l'administration d'une forte concentration d'insuline (soit un état hyperinsulinique) l'effet toxique de la digoxine se réduit et tend à disparaître.

3. Discussion

Au cours de ces études *in vitro* nous avons rassemblé un certains nombres de données expérimentales qui seraient en faveur d'une interaction directe entre l'insuline et la pompe Na,K-ATPase. Cette action directe entre ces deux protéines semble être à l'origine des effets protecteurs de l'insuline face aux effets néfastes qu'exerce la digoxine lors de sa liaison à la Na,K-ATPase. Les expérimentations ont été réalisées à la fois *in vitro* sur l'enzyme isolée et *ex vivo* sur des cellules intégrées à leurs environnements cellulaires.

Le choix des modèles expérimentaux s'est précisé au fur et à mesure de l'avancé des travaux.

3.1. L'enzyme isolée

3.1.1. Choix du modèle

Face à la difficulté d'isoler l'activité spécifique de la Na,K-ATPase dans la cellule, nous avons décidé de faire nos expérimentations sur une source exempte de toute autres activités ATPasiques. Le modèle choisi a été la pompe Na,K-ATPase sous forme d'enzyme isolée et purifiée provenant de chez Sigma. Cet isolat a été utilisé pour les mesures d'activité (test au réactif de Fiske & Subbarow, test à la luciférase), mais aussi pour la mise en évidence des interactions directes entre l'insuline et l'enzyme (technique du BIACORE et western-blot). L'intérêt de cette formulation permet d'évaluer directement les mécanismes et les effets de l'insuline sur cette pompe, en excluant les effets fonctionnels liés à l'activité propre de l'insuline sur la cellule.

3.1.2. L'activité de la Na,K-ATPase

Concernant la mesure de l'activité de la Na,K-ATPase par la méthode du réactif de Fiske & Subbarow, elle n'a pas permis de conclure à une stimulation certaine de cette enzyme par l'insuline. En effet, les résultats obtenus sur la l'activité de la Na,K-ATPase lors de l'action de l'insuline aux concentrations de 10^{-1} à 10^{-3} mg/ml montrent une stimulation modérée qui reste néanmoins non significative. Cela peut certainement s'expliquer par la sensibilité de la méthode ou bien par le mode opératoire. Nous avons effectivement rencontré des difficultés quand à la solubilisation du lyophilisat de l'enzyme isolée acheté chez Sigma. Celle-ci formait très souvent des agrégats dans le produit de solubilisation utilisant la solution tampon. Devant cette difficulté, nous avons décidé d'abandonner la méthode colorimétrique de Fiske & Subbarow pour une technique enzymatique plus sensible utilisant la luciférase.

3.1.3. La résonance plasmon de surface

L'existence possible d'une interaction entre l'insuline et la pompe Na,K-ATPase est étudiée grâce au système BIACORE. Il analyse les interactions moléculaires par résonance plasmonique de surface (RPS), méthodologie originale de mesure d'interactions entre les molécules [Markey, 1999].

Le système BIACORE® permet de mesurer en temps réel, et sans marquage spécifique, les caractéristiques d'interaction entre deux molécules sur une surface biospécifique. Pour cela, une des molécules (le ligand) est immobilisée sur la surface "sensor" et l'autre (l'analyte) est injectée. Le principe (figure 37) de détection par RPS est basé sur la quantification des changements de l'indice de réfraction près de la surface liés à la variation de masse, à la surface du biocapteur, due à la formation et à la dissociation des complexes moléculaires [Fagerstam et al., 1992]. En effet, lorsqu'une lumière monochromatique et polarisée arrive à l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents, et que cette interface est recouverte d'une fine couche métallique, l'intensité de la lumière réfléchie est nettement réduite pour un angle d'incidence particulier : l'angle de résonance. Celui-ci varie notamment en fonction de l'indice de réfraction, donc en fonction de la masse des molécules situées au voisinage de la surface. Par conséquent, un suivi de l'angle de résonance en fonction du temps permet de suivre en temps réel l'association et la dissociation entre le ligand et l'analyte.

Le signal obtenu est enregistré : c'est un sensorgramme (Figure 38). Il est quantifié en unités de résonance (RU). Une variation de 1000 RU correspond à un déplacement de l'angle de 0.1° et équivaut à une fixation de 1 ng de protéine par mm^2 [Rich et al., 2001; Nguyen et al., 2007].

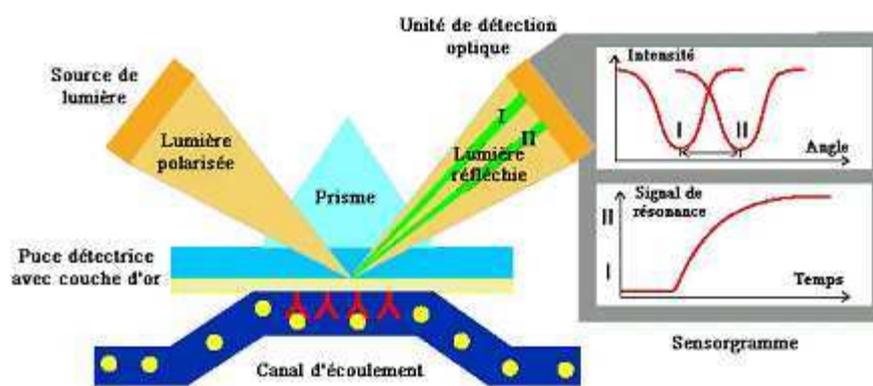


Figure 37 : Schéma explicatif du principe de détection par résonance plasmonique de surface [Nguyen et al., 2007]

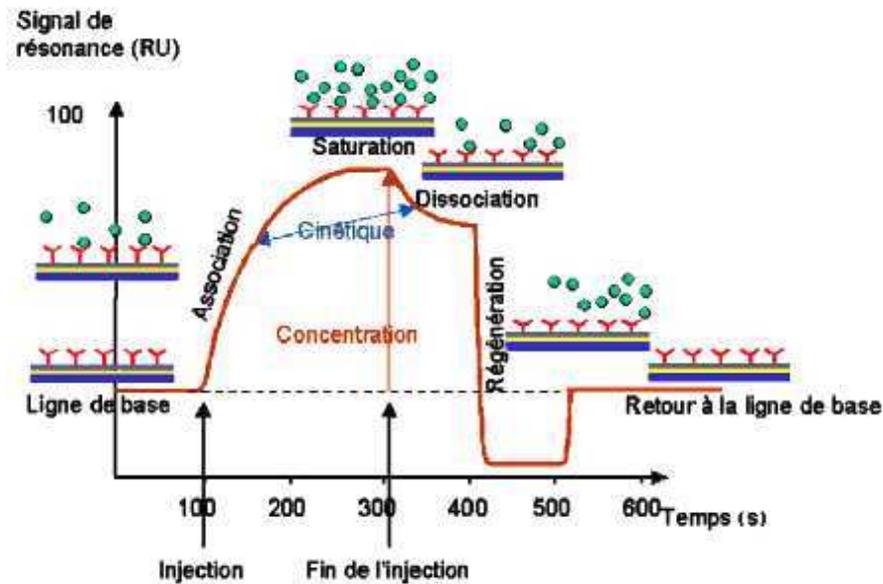


Figure 38 : Schéma de principe du BIACORE, sensorgramme associant le phénomène biochimique à la surface du capteur [Nguyen et al., 2007]

La molécule A (ligand) immobilisée, est représentée en rouge, et la molécule B (analyte) est représentée en vert. Le sensorgramme est généralement composé de 4 phases.

La phase de ligne de base correspond à une injection de tampon de course sur la surface immobilisée en molécule A. La phase d'injection est constituée par l'injection de l'analyte B sur la surface avec le phénomène d'association jusqu'à saturation, puis vient la phase de post-injection correspondant à une injection de tampon sur la surface provoquant une dissociation des molécules. Enfin la phase de régénération permet de dissocier totalement les complexes, et de revenir à la ligne de base initiale, grâce à l'injection d'une solution régénérante.

Au cours de notre étude le système BIACORE a montré l'existence d'une interaction directe entre l'insuline et la pompe Na,K-ATPase. Cette interaction s'exerçait sur l'enzyme lorsqu'elle été captée avec un anticorps anti-sous-unité α mais aussi sur lorsqu'elle été captée avec un anticorps anti-sous-unité β . D'ailleurs l'analyse des données cinétiques montrent une liaison préférentielle de l'insuline sur l'enzyme lorsque celle-ci est capturée par l'anticorps anti-sous-unité β . Il est à noter néanmoins que cette étude a été réalisée avec une enzyme isolée ayant par conséquent une conformation probablement différente de celle contenue dans la membrane plasmique. Par ailleurs la digoxine se lie à l'enzyme uniquement lorsque cette dernière est captée par un anticorps anti sous-unité α . Cela est certainement dû à l'absence d'ATP dans la

solution tampon. En effet la molécule d'ATP est nécessaire à la liaison de la digoxine sur la sous unité alpha [Matsui *et al.*, 1967 ; 1968 ; Schwartz *et al.*, 1968].

3.2. La culture cellulaire

Parallèlement aux expérimentations sur l'enzyme isolée, nous avons étudié les effets de l'insuline sur la Na,K-ATPase présente dans un environnement cellulaire : le cardiomyocyte.

3.2.1. Choix du modèle

Le cardiomyocyte isolé à partir des cœurs de rat (adultes et nouveaux nés), est utilisé car il représente le modèle cellulaire le plus adapté à l'étude des phénomènes de cardiotoxicité. Cette préparation a ainsi permis de fournir des données sur le comportement de l'insuline incubée en présence de cardiomyocytes soumis à une agression par la digoxine agissant sur la Na,K-ATPase.

Le recours aux cultures de cardiomyocytes est une étape importante dans l'évaluation de la cardiotoxicité et du potentiel thérapeutique que l'insuline pourrait avoir face à une intoxication à la digoxine. Le modèle du cardiomyocyte en culture ne peut cependant prétendre à une extrapolation au cœur, qui est soumis à diverses influences vasculaires, nerveuses et humorales. Toutefois, ce modèle cellulaire permet d'avoir un reflet assez proche du comportement des cardiomyocytes se trouvant dans l'organe sain et pathologique [Athias *et al.*, 2006].

Au cours de notre travail le cardiomyocyte a permis de confirmer une fois de plus l'effet cardioprotecteur de l'insuline face à une intoxication par la digoxine. Par ailleurs, au cours des études d'immunocytochimie, nous avons pu mettre en évidence que cet effet bénéfique s'exerce par la liaison de l'insuline aux sous-unités de l'enzyme cible du digitalique.

3.2.2. Etude par cytométrie en flux

L'effet bénéfique de l'insuline sur les cardiomyocytes (et les cellules MODE-K) est évalué en fonction de la potentialité à protéger l'entrée des cellules en apoptose précoce lorsqu'elles sont mises en contact avec la digoxine. La mise en évidence de cet effet a été observé au moyen de la cytométrie en flux qui mesure le pourcentage de cellules entrées en apoptose précoce en présence de DIOC₆ (fluorochrome : 3,3-dihexyloxycarbocyanine iodide ; émission dans le vert). Ce fluorochrome est une molécule lipophile qui fluoresce en vert. Lorsque la cellule est viable, la charge négative établie par le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) permet à

ce fluorochrome chargé positivement de s'accumuler dans la membrane lipidique. Dans les cellules apoptotiques, le potentiel mitochondrial chute [Zamzami et al., 1996; Hu et al., 1999; Murugavel et al., 2007; Tu et al., 2007] et cela de manière très précoce. Les cellules ne sont donc plus marquées par le DiOC₆, et par conséquent, le fluorochrome ne peut plus s'accumuler dans la membrane. On observe ainsi une diminution de la fluorescence qui est mise en évidence par cytométrie en flux.

C'est ainsi que nous avons pu mettre en évidence au cours de nos travaux un effet bénéfique de l'insuline sur les cellules lors d'une intoxication par la digoxine. Cependant nous n'avons pas observé d'effet propre de l'ouabaïne. Cela est certainement dû à l'existence, pour l'ouabaïne, de sites de liaisons de haute et basse affinités au niveau de l'enzyme. Il a également été établi que sur des cellules en condition de stress l'ouabaïne avait un effet protecteur. Dans notre étude le stress provenant du traitement et de l'expérimentation réalisée sur ces cellules.

3.2.3. *Etude par immunocytochimie*

L'immunocytochimie réalisée par la microscopie à fluorescence permet d'étudier la dynamique du cytosquelette. Pour cela les structures d'intérêts sont rendues fluorescentes par liaison covalente avec un fluorophore (ou fluorochrome).

Dans notre travail la microscopie à fluorescence utilise le microscope inversé Axiovert. Ce microscope est équipé de 4 objectifs (grossissements 5x ; 10x ; 40x et 63 x) et de 4 filtres pour la fluorescence (FITC, Rhodamine, DAPI, Cy5). Il est piloté à l'aide d'un logiciel Axiovision couplé au module Apotome. Ce dernier permet de réaliser des sections optiques d'un objet en utilisant le « principe de la projection sur grille », qui consiste à effectuer trois photos consécutives en décalant à chaque fois la grille latéralement. Les trois coupes sont recombinaées pour donner une image de qualité confocale.

Ce microscope est un dispositif qui permet de localiser des molécules spécifiques dans le contexte cellulaire.

C'est ainsi que nous avons pu observer qu'à la présence de l'insuline l'immunoréactivité de la sous-unité α_1 est augmentée au niveau de la Na,K-ATPase des cardiomyocytes nouveaux nés soumis au stress toxique de la digoxine. Cette observation a été permise grâce au système de traitement d'images ApoTome Zeiss.

Au cours de notre étude nous avons marqué le noyau par le DAPI, l' α -smooth muscle (qui lie l'actine) par le Cy5 et les anti- α_1 et β_1 respectivement par le FITC et la Rhodamine.

Cette technique a été réalisée sur des cardiomyocytes de rats nouveau né, traités selon différents schéma :

- en présence de la digoxine (ou de l'ouabaïne) seule à 10^{-6} M,
- en présence de l'insuline seule à 10^{-3} mg/ml,
- en présence de la digoxine (ou de l'ouabaïne) à 10^{-6} M plus de l'insuline à 10^{-3} mg/ml,

Ces différentes conditions ont été réalisées à différents temps (60 min et 24h).

Les données montrent que la digoxine, l'ouabaïne et l'insuline, indépendamment les unes des autres, diminuent l'immunoréactivité tandis que, cette dernière augmente uniquement lorsque les cardiomyocytes sont incubés pendant 24h en présence de digoxine et d'insuline.

3.3. Difficultés et limites

3.3.1. L'activité Na,K-ATPasique

La difficulté de cette étude était d'attribuer les mesures d'activités obtenues spécifiquement à la pompe Na,K-ATPase. Or au niveau des cellules MODE-K, l'activité mesurée par la technique de Fiske & Subbarow donnait des valeurs très basses. Une des explications à ses résultats pourrait être le faible contenu en pompe Na,K-ATPase sur cette lignée. Nous avons alors mesuré l'activité de la Na,K-ATPase directement au niveau des cardiomyocytes et observé que les valeurs d'activités obtenues étaient très élevées sans qu'il soit possible d'en extraire l'activité propre à la pompe. En effet, en présence de la digoxine censée diminuer la part d'activité spécifique à la Na,K-ATPase, les valeurs d'activité mesurées étaient toujours élevées. Cela suggère qu'une faible part de l'activité mesurée est liée à la Na,K-ATPase ; le reste de l'activité étant celui des autres ATPases membranaires (Ca^{2+} ATPases, H/K-ATPases...). Face à ces éléments nous avons choisi de travailler sur l'enzyme isolée. Cependant nous nous sommes heurtés à des problèmes de solubilisation mais aussi à des différences dans la qualité de l'enzyme entre les différents lots reçus du fournisseur. C'est pourquoi nous avons finalement fait le choix de mesurer l'activité de la Na,K-ATPase par une technique enzymatique.

3.3.2. Source enzymatique

Les études effectuées avaient pour cibles d'action la Na,K-ATPase. Or celle-ci pouvait présenter une structure modifiée selon le milieu dans lequel elle se trouvait. En effet, la conformation tertiaire de l'enzyme isolée présente en solution et celle intégrée à la membrane plasmique cellulaire sont différentes. La manière dont l'enzyme se déploie et interagit avec les forces environnementales peut influencer l'accès aux différentes régions de la Na,K-ATPase.

Dans la membrane plasmique l'enzyme présente une conformation quaternaire qui est donc différente de sa structure tertiaire. Ainsi la liaison aux sous-unités α et β sera fortement conditionnée par ces différentes conformations spatiales.

3.3.3. Nature de l'isoforme

Les isoformes des sous-unités de la pompe Na,K-ATPase, sont fonctions du tissu dans lequel il se trouvent. Ainsi l'isoforme retrouvé dans le cœur peut-être différent de celui isolé dans le cerveau etc... Or dans notre travail nous avons étudié les interactions avec la pompe Na,K-ATPase provenant de différentes sources. L'enzyme isolée et purifiée provient du cortex de porc, tandis que celle présente dans les cultures cellulaires provient des cœurs de rats (cardiomyocytes) et des cellules entérocytaires de rats (MODE-K). Ces origines différentes peuvent également avoir influencées la liaison avec les anticorps (anti- α_1 et β_1) utilisés pour révéler le type et le site d'interaction.

Au niveau de la mise en évidence des sites d'actions de l'insuline sur la pompe Na,K-ATPase, nous avons obtenu des résultats différents selon la méthode expérimentale utilisée. Ainsi avec le western-blot l'insuline semble agir préférentiellement au niveau de la sous-unité β_1 tandis qu'en immunocytochimie les résultats semblent indiquer une interaction préférentielle avec la sous-unité α_1 . Au niveau du BIACORE, on constate une fixation sur les deux sous-unités, avec toutefois une affinité plus forte sur β_1 .

Ces résultats restent néanmoins à confirmer par l'utilisation d'un témoin négatif. Dans notre étude, celui-ci est préparé en dénaturant l'insuline avec du beta-mercapthoethanol associé à une digestion enzymatique par la protéinase K. D'ailleurs nous l'avons utilisé au cours de l'étude d'immunocytochimie. L'insuline dénaturée perd ses effets modulateurs. On observe en effet aucune action protectrice lorsqu'elle est associée à un traitement à la digoxine, ni de manifestations liées à ses effets propres.

3.3.4. Les concentrations des molécules utilisées

Les concentrations utilisées au cours de notre travail ont été définies par rapport aux différentes sources enzymatiques. En effet, au niveau des cardiomyocytes, selon qu'ils soient issus de rats adultes ou de nouveaux nés, ils avaient une sensibilité différente à la digoxine, l'ouabaïne et à l'insuline, d'où les différents schémas utilisés. Quant à la concentration en ouabaïne, nous avons choisi d'utiliser la même que celle utilisée pour la digoxine ceci afin de comparer les

effets entre ces deux molécules qui sont toutes deux des inhibiteurs de la Na,K-ATPase. Il aurait été cependant intéressant d'utiliser une concentration en ouabaine différente afin de s'affranchir de son affinité plus forte vis-à-vis de l'enzyme.

Malgré les difficultés rencontrées lors de ces études *in vitro*, un effet protecteur de l'insuline a été mis en évidence à la fois sur l'enzyme isolée et sur le cardiomyocyte, les deux modèles étant complémentaires. L'avantage de la culture réside dans les réponses fonctionnelles du cardiomyocyte, qui sont directement attribuables à la cellule musculaire cardiaque. En effet, la Na,K-ATPase purifiée et isolée, présente un effet qui ne tient pas compte de l'environnement structurale de la cellule. Néanmoins, il existe une corrélation forte entre les résultats de ces modèles : l'insuline semblant agir directement sur la Na,K-ATPase, et cette liaison contribuerait en partie à la cardioprotection observée lors de l'intoxication à la digoxine.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Sur la base d'une observation clinique, suggérant le possible effet cardioprotecteur de l'insuline lors d'une intoxication aiguë grave à la digoxine, notre travail s'est intéressé à étudier cet effet au niveau expérimental, à la fois dans un modèle *in vivo* (chez le rat) mais également en *ex vivo* (culture cellulaire) et *in vitro* (enzyme isolée).

Aucun travail expérimental, qu'il soit clinique ou fondamental, n'est décrit dans la littérature ayant étudié l'effet d'une perfusion d'insuline-glucose en traitement d'une intoxication à la digoxine.

Ainsi, malgré l'absence de modèle expérimental, nous avons mis en évidence *in vivo* dans un modèle de rat adulte que la perfusion d'insuline-glucose exerce un effet bénéfique et cardioprotecteur lors d'une intoxication aiguë à la digoxine. Cet effet cardioprotecteur s'est manifesté par un retard dans le délai d'apparition des troubles cardiaques et par une augmentation de la durée de survie des animaux. Le traitement à l'insuline-glucose semble également avoir une action sur le type de troubles cardiaques qui apparaissent, aucun bloc auriculo-ventriculaire (BAV) n'a été constaté. Le bénéfice observé a été identique lors d'une utilisation du traitement en pré et en post-traitement à l'intoxication à la digoxine.

Au cours de notre étude nous avons utilisé un protocole constitué d'insuline et de glucose tandis que dans la littérature le protocole euglycémie/hyperinsulinémie utilisé était classiquement la triade « glucose – insuline – potassium » ou GIK. En effet ce « cocktail » est à la base du traitement utilisé lors de différentes intoxications aux cardiotropes mais également dans le traitement de l'hyperglycémie au cours de l'infarctus du myocarde [Grimaldi A et al. 2003]. L'injection de forte dose d'insuline (correspondant à un hyperinsulinisme) va par son action accroître la durée de l'hypoglycémique. Cet effet de l'insuline est par ailleurs souvent accompagné d'une hypokaliémie de transfert [Spiller, 1998 ; Mégarbane et al., 2005].

L'intérêt de ce protocole s'appuie sur les propriétés inotropes positives de l'insuline qui favorise l'entrée du glucose, du potassium mais aussi du calcium dans le myocyte. Cette action est particulièrement utile lors d'intoxications à certains cardiotropes (par exemple les

inhibiteurs calciques) qui sont responsables de l'inhibition des canaux calciques, d'une hyperglycémie et d'une acidose lactique.

En effet plusieurs observations cliniques ont montré l'efficacité du protocole GIK dans les intoxications par inhibiteurs calciques. Il manque à cette nouvelle thérapeutique plusieurs études multicentriques permettant de conforter les espoirs fondés par le GIK, d'en définir la place dans l'arsenal thérapeutique, les doses et les durées de traitement.

Néanmoins dans notre modèle d'étude d'intoxication, le composé toxique est représenté par la digoxine, connue également pour provoquer des hyperkaliémies témoins biologiques d'une imprégnation digoxinique sur l'organisme intoxiqué. C'est pourquoi le protocole, dans la composition du cocktail employé doit également tenir compte du type de toxique à traiter.

A travers cela se pose également la question sur la responsabilité de l'effet bénéfique. En effet parmi les éléments contenus dans le protocole insuline-glucose \pm potassium, quelle est la substance indispensable et permettant d'induire la cardioprotection : s'agit-il de l'hyperinsulinisme, de l'euglycémie ou alors de la combinaison des deux ?

De nombreuses études cliniques et expérimentales ont montré l'incidence bénéfique de l'insuline-glucose (\pm potassium) sur la récupération du myocarde soumis à des contraintes ischémiques. Cette association diminuerait les atteintes métaboliques et fonctionnelles responsables de certains troubles.

La première hypothèse à l'origine de l'intérêt de la perfusion insuline – glucose – potassium lors d'un infarctus du myocarde chez le non-diabétique, a été l'amélioration du métabolisme du cardiomyocyte ischémique [Grimaldi A et al., 2003].

Parmi les études expérimentales certaines ont démontré que l'effet cardioprotecteur de l'insuline était secondaire à l'activation d'une des voies de signalisation intracellulaire passant par l'activation de la PKB et de la PI3 kinase. D'autres ont noté chez le rat que l'effet anti-apoptotique de l'insuline sur les cellules myocardiques ischémiques, était secondaire à l'activation par l'insuline de la NO synthase avec augmentation de la production de NO.

Au niveau moléculaire, l'insuline a été étudiée chez le patient en réanimation. Il a été observé que son action est médié via au moins deux types de mécanismes : diminution de l'inflammation liée à l'accumulation d'acides gras libres dans les tissus dans un contexte d'insulinorésistance et diminution de la production de radicaux libres induits par l'hyperglycémie. Il a également été démontré que l'administration d'insuline semblait agir en dehors de ses effets sur le métabolisme du glucose, en diminuant significativement la taille de

l'infarctus lors de la reperfusion [Argaud L et al., 2004]. L'insuline agit donc de multiples manières [Andreelli F et al., 2006 ; Orban JC et al., 2006], en réduisant la toxicité des dépôts lipidiques pathologiques (foie, muscle squelettique, cellule β -pancréatique) et les phénomènes de glucotoxicité. Par ailleurs des travaux ont suggéré l'incidence favorable du glucose dans un modèle *in vitro* reproduisant une séquence « Ischémie-Reperfusion » sur le cardiomyocyte [Tissier C et al., 2005].

Il semble toutefois que l'effet bénéfique de l'insuline soit nécessairement associé à celui du glucose de part la nature même des effets de l'insuline...

Faisant suite aux résultats obtenus au cours de l'étude *in vivo*, nous avons orienté nos travaux vers une explication moléculaire du mécanisme d'action de l'effet cardioprotecteur de l'insuline. Ce travail nous a permis d'apporter des éléments en faveur d'une interaction « directe » entre insuline et la digoxine sur la Na,K-ATPase. Cette action directe de l'insuline sur l'enzyme pourrait permettre un effet protecteur spécifique par rapport aux effets délétères de la digoxine. Cette action de l'insuline est certainement une synergie ou une résultante des effets directs et indirects. Ces derniers ont été décrits dans la littérature comme exerçant leurs actions via plusieurs mécanismes : des phénomènes ioniques, de transcription et/ou de phosphorylation au niveau intracellulaire.

Les études *in vitro* ont été réalisées au moyen de différentes techniques expérimentales, chacune contribuant par sa spécificité à la démarche scientifique précisant la nature et le site d'interactions entre l'insuline et la pompe Na,K-ATPase.

L'ensemble de ces techniques forment un faisceau d'argument en faveur du rôle cardioprotecteur de l'insuline lors d'une intoxication aiguë à la digoxine. Celui-ci s'exerce par action de l'insuline au niveau de la pompe Na,K-ATPase. Il reste néanmoins à confirmer de manière exacte le site de liaison de l'insuline au niveau de cette enzyme.

C'est ainsi qu'au niveau de l'enzyme isolée, la méthode de mesure de l'activité de la Na,K-ATPase (test à la luciférase) a permis de mettre en évidence que l'insuline empêche l'inhibition induite par la digoxine. Il reste néanmoins à compléter ces données par la mesure de l'activité de la Na,K-ATPase à la présence d'insuline seule (native ou dénaturée), puis en concomitance avec l'ouabaïne.

Le western-blot et la technique BIACORE ont permis quant à eux de conclure à une interaction directe entre l'insuline et les deux sous-unités α_1 et β_1 de l'enzyme provenant du cerveau de porc. Toutefois au niveau de la mise en évidence des sites d'actions de l'insuline sur la pompe Na,K-ATPase, nous avons obtenu des résultats différents selon la méthode expérimentale

utilisée. Ainsi avec le western-blot l'insuline semble agir préférentiellement au niveau de la sous-unité β_1 tandis qu'en immunocytochimie les résultats semblent indiquer une interaction préférentielle avec la sous-unité α_1 . Au niveau du BIACORE, on constate une fixation sur les deux sous-unités, avec toutefois une affinité plus forte sur β_1 .

Ces résultats restent à confirmer et à compléter par l'utilisation notamment d'un témoin négatif (insuline dénaturée).

L'analyse par western-blot des bandes de protéines transférées et marquées au niveau de la membrane de transfert nécessite par ailleurs une vérification des dépôts. Il s'agit notamment d'utiliser un témoin interne permettant de normaliser les expériences afin de confirmer la présence, lors de la réalisation du western-blot, d'un dépôt de même quantité de protéine dans chacun des puits. La protéine communément utilisée servant de témoin interne de dépôt est l'actine (ou la tubuline) dont la concentration déposée ne devrait pas varier entre les différents puits (échantillons) du gel.

Afin de vérifier la présence, au niveau des différentes bandes du gel, de la digoxine et de l'insuline des études complémentaires semblent nécessaires. Celles-ci consisteront en une extraction des différentes bandes sur les quelles nous procéderons à une extraction des dites molécules (digoxine et insuline). Le contenu de l'extrait sera ensuite analysé par chromatographie HPLC afin de déterminer la présence ou non des ces substances.

Quant aux résultats obtenus avec la technique BIACORE, les doses de digoxine étudiées, représentaient une gamme de concentration assez étroite. C'est pourquoi celle-ci devra être élargie avec de forte concentration, permettant ainsi de mettre en évidence l'existence d'un éventuel effet dose/réponse. En effet lors de nos expérimentations nous n'avons constaté d'effets qu'avec la plus forte concentration utilisée (10^{-6} M). Cet élargissement de gamme de concentrations devra concerner à la fois la digoxine mais également l'ouabaïne et bien évidemment l'insuline (native et dénaturée).

Néanmoins ces données sur l'enzyme Na,K-ATPase isolée restent très spécifiques et ne sont d'ailleurs pas transposables à la pompe intégrée à une cellule entière au niveau de la membrane plasmique. C'est pourquoi des études *ex-vivo* ont été réalisées aux niveaux de deux modèles cellulaires (MODE-K et cardiomyocytes). L'une (les MODE-K) lignée cellulaire facilement cultivable, a permis de mettre au point le protocole expérimental. La seconde (le cardiomyocyte) plus complexe, est une culture primaire qui représente le modèle cellulaire le mieux adapté à l'étude des phénomènes de cardiotoxicités. Cette culture permet d'étudier les effets de l'insuline, incubée en présence de cardiomyocytes soumis à une agression par la

digoxine, au niveau de la pompe Na,K-ATPase. En effet l'utilisation de cultures de cardiomyocytes est une étape importante dans l'évaluation de la cardiotoxicité et du bénéfice thérapeutique que l'insuline pourrait avoir face à une intoxication à la digoxine. Ce modèle cellulaire permet d'avoir un reflet assez similaire du comportement des cardiomyocytes situés au niveau de l'organe sain et pathologique [Athias et al., 2006].

Notre travail a d'ailleurs permis de confirmer grâce à l'utilisation du cardiomyocyte l'effet observé *in vivo*, à savoir un effet cardioprotecteur de l'insuline face à une intoxication par la digoxine. Par ailleurs, au cours des études d'immunocytochimie, nous avons pu mettre en évidence que cet effet bénéfique s'exerce par la liaison de l'insuline aux sous-unités de l'enzyme cible du digitalique. En effet, au niveau cellulaire, l'immunocytochimie couplée à la technique ApoTome ont permis de montrer que lorsque l'enzyme est ancrée à sa membrane plasmique l'interaction entre l'insuline et la Na,K-ATPase, en présence de digoxine, s'effectue au niveau de la sous-unité α_1 ; celle-ci appartenant à la Na,K-ATPase d'une cellule cardiaque (le cardiomyocyte).

Il reste à confirmer ces résultats par l'étude de l'effet de l'insuline dénaturée aux niveaux des cardiomyocytes néonataux à la présence de digoxine et de l'ouabaïne.

Enfin l'analyse par cytométrie en flux réalisée sur les cardiomyocytes et les cellules MODE-K confirme les données *in vivo* sur l'apport bénéfique protecteur de l'insuline face à une intoxication à la digoxine. Au cours de l'analyse par cytométrie en flux, le groupe témoin semblait présenter un taux assez important de cellule en apoptose. Afin de vérifier l'état cellulaire et la présence plus ou moins élevée de cellules apoptotiques dans l'échantillon témoin, une quantification au moyen d'autres analyses immunocytochimique devra être réalisé. L'apoptose peut être en effet détecté en utilisant des marqueurs membranaires tel que l'annexine V. La membrane plasmique des cellules intactes est une bicouche lipidique composée de phospholipides distribués asymétriquement. Parmi ceux-ci, la phosphatidylsérine est localisée sur le feuillet interne de la membrane plasmique et possède une forte affinité spécifique pour l'annexine V. La membrane plasmique est naturellement imperméable à l'annexine V, et sa fixation à la membrane cellulaire traduit une détérioration de celle-ci (la translocation de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique, processus apoptotique précoce ; perméabilisation accrue de la membrane plasmique lorsque la cellule est nécrotique). L'analyse en cytométrie en flux des cellules après double marquage par l'annexine V couplée à un fluorochrome (le FITC) et par l'iodure de propidium (IP), utilisé comme indicateur de la perméabilité membranaire permet de différencier trois phénotypes : les

cellules viables (annexine V⁻, IP⁻), les cellules apoptotiques (annexine V⁺, IP⁻) et les cellules (secondairement) nécrotiques (annexine V⁺, IP⁺).

Il est également important de noter que lors de ces études *in vitro*, les anticorps dirigés contre les isoformes cibles des sous-unités (α et β) ne sont peut être pas appropriés à l'ensemble des modèles. La différence des isoformes contenus dans les différentes sources d'où provient l'enzyme (isolée ou cellulaire) doit également conditionner le choix des anticorps.

En effet, selon que l'on soit dans le cortex ou dans le myocarde les isoformes principalement isolés et dont l'expression est majoritaire, ne sont pas tout à fait identiques. Au niveau du cerveau l'isoforme de la sous-unité α majoritairement isolé est le type $\alpha 3$, concernant la sous-unité β l'isoforme principalement isolé est le $\beta 3$. Par contre, au niveau du cœur, les principaux isoformes majoritairement retrouvés sont $\alpha 1$ et $\beta 1$ respectivement pour la sous-unité α et β .

Ainsi pour une meilleure spécificité d'action des anticorps sélectionnés, il faudrait que l'enzyme sous sa forme isolée et contenue dans un environnement cellulaire soit identique. Dans notre travail la pompe Na,K-ATPase serait exclusivement d'origine cardiaque ou corticale. Cela permettrait de retrouver les même isoformes des sous-unités α et β et donc de pouvoir utiliser les même anticorps.

Sur le plan fondamental le travail pourrait se poursuivre par un approfondissement des mécanismes d'interactions de l'insuline avec la pompe Na,K-ATPase ; cela afin d'identifier de manière plus précise le(s) site(s) d'action(s) de l'insuline sur cette enzyme et de connaître également l'influence que pourraient avoir les isoformes et la source enzymatique sur cette liaison. Au cours de ces expérimentations, il serait intéressant de tester différentes concentrations de l'ouabaïne sur l'enzyme isolée et sur les cellules afin de pouvoir expliquer l'absence d'effet de l'insuline en présence de celle-ci. Afin de confirmer que les effets sont propres à l'action de l'insuline, le témoin négatif serait associé à chacune des expérimentations.

Le site de la liaison de l'insuline sur la Na,K-ATPase reste donc à déterminer avec précision. La confirmation du mécanisme d'action de l'insuline permet d'envisager de nouvelles applications thérapeutiques dans le domaine de la protection cardiovasculaire : utilisation en cardioprotection contre des substances arythmogènes. Cette liaison ouvre également la

perspective de développer des ligands spécifiques de ce site avec des applications cardiologiques...

D'autres méthodes expérimentales peuvent servir à justifier l'existence d'une interaction directe entre l'insuline et la pompe Na,K-ATPase. Une méthode faisant appel à l'électrophysiologie de la pompe peut-être mises-en à profit.

En effet la principale fonction physiologique du muscle cardiaque est de nature contractile. Cette fonction est intimement liée aux propriétés électrophysiologiques de ses cellules : en effet, l'activité électrique précède et déclenche l'activité contractile de la cellule cardiaque. Les propriétés électrophysiologiques de ces cellules relèvent en grande partie de la perméabilité de la membrane plasmique aux ions. Celle-ci étant assurée aux moyens de canaux ioniques mais également par des structures protéiques transmembranaires telles que les pompes ioniques consommatrices d'adénosine triphosphate (ATP) : exemple la pompe Na,K-ATPase.

Les cellules cardiaques sont des cellules excitables, c'est-à dire qu'elles sont capables de générer un signal électrique en réponse à une stimulation d'intensité suffisante. Dans le cœur cette réponse est le potentiel d'action. Ce phénomène résulte d'une perméabilité de certaines espèces ioniques donnant lieu à l'apparition d'une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

La pompe à sodium, Na,K-ATPase qui n'est pas un canal ionique, assure un transport actif (par consommation d'ATP) d'ions à travers la membrane cellulaire. Deux ions potassiques entrent dans la cellule pour trois ions sodiques sortants soit au total un courant sortant repolarisant. La pompe à sodium intervient à la fin du potentiel d'action et tend à hyperpolariser la membrane. Elle est activée en cas de surcharge sodique intracellulaire. La Na,K-ATPase génère, en fin de potentiel d'action, un courant sortant ($I_{Na/K}$) qui est hyperpolarisant rétablissant les gradients de concentration ionique permettant la répétition de l'activité électrique c'est à dire du potentiel d'action. Ce dernier étant caractérisé par quatre phases successives : la phase 1 correspond à la repolarisation, la phase 2 à la dépolarisation, la phase 3 à une hyperpolarisation et enfin la phase 4 qui correspond au retour du potentiel de repos. Celui-ci étant récupéré grâce à la pompe Na,K-ATPase qui installe un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique. La pompe est dite électrogène car le bilan des charges transportées (sortie de 3 Na⁺ et entrée de 2 K⁺) n'est pas nul. Ce transport contribue à la formation d'une différence de potentiel transmembranaire, créant un courant qui est alors mesurable [**Vasilets et al., 1992**].

La Na,K-ATPase assure le maintien, à l'intérieur de la cellule, d'une faible concentration en sodium et d'une forte concentration en potassium, ainsi qu'une polarisation des tissus excitables ou contractiles : la dépolarisation et la repolarisation correspondent respectivement à une entrée de sodium et une sortie de potassium. La Na,K-ATPase permet de rétablir l'équilibre ionique antérieur et donc la polarité de la cellule.

Or, l'enregistrement des courants ioniques dans une cellule cardiaque isolée et celle de l'activité d'un canal transmembranaire est possible par la méthode du *patch clamp*.

Il s'agit d'isoler électriquement une partie infime de la membrane cellulaire à l'aide d'une pipette de verre dépoli très fine appliquée sur la membrane. Différentes configurations sont possibles [Sauvé, 1987] qui permettent à l'expérimentateur d'étudier : soit le courant global (ou macroscopique), provenant de toute la population des canaux ioniques activés dans une cellule pour un potentiel donné ; soit le courant élémentaire (ou microscopique), conséquence de l'activité d'une protéine-canal [Babuty et al., 2008]. Le *patch clamp* permet d'analyser le couplage entre canal ionique et stimuli externes. On va pouvoir, grâce à cette technique du patch-clamp sur la pompe Na,K-ATPase, étudier les variations de courant qu'elle provoque au sein de la cellule lorsque l'enzyme subit un stimuli pharmacologique. Ainsi, après que le courant de base qu'elle génère dans des conditions physiologiques ait été identifié et mesuré, on soumet cette pompe à différentes conditions expérimentales. L'enzyme sera traitée par différentes substances pharmacologiques qui vont ainsi provoquer en son sein des variations d'activité du courant de la pompe. Et selon que le courant électrique généré par la pompe est similaire ou non à son activité électrophysiologique, la substance mise en jeu aura des propriétés simulatrices ou inhibitrices de l'enzyme.

Sur le plan clinique notre travail, associé aux données cliniques sur l'apport bénéfique de la perfusion d'insuline-glucose lors des intoxications aux bêta-bloquants et aux BCC, pourrait contribuer à reconsidérer la place de la perfusion d'insuline-glucose comme alternative dans la prise en charge de l'intoxication aiguë par la digoxine. Ceci notamment quand l'utilisation de Fab (d'anticorps anti-digoxine) n'est pas possible ou souhaitée. En effet, la perfusion d'insuline-glucose en comparaison aux antidotes spécifiques, est un traitement peu coûteux disponible dans tous les Hôpitaux utilisant des drogues usuelles ne nécessitant pas d'études toxicologiques complémentaires. En cas de preuve de son efficacité, ce traitement pourrait notamment s'étendre aux pays en voie de développement.

Par ailleurs, au cours de ce travail nous avons mis au point un modèle expérimental sur le cardiomyocyte et développé un outil d'analyse pouvant servir à l'étude de deux phénomènes bien que ces derniers semblent ne pas faire intervenir la pompe Na,K-ATPase :

- En effet ce travail constitue un modèle expérimental d'étude pour d'autres cardiotropes tels que les inhibiteurs des canaux calciques, les bêta-bloquants et les anti-arythmiques de classe I (flécaïne®). Ces molécules présentent en effet comme la digoxine (bien que la cible soit différente) une action sur le myocarde. Par ailleurs, le traitement de l'intoxication due à des bêta-bloquants et à des inhibiteurs de canaux calciques a fait appel dans des observations cliniques à l'utilisation de l'insuline-glucose [Kerns *et al.*, 1997 ; Blais, 2001 ; Yuan *et al.*, 1999 ; Boyer *et al.*, 2002 ; Megarbane *et al.*, 2004]. Cette approche est d'autant plus importante qu'il n'existe pas actuellement pour ces molécules d'antidote spécifique, rendant ainsi leur intoxication aiguë très souvent mortelle.

- Ce travail permettra également d'apporter un éclairage supplémentaire aux études cliniques et expérimentales déjà réalisées, quant à l'impact de l'insuline sur le cardiomyocyte soumis à l'environnement toxique que représente l'hyperglycémie. Deux études cliniques [Malmberg *et al.*, 1997 ; Van den Berghe *et al.*, 2001] ont clairement démontré qu'une insulinothérapie intensive, qui a pour but de normaliser les glycémies, augmente la survie, réduit les durées d'hospitalisation et diminue significativement la taille de l'infarctus du myocarde, ceci grâce à une amélioration du métabolisme du cardiomyocyte ischémique [Argaud *et al.*, 2004 ; Wael *et al.*, 2003]. D'autres travaux [Coleman *et al.*, 1989] ont également démontré que l'insuline et le glucose amélioraient l'index cardiaque chez des patients en choc cardiogénique après un pontage coronarien. Par ailleurs l'insulinothérapie diminue la mortalité, et préviendrait l'apparition des différentes complications en relation avec les hormones de stress chez le malade en réanimation [Ingels *et al.*, 2006 ; Capes *et al.*, 2000 ; Bouraoui *et al.*, 2005].

La pompe Na,K-ATPase semble également intervenir dans d'autres processus biologiques notamment par l'interaction qui existe avec le peptide C et dans son implication dans les voies de signalisation cellulaire.

A la découverte du peptide C, il a été admis, après plusieurs études, que ce peptide ne disposait pas d'activité biologique particulière et que son seul rôle est sa participation à la synthèse de l'insuline. Cependant depuis une dizaine d'année plusieurs études ont évoqué de nouveau le peptide C comme une hormone peptidique active ou peptide bioactif [Mavroukian *et al.*, 2009]. En effet il a été mis en évidence que la liaison du peptide C à son récepteur atteint un

plateau à des concentrations plasmatiques basses (0,9nmol/L) [Marques et al., 2004], d'où une probable saturation des récepteurs à la concentration normale du peptide C chez l'homme sain. Cela est certainement à l'origine de la difficulté de mise en évidence d'un rôle physiologique du peptide C chez l'homme sain dans les études antérieures [Hoogwerf et al., 1986]. En revanche, dans une population où la concentration plasmatique en peptide C est effondrée (animaux avec un diabète expérimental ou des patients diabétiques de type 1) il a été décrit l'existence d'un effet de ce peptide [Sjoquist et al., 1998].

Ce peptide a récemment été reconnu comme un ligand se fixant sur des récepteurs membranaires [Rigler et al., 1999].

En général, les peptides bioactifs exercent leurs fonctions cellulaires lorsqu'une certaine partie de leur molécule se lie de manière spécifique sur un récepteur [Wahren, 2004]. Pour le peptide C, les cinq acides aminés de son extrémité C terminale constituent le segment responsable pour son activité [Ohtomo et al., 1998]. Par ailleurs les expériences de Rigler et al., 1999 ont démontré l'existence d'un récepteur spécifique du peptide-C couplé à une protéine G, qui lorsqu'il est stimulé active ensuite des voies de signalisations intracellulaires calcium-dépendantes. Le résultat final au niveau cellulaire est la potentialisation de l'activité de la pompe Na,K-ATPase [Othomo et al., 1996]. Cette action a été observée dans les tubules rénaux [Othomo et al., 1996], le nerf sciatique et les nerfs périphériques [Forst et al., 2000 ; Sima et al., 2001], les globules rouges [Forst et al., 2000] et la branche ascendante épaisse médullaire de l'anse de Henlé [Tsimaratos et al., 2003].

L'action du peptide-C au niveau de la Na,K-ATPase semble faire intervenir des phénomènes de phosphorylation. En effet le peptide-C se fixe sur un récepteur membranaire couplé à une protéine G entraînant une augmentation du calcium intracellulaire. Cette fixation du peptide-C sur son récepteur entraîne selon les protocoles expérimentaux soit une phosphorylation, soit une déphosphorylation de la Na,K-ATPase ; ces deux mécanismes aboutissant à une augmentation de l'activité de la Na,K-ATPase [Tsimaratos et al., 2005].

Le peptide-C entraîne aussi une amélioration de la vitesse de conduction des nerfs sensitifs et moteurs chez le rat [Tsimaratos et al., 2003] via un mécanisme médié par le NO [Cotter et al., 2003]. En effet la concentration intracellulaire accrue du calcium stimule également l'activité de la synthase endothéliale (eNOS) du monoxyde d'azote (NO) augmentant ainsi sa production [Kitamura et al., 2003].

Ainsi la liaison spécifique du peptide-C sur la membrane plasmique induit un certain nombre de réponses cellulaires dont l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, la

phosphorylation des MAPK (ERK1 et 2), l'activation de PKCa, et à terme l'activation de la Na,K-ATPase et de la NO synthase [Tsimaratos *et al.*, 2005].

Parmi les effets observés lors d'une administration en peptide-C, il a été constaté une réduction significativement l'hyperfiltration glomérulaire ainsi que la protéinurie [Rebsomen *et al.*, 2006] et augmentation de l'utilisation du glucose et du flux sanguin musculaire. Ainsi l'amélioration de la fonction rénale serait la conséquence de la stimulation de l'eNOS rénale et de la Na,K-ATPase glomérulaire [Sjoquist *et al.*, 1998].

D'autres travaux ont également démontré l'existence d'effets du peptide-C au niveau du développement des lésions vasculaires, notamment une action au niveau de la prolifération des cellules musculaires lisses et, un effet pro-athérogène qui a été observé chez les patients diabétiques de type 2 [Kurowska *et al.*, 2008].

L'étude approfondie du mécanisme d'action du peptide C au niveau de la pompe Na,K-ATPase semble ouvrir également des perspectives de développement de thérapeutiques au niveau notamment de pathologies rénales chez les diabétiques (types néphropathies) mais également au niveau des certaines affections cardiovasculaires (infarctus du myocarde).

La littérature récente suggère l'existence de deux groupes de pompes à sodium [Xie *et al.*, 2002 ; 2003]. Le premier est distribué de manière aléatoire au sein de la membrane plasmique et assure les échanges sodium-potassium absolument nécessaires à la vie de la cellule. Le second se trouve dans les cavéoles et semble participer dans le contrôle d'un ensemble de voies de signalisation liées à Src et au récepteur de l'EGF.

Les cavéoles sont des microdomaines enrichis en glycosphingolipides, cholestérol, caveoline et autres structures impliquées dans la transduction de signaux ou des protéines de signalisation telles que la famille des Src-tyrosine kinase. Il semble que les pompes à sodium localisées dans les cavéoles participent beaucoup moins aux échanges ioniques, et ce peut-être en raison de leur interaction avec la cavéoline 1 [Liu *et al.*, 2003].

Par ailleurs il a été mis en évidence que la liaison de l'ouabaïne au niveau de la pompe Na,K-ATPase dans les cavéoles est associée à la modification du fonctionnement de diverses voies de signalisation [Lefranc, Mijatovic *et al.*, 2008 ; Xie *et al.*, 2003]. En effet il a été observé une activation (directe ou indirecte ?) de la Src provoquant une phosphorylation des protéines à activité tyrosine conduisant notamment à la transactivation de récepteur a *epidermal growth factor* (EGFR). L'ensemble de ces voies converge vers l'activation de facteurs de transcription : IP₃ (Inositol 1,4,5-triphosphate), PLC (phospholipase C), PKC (protéine kinase

C), PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) ; tous ces éléments jouant un rôle primordial dans la prolifération des cellules.

Il a également été mis en évidence que la liaison d'un inhibiteur de la pompe Na,K-ATPase au niveau de sa sous unité $\alpha 1$ diminue la concentration intracellulaire en ATP sans modification significative des concentrations $[Na^+]_i$ et $[Ca^{2+}]_i$. Cette baisse du taux d'ATP intracellulaire désorganise le cytosquelette d'actine, ce qui a pour conséquence de perturber fortement le processus de migration et de prolifération (au niveau de la cytokinèse) des certaines cellules tumorales. Il s'en suit une mort cellulaire massive par processus autophagique [**Lefranc, Kiss, 2008 ; Lefranc, Mijatovic et al., 2008**].

L'activation des kinases de la famille Src, suite à la liaison de l'ouabaine au niveau de la Na,K-ATPase se produit dans différents types cellulaires : myocytes cardiaques, musculaires lisses, cellules épithéliales rénales, cellules cancéreuses....

L'action de l'ouabaine au niveau de la pompe se traduit également après une cascade de réaction intracellulaire par une augmentation de la production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et régule la concentration de calcium intracellulaire. Or les ROS activent la voie mitogène Ras/MAPK, et sont également impliqués dans l'activation de voies de stress et de survie cellulaires [**Negre-Salvayre et al., 2005**].

Ces phénomènes de transduction de signal convergent vers l'activation de facteurs de transcription, qui induisent à leur tour l'expression de gènes et la synthèse de protéines responsables entre autres de l'hypertrophie et de l'hyperplasie des myocytes vasculaires (cellules musculaires lisses). Or la prolifération des ces derniers est associée à de nombreuses pathologies vasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension artérielle systémique. Ainsi la fixation de l'ouabaine sur l'enzyme stimule la croissance hypertrophique dans les myocytes cardiaques et la prolifération des cellules musculaires lisses, et induit également l'apoptose dans de nombreuses cellules malignes. L'activation de cette voie conduit une stimulation de plusieurs protéines qui jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes, la stimulation de synthèse des protéines, mais également en la production de molécule pro-apoptotique [**Xie et al., 2002**].

Ces données ouvrent l'intérêt d'une inhibition de l'activité de la pompe à sodium comme nouvelle cible thérapeutique (notamment dans les cancers). En effet le ligand en se liant à la pompe à sodium inhibe fortement la prolifération et la migration des cellules tumorales et finit par y induire une mort cellulaire massive de type autophagique. Par ailleurs la connaissance du

mécanisme de la transactivation de l'EGFR médié par la Na,K-ATPase au niveau d'un tissu donné et dans une situation pathologique donnée pourrait s'avérer utile comme cible d'inhibition pharmacologique.

Il semble donc intéressant d'étudier également cette nouvelle voie des effets de la Na,K-ATPase. En effet ces études permettront d'identifier les différents acteurs et les voies de signalisation liées à la liaison d'une molécule inhibitrice au niveau de cette enzyme. Ces travaux pouvant aboutir secondairement à développer au niveau clinique des molécules ayant des effets bénéfiques sur le développement de cancers mais également sur les pathologies cardiovasculaires.

BIBLIOGRAPHIE

A

Adnet F, Atout S, Galinski M, Lapostolle F. Évolution des intoxications médicamenteuses volontaires en France. *Réanimation*. **2005**; 14: 721-726.

Ahlman B, Charlton M, Fu A, Berg C, O'Brien P, Nair KS. Insulin's effect on synthesis rates of liver proteins. A swine model comparing various precursors of protein synthesis. *Diabetes*. **2001**; 50: 947-54.

Akera T, Ng YC. Digitalis sensitivity of Na⁺,K⁺-ATPase, myocytes and the heart. *Life Sci*. **1991**; 48: 97-106.

Aizawa T, Sato Y, Ishihara F, Taguchi N, Komatsu M, Suzuki N, Hashizume K, Yamada T. ATP-sensitive K⁺ channel-independent glucose action in rat pancreatic beta-cell. *Am J Physiol*. **1994**; 266: 622-627.

Albertson TE, Dawson A, de Latorre F, Hoffman RS, Hollander JE, Jaeger A, Kerns WR 2nd, Martin TG, Ross MP; American Heart Association; International Liaison Committee on Resuscitation. TOX-ACLS: toxicologic-oriented advanced cardiac life support. *Ann Emerg Med*. **2001**; 37: 78-90.

Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Kapur N, Dandona P. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr) -1 expression in mononuclear cells and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*. **2002**; 87: 1419-1422.

Allain P. Les médicaments. Pharmacologie 3^{ème} éd Estem. **2001**.
<http://www.pharmacorama.com>

Andreelli F, Jacquier D and Keufer F. Anti-inflammatory effect of insulin in critically ill patients. *Réanimation*. **2006**; 15: 467-473

Antman EM, Wenger TL, Butler VP Jr, Haber E, Smith TW. Treatment of 150 cases of life-threatening digitalis intoxication with digoxin-specific Fab antibody fragments. Final report of a multicenter study. *Circulation*. **1990**; 81: 1744-17452

Apell HJ. How do P-Type ATPases transport ions ? *Bioelectrochemistry*. **2004**; 63: 149-156.

Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med*. **2007**; 261: 44-52.

Argaud L, Ovize M. How to use the paradigm of ischemic preconditioning to protect the heart? *Med Sci (Paris)*. **2004**; 20: 521-5.

Athias P, Vandroux D, Tissier C, Rochette L. Development of cardiac physiopathological models from cultured cardiomyocytes. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. **2006**; 55: 90-99.

Avatshi PS, Greene ER, Voyles WF. Noninvasive doppler assessment of human postprandial renal blood flow and cardiac output. *Am J Physiol*. **1987**; 252: 1167-1174.

B

Babuty D, Argibay J, Hatem S. Electrophysiologie cardiaque. *Cardiologie*. **2008**.
<http://www.em-consulte.com/article/181608>

- Bahrman H, Greeff K. Evaluation of cardiac glycosides in the intact animal. In: Greeff, K. (Ed.), *Cardiac Glycosides. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 56/I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. **1981**; 117-152.
- Bailey B. Glucagon in β -blocker and calcium channel blocker overdoses: a systematic review. *J Toxicol Clin Toxicol.* **2003**; 41:5 95-602.
- Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DM, Hubbard RE, Isaacs NW, Reynolds CD. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **1988**; 319: 369-456.
- Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ. Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides.* **1997**; 18: 1257-1262.
- Baron AD, Brechtel G. Insulin differentially regulates systemic and skeletal muscle vascular resistance. *Am J Physiol.* **1993**; 265: 61-67.
- Baud FJ, Deye N, Sonnevill R, Mégarbane B. Intoxication grave par l'insuline. *Réanimation.* **2006**; 15: 481-489.
- Baud FJ, Mégarbane B, Deye N, Leprince P. Clinical review: aggressive management and extracorporeal support for drug induced cardiotoxicity. *Crit Care.* **2007**; 11: 207.
- Baud F, Mouhoub Y, Carmona D, Megarbane B, Deye N. Intoxications médicamenteuses par les antiarythmiques. *STV.* **2007**; 19: 51-54.
- Bauman JL, Didomenico RJ, Galanter WL. Mechanisms, manifestations, and management of digoxin toxicity in the modern era. *Am J Cardiovasc Drugs.* **2006**; 6: 77-86.
- Bayer MJ. Recognition and management of digitalis intoxication: implications for emergency medicine. *Am J Emerg Med.* **1991**; 9: 29-32.
- Beguin P, Wang X, Firsov D, Puoti A, Claeys D, Horisberger JD, Geering K. The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* **1997**; 16: 4250-4260.
- Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, Taegtmeier H, Severson D, Kahn CR, Abel ED. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest.* **2002**; 109: 629-639.
- Bergstra A, Svilaas T, van den Heuvel AF, van der Horst IC, Zijlstra F. Glucose-insulin-potassium infusion in acute myocardial infarction: a hemodynamic study. *Am Heart J.* **2006**; 151: 345-351.
- Bers DM, Barry WH, Despa S. Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* **2003**; 57: 897-912.
- Bhatia SJ, Smith TW. Digitalis toxicity: mechanisms, diagnosis, and management. *J Card Surg.* **1987**; 2: 453-465.
- Bilbault P, Castelain V, P Lutun, Meziani F, Harlay ML, Mathien C, Pynn S, Schneider F, Jaeger A. Is digoxin poisoning improved by insulin? *J Toxicol Clin Toxicol.* **2005**; 42: 222. [Abstract]
- Bismuth C. Les intoxications médicamenteuses aiguës. *Rev Prat.* **1997**; 47: 714-715.

Blais R. Intoxication par bloquant des canaux calciques et bêta-bloquants. Bulletin d'information Toxicologique, Publication de la direction de toxicologie humain Institut national de santé publique du Québec. **2001**; 17: 3.

Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* **1998**; 275: 633-650.

Bosquet C, Jaeger A. Thérapeutiques d'exception au cours des défaillances circulatoires et respiratoires d'origine toxique. *Réanimation.* **2001**; 10: 402-411.

Bouglé A, Annane D. Les effets de l'insuline : de la cellule à l'organisme entier. *Ann Fr Anesth Reanim.* **2009**; 28 : 193-199.

Bouraoui H, Trimeche B, Ernez-Hajri S, Mahdhaoui A, Zaaraoui J, Gasmi A, Jeridi G, Ammar H. Impact of diabetes on mortality after myocardial infarction. *Ann Cardiol Angeiol.* **2005**; 54: 55-9.

Bourgeois B, Incagnoli P, Hanna J, Tirard V. Traitement par anticorps antidigitalique d'une intoxication volontaire par laurier rose. *Ann Fr Anesth Reanim.* **2005**, 24: 640-642.

Boyer EW, Shannon M. Treatment of calcium-channelblocker intoxication with insulin infusion. *N Engl J Med.* **2001**; 344: 1721-1722.

Boyer EW, Duic PA, Evans A. Hyperinsulinemia/euglycemia therapy for calcium channel blocker poisoning. *Pediatr Emerg Care.* **2002**; 18: 36-37.

Brix-Christensen V, Andersen SK, Andersen R, Mengel A, Dyhr T, Andersen NT, Larsson A, Schmitz O, Ørskov H, Tønnesen E. Acute hyperinsulinemia restrains endotoxin-induced systemic inflammatory response: an experimental study in a porcine model. *Anesthesiology.* **2004**; 100: 861-870.

Bronstein AC, Spyker DA, Cantilena Jr LR, Green JL, Rumack BH, Heard SE. American Association of Poison Control Centers, 2007 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 25th Annual Report. *Clin Toxicol (Phila).* **2008**; 46: 927-1057.

Burke EP, Sanders KM, Horowitz B. Sodium pump isozymes are differentially expressed in electrically dissimilar regions of colonic circular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1991**; 88:2370-2374.

C

Capeau J. Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *Médecine et Sciences.* **2003**; 19: 834-839.

Capeau J, Bastard JP, Vigouroux C. Syndrome métabolique et insulino-résistance : physiopathologie. *MT Cardio.* **2006**; 2: 155-164.

Capeau J, Desbois-Mouthon C, Magré J, Caron M, Vigouroux C, Lascols O, Cherqui G. Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'action de l'insuline. Application à la physiologie et à la pathologie. *Nutr Clin et Métab.* **1996**; 10: 231-242.

Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Gerstein HC. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes : a systematic overview. *The Lancet.* **2000**; 355: 773-778.

Caroll JS, Seely EW, Tao QF, Graves SW. Digitalis-like factor response to hyperinsulinemia accompany euglycemic hyperinsulinemic clamp or oral glucose tolerance. *Life Sci.* **2001**; 69: 829-837.

CDCP (Centers for Disease Control and Prevention). Increase in poisoning deaths caused by non-illicit drugs, Utah, 1991–2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **2005**; 54: 33-36.

Chadli-Chaieb M, Ould Mustapha M, Ezzidi I, Mtiraoui N, Mahjoub T, Chaieb L. Polymorphismes - 6754G/5G et -844G/A du gène du PAI-1 (Plasminogène Activator Inhibitor-1) chez les diabétiques de type 2, en Tunisie. *Diabetes Metab.* **2009**; 35: 57.

Chalon S, Grimaldi A. Essential arterial hypertension and insulin. *STV.* **1995**; 7: 595-605.

Chaudhuri A, Janicke D, Wilson MF, Tripathy D, Garg R, Bandyopadhyay A, Calieri J, Hoffmeyer D, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Anti-inflammatory and profibrinolytic effect of insulin in acute ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation.* **2004**; 109: 849-854.

Chibalin AV. Regulation of the Na,K-ATPase: Special implications for cardiovascular complications of metabolic syndrome. *Pathophysiology.* **2007**; 14: 153-158.

Coggins M, Lindner J, Rattigan S, Jahn L, Fasy E, Kaul S, Barrett E. Physiologic hyperinsulinemia enhances human skeletal muscle perfusion by capillary recruitment. *Diabetes.* **2001**; 50: 2682-2690.

Coleman GM, Gradinac S, Taegtmeyer H, Sweeney M, Frazier OH. Efficacy of metabolic support with glucose-insulin-potassium for left ventricular pump failure after aortocoronary bypass surgery. *Circulation.* **1989**; 80: 91-96.

Collet JP, Montalescot G, Vicaut E, Ankri A, Walylo F, Lesty C, Choussat R, Beygui F, Borentain M, Vignolles N, Thomas D. Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality. *Circulation.* **2003**; 108: 391-394.

Collins JH, Forbush B, 3rd, Lane LK, Ling E, Schwartz A, Zot A. Purification and characterization of an (Na⁺ + K⁺)-ATPase proteolipid labeled with a photoaffinity derivative of ouabain. *Biochim Biophys Acta.* **1982**; 686: 7-12.

Čolović M, Krstić D, Krinulović K, Momić T, Savić J, Vujačić A, Vasić V. Na,K-ATPase : activity and inhibition. *Russ J Phys Chem.* **2009**; 83: 1602-1608.

Cooke DM. The use of central nervous system manifestations in the early detection of digitalis toxicity. *Heart Lung.* **1993**; 22: 477-481.

Cotter MA, Ekberg K, Wahren J, Cameron NE. Effects of proinsulin C-peptide in experimental diabetic neuropathy: vascular actions and modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Diabetes.* **2003**; 52: 1812-1817.

Cottrel M, Nguyen BV, Guillouët M, Deredec R, Pondaven E, L'Azou D, Arvieux CC, Gueret G. Les émulsions lipidiques dans les intoxications aux stabilisants de membrane. *Réanimation.* **2008**; 17: 670-675.

Cumpston K, Mycyk M, Pallasch E, Manzanares M, Knight J, Aks S, Hryhorczuk D. Failure of Hyperinsulinemia/Euglycemia Therapy in Severe Diltiazem Overdose. *J Toxicol Clin Toxicol.* **2002**; 40: 618. [Abstract]

D

Dally S, Alperovitch A, Lagier G, Bismuth C, Fournier E. Facteurs pronostiques de l'intoxication digitaliques aiguë. *Nouv Presse Med.* **1981**; 10: 2257-2260.

Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab.* **2001**; 86: 3257-3265.

Darmaun D. Insuline, diabète et métabolisme des acides aminés. Flammarion Médecine Sciences - Journées De Diabétologie. **2002**: 105-115.
<http://journees.hotel-dieu.com/page10094.asp>

Das UN. Is insulin an antiinflammatory molecule? *Nutrition.* **2001**; 17: 409-413.

Dawson D, Vincent MA, Barrett EJ, Kaul S, Clark A, Leong-Poi H, Lindner JR. Vascular recruitment in skeletal muscle during exercise and hyperinsulinemia assessed by contrast ultrasound. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2002**; 282: 714-720.

Dawson A, Buckley N. Digoxin. *Medicine.* **2007**; 35: 613-614.

De Feo P, Gan-Gaisano M, Haymond MW. Differential effects of insulin deficiency on albumin and fibrinogen synthesis in humans. *J Clin Invest.* **1991**; 88: 833-840.

De Meyts P. Le récepteur à l'insuline : structure et fonction. *Rev Med Liege.* **2005**; 60: 286-290.

Delprat B, Bibert S, Geering K. FXYD proteins: novel regulators of Na,K-ATPase. *Med Sci (Paris).* **2006**; 22: 633-638.

Devos P. Effets propres de l'insuline par rapport au contrôle glycémique. *Réanimation.* **2008**; 17: 8-11.

DeWitt CR, Waksman JC. Pharmacology, pathophysiology and management of calcium channel blocker and betablocker toxicity. *Toxicol Rev.* **2004**; 23: 223-238.

Djemli-Shipkolye A, Gallice P, Coste T, Jannot MF, Tsimaratos M, Raccach D, Vague P. The effects *ex vivo* and *in vitro* of insulin and C-peptide on Na/K adenosine triphosphatase activity in red blood cell membranes of type 1 diabetic patients. *Metabolism.* **2000**; 49: 868-872.

Dodson E. The before and afters of molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **2008**; 64: 17-24.

Dubuc A. Intoxication à la digoxine. *Pharmactuel.* **2000**; 33: 17-20.

Ducluzeau R, Parant F. Intoxications digitaliques. *Ens Sup Med - SFMU.* **2003**.
http://www.sfmou.org/fr/formation/cours_sup

E

Eddleston M, Ariaratnam CA, Meyer WP, Perera G, Kularatne AM, Attapattu S, Sheriff MH, Warrell DA. Epidemic of self-poisoning with seeds of the yellow oleander tree (*Thevetia peruviana*) in northern Sri Lanka. *Trop Med Int Health.* **1999**; 4: 266-273.

Eddleston M, Rajapakse S, Rajakanthan, Jayalath S, Sjoström L, Santharaj W, Thenabadu PN, Sheriff MH, Warrell DA. Anti-digoxin Fab fragments in cardiotoxicity induced by ingestion of yellow oleander: a randomised controlled trial. *Lancet*. **2000**; 355: 967-972.

Eddleston M, Senarathna L, Mohamed F, Buckley N, Juszczak E, Sheriff MH, Ariaratnam A, Rajapakse S, Warrell D, Rajakanthan K. Deaths due to absence of an affordable antitoxin for plant poisoning. *Lancet*. **2003**; 362: 1041-1044.

Eichhorn EJ, Gheorghide M. Digoxin. *Prog Cardiovasc Dis*. **2002**; 44: 251-266.

Ewart HS, Klip A. Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol*. **1995**; 269: 295-311.

F

Fagerstam LG, Frostell-Karlsson A, Karlsson R, Persson B, Ronnberg I. Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J Chromatogr*. **1992**; 597: 397-410.

Faller LD. Mechanistic studies of sodium pump. *Arch Biochem Biophys*. **2008**; 476: 12-21.

Farah AE, Alousie AA. The actions of insulin on cardiac contractility. *Life Sci*. **1981**; 29: 975-1000.

Fisher BM, Gillen G, Dargie HJ, Inglis GC, Frier BM. The effects of insulin-induced hypoglycemia on cardiovascular function in normal man: studies using radionuclide ventriculography. *Diabetologia*. **1987**; 30: 841-845.

Forbush BIII, Kaplan JH, Hoffman JF. Characterization of Addition of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase. *Biochemistry*. **1978**; 17: 3667-3676.

Forst T, De La Tour DD, Kunt T, Pfützner A, Goitom K, Pohlmann T, Schneider S, Johansson BL, Wahren J, Löbig M, Engelbach M, Beyer J, Vague P. Effects of proinsulin C-peptide on nitric oxide, microvascular blood flow and erythrocyte Na⁺, K⁺-ATPase activity in diabetes mellitus type I. *Clin Sci*. **2000**; 98: 283-290.

Fréjaville JP, Bismuth C, Conso F. *Toxicologie clinique*. Flammarion Médecine-Sciences, 3^e édition. **1971**: 155-165.

G

Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*. **2002**; 105: 1497-1502 .

Gaultier M, Fournier E, Efthymiou ML, Frejaville JP, Jouannot P, Dentan M. Acute digitalis poisoning (70 cases). *Bull Mem Soc Med Hop Paris*. **1968**; 119: 247-274.

Geering K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J Bioenerg Biomembr*. **2001**; 33: 425-438.

Geering K. Function of FXYD proteins, regulators of Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*. **2005**; 37: 387-392.

Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol.* **2006**; 290: 241-250.

Gérard JL, Lehoux P, Lepage O. Intoxications graves par les cardiotropes. Conférence d'actualisation. Edition scientifique et médicale Elsevier SAS, et SFAR. **2002**: 555-571.

Gittelman MA, stephan M, perry H. Acute pediatric digoxin ingestion. *Pediatr Emerg Care.* **1999**; 15: 359-362.

Gottlieb RA, Engler RL. Apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann N Y Acad Sci.* **1999**; 874: 412-426.

Graudins A, Najafi J, Rur-SC MP. Treatment of experimental verapamil poisoning with levosimendan utilizing a rodent model of drug toxicity. *Clin Toxicol (Phila).* **2008**; 46: 50-56.

Greene SL, Gawarammana I, Wood DM, Jones AL, Dargan PI. Relative safety of hyperinsulinaemia/euglycaemia therapy in the management of calcium channel blocker overdose: a prospective observational study. *Intensive Care Med.* **2007**; 33: 2019-2024.

Grimaldi A and Hartemann-Heurtier A. Une hyperglycémie en unité de soins intensifs : Quel traitement de l'hyperglycémie au cours de l'infarctus du myocarde chez le patient diabétique? *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu.* **2003**; 195-216.

Gueye PN, Lofaso F, Borron SW, Mellerio F, Vicaut E, Harf A, Baud FJ. Mechanism of respiratory insufficiency in pure or mixed drug-induced coma involving benzodiazepines. *J Toxicol Clin Toxicol.* **2002**; 40: 35-47.

H

Haddock PS, Woodward B, Hearse DJ. Cardiac Na⁺/K⁺ ATPase activity and its relation to myocardial glutathione status: studies in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* **1995**; 27: 1185-1194.

Hansen PS, Buhagiar KA, Gray DF, Rasmussen HH. Voltage-dependent stimulation of the Na⁺-K⁺ pump by insulin in rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2000**; 278: 546-553.

Hantson P. Insuline-glucose dans les intoxications par cardiotropes. 44^{ème} congrès de la STC, Angers : 23 - 24 Novembre **2006**. [Abstract] (a)
<http://www.toxicologie-clinique.org/>

Hantson P, Bédry R. Les antidotes. *Réanimation.* **2006**; 15: 383-389. (b)

Hardwicke PM, Freytag JW. A proteolipid associated with Na,K-ATPase is not essential for ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **1981**; 102: 250-257.

Harris NS. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 24-2006. A 40-year-old woman with hypotension after an overdose of amlodipine. *N Engl J Med.* **2006**; 355: 602-611.

Harry P. Epidémiologies des intoxications volontaires. 37^{ème} congrès de la SRLF, Paris : 14-16 Janvier **2009**. [Communication orale]
<http://www.srlf.org/04-congres/2009/3923/indexConf.asp>

Hasin T, Leibowitz D, Antopolsky M, Chajek-Shaul T. The use of low-dose insulin in cardiogenic shock due to combined overdose of verapamil, enalapril and metoprolol. *Cardiology.* **2006**; 106: 233-236.

Haux J. Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Med Hypotheses*. **1999**; 53: 543-548.

Henry JA. Epidemiology and relative toxicity of antidepressant drugs in overdose. *Drug Saf*. **1997**; 16: 374-390.

Herbert JX, O'Malley C, Tracey JA, Dwyer R, Power M. Verapamil overdose unresponsive to dextrose/insulin therapy. *J Toxicol Clin Toxicol*. **2001**; 39: 293-294. [Abstract]

Hickey AR, Wenger TL, Carpenter VP, Tilson HH, Hlatky MA, Furberg CD, Kirkpatrick CH, Strauss HC, Smith TW. Digoxin immune Fab therapy in the management of digitalis intoxication: safety and efficacy results of an observational surveillance study. *J Am Coll Cardiol*. **1991**; 17: 590-598.

Hoogwerf BJ, Bantle JP, Gaenslen HE, Greenberg BZ, Senske BJ, Francis R, Goetz FC. Infusion of synthetic human C-peptide does not affect plasma glucose, serum insulin, or plasma glucagons in healthy subjects. *Metabolism*. **1986**; 35: 122-125.

Hu D, Kipps TJ. Reduction in mitochondrial membrane potential is an early event in Fas-independent CTL-mediated apoptosis. *Cell Immunol*. **1999**; 195: 43-52.

I

Ingels C, Vanhorebeek I, Langouche L, VandenBerghe G. Rôle de l'insuline et du contrôle de la glycémie en réanimation. *Réanimation*. **2006**; 15: 474-480.

Isacson G, Wasserman D, Bergman U. Self-poisonings with antidepressants and other psychotropics in an urban area of Sweden. *Ann Clin Psychiatry*. **1995**; 7: 113-118.

Isetta C, Bernage F. les solutés cristalloïdes hypertonique en chirurgie cardiaque. *ITBM RBM*. **2005**; 26: 56-60.

J

Jan F. Traitement médicamenteux - Digitaliques *In Thérapeutiques en cardiologie*, Ed Elsevier Masson, Paris. **2004**: 82-83.

Jeschke MG, Klein D, Herndon DN. Insulin treatment improves the systemic inflammatory reaction to severe trauma. *Ann Surg*. **2004**; 239: 553-560. (a)

Jeschke MG, Klein D, Bolder U, Einspanier R. Insulin attenuates the systemic inflammatory response in endotoxemic rats. *Endocrinology*. **2004**; 145: 4084-4093. (b)

Jorgensen PL, Nielsen JM, Rasmussen JH, Pedersen PA. Structure-function relationships of E1-E2 transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim Biophys Acta*. **1998**; 1365: 65-70.

Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol*. **2003**; 65: 817-849.

K

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. **2005**; 26: 439-451.

- Kaplan JH. Ion movements through the sodium pump. *Annu Rev Physiol.* **1985**; 47: 535-544.
- Kassel D. Des pharmaciens dans leur siècle, le XIXe. Collection d'histoire de la pharmacie, ordre des pharmaciens. **2002**; 1-10.
<http://www.ordre.pharmacien.fr/upload/Syntheses/98.PDF>
- Keenan SM, DeLisle RK, Welsh WJ, Paula S, Ball WJ Jr. Elucidation of the Na⁺, K⁺-ATPase digitalis binding site. *J Mol Graph Model.* **2005**; 23: 465-475.
- Kelly RA, Smith TW. Recognition and management of digitalis toxicity. *Am J Cardiol.* **1992**; 69: 108-118.
- Kerns W 2nd, Schroeder D, Williams C, Tomaszewski C, Raymond R. Insulin improves survival in a canine model of acute beta-blocker toxicity. *Ann Emerg Med.* **1997**; 29: 748-757.
- Kitamura T, Kimura K, Makondo K, Furuya DT, Suzuki M, Yoshida T, Saito M. Proinsulin C-peptide increases nitric oxide production by enhancing mitogen-activated protein-kinase dependent transcription of endothelial nitric oxide synthase in aortic endothelial cells of Wistar rats. *Diabetologia.* **2003**; 46: 1698-1705.
- Kline JA, Tomaszewski CA, Schroeder JD, Raymond RM. Insulin is a superior antidote for cardiovascular toxicity induced by verapamil in the anesthetized canine. *J Pharmacol Exp Ther.* **1993**; 267: 744-750.
- Kline JA, Leonova E, Raymond RM. Beneficial myocardial metabolic effects of insulin during verapamil toxicity in the anesthetized canine. *Crit Care Med.* **1995**; 23: 1251-1263.
- Kline JA, Leonova E, Williams TC, Schroeder JD, Watts JA. Myocardial metabolism during graded intraportal verapamil infusion in awake dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* **1996**; 27: 719-726.
- Kline JA, Raymond RM, Leonova ED, Williams TC, Watts JA. Insulin improves heart function and metabolism during non-ischemic cardiogenic shock in awake canines. *Cardiovasc Res.* **1997**; 34: 289-298.
- Kometiani P, Liu L, Askari A. Digitalis-induced signaling by Na,K-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol.* **2005**; 67: 929-936.
- Krogh-Madsen R, Møller K, Dela F, Kronborg G, Jauffred S, Pedersen BK. Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the response of IL-6, TNF-alpha, and FFAs to low-dose endotoxemia in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2004**; 286: 766-772.
- Krukenkamp I, Sørli D, Silverman N, Pridjian A, Levitsky S. Direct effect of high-dose insulin on the depressed heart after beta-blockade or ischemia. *Thorac Cardiovasc Surg.* **1986**; 34: 305-309.
- Kurowska M, Malicka J, Tarach JS, Jankowska H, Kudlicki J. Comparison of C-peptide concentrations in acute coronary syndromes (ACS) in patients without known diabetes and with type 2 diabetes mellitus - preliminary report. *Annales UMCS, Pharmacia.* **2008**; 64: 339-342.

L

- Labourel H, Ladwig M, Maurin C, Saviuc P, Daniel V, Loizzo F, Menthonnex E. Analyse épidémiologiques des intoxications médicamenteuses volontaires aiguës : prise en charge par un service mobile d'urgence et de réanimation. *Rev Med Liege.* **2006**; 61: 185-189.

Lambert H, Manel J, Bellou A, El Kouch S. Morbidité et mortalité par intoxications médicamenteuses aiguës en France. *Rev Prat.* **1997**; 47: 716-720.

Lamere F. les inotropes en medecine veterinaire canine. Thèse Méd Vét, Alfort. **2005**.
<http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=627>

Lapostolle F. Les intoxications médicamenteuses aiguës. *Rev Prat.* **1997**; 47: 760-762.

Lapostolle F, Haouache H, Adnet F. Intoxications par les cardiotropes... panorama 2006. 44ème congrès de la STC, Angers : 23 - 24 Novembre **2006**. [Abstract]
<http://www.toxicologie-clinique.org/stc2006/stcorale2angers.pdf>

Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol.* **1994**; 266: 319-334.

Lefranc F, Kiss R. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia.* **2008**; 10: 198-206.

Lefranc F, Mijatovic T, Kiss R. La pompe à sodium pourrait représenter une nouvelle cible pour le traitement des glioblastomes. *Bull Cancer.* **2008**; 95 : 271-281.

Levine MD, Boyer E. Hyperinsulinemia-euglycemia therapy: a useful tool in treating calcium channel blocker poisoning. *Crit Care.* **2006**; 10: 149-150.

Levine M, Nikkanen H, Pallin DJ. The Effects of Intravenous Calcium in Patients with Digoxin Toxicity. *J Emerg Med.* **2009**. [Article in Press]

Lheureux PE, Zahir S, Gris M, Derrey AS, Penalzoza A. Bench-to-bedside review: Hyperinsulinaemia/euglycaemia therapy in the management of overdose of calcium-channel blockers. *Crit Care.* **2006**; 10: 212.

Li C, Grosdidier A, Crambert G, Horisberger JD, Michielin O, Geering K. Structural and functional interaction sites between Na,K-ATPase and FXYD proteins. *J Biol Chem.* **2004**; 279: 38895-38902.

Lingrel JB. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. *J Bioenerg Biomembr.* **1992**; 24: 263-270.

Lingrel JB, Argüello JM, Van Huysse J, Kuntzweiler TA. Cation and cardiac glycoside binding sites of the Na,K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci.* **1997**; 834: 194-206.

Lingrel JB, Orlowski J, Shull MM, Price EM. Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **1990**; 38: 37-89.

Lingrel JB, van Huysse JV, O' Brien W, Jewell- Motz E, Askew R, Schultheis P. Structural-function studies of Na, K-ATPase. *Kidney Int.* **1994**; 45: 32-39.

Liu L, Mohammadi K, Aynafshar B, Wang H, Li D, Liu J, Ivanov AV, Xie Z, Askari A. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na⁺/K⁺-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2003**; 284: 1550-1560.

Lloyd MA, Sandberg SM, Edwards BS. Role of renal Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in the regulation of sodium excretion under normal conditions and in acute congestive heart failure. *Circulation.* **1992**; 85: 1912-1917.

Longhurst JC. Cardiac receptors: their function in health and disease. *Prog Cardiovasc Dis.* **1984**; 27: 201-222.

Longhurst JC, Ross J Jr. Extracardiac and coronary vascular effects of digitalis. *J Am Coll Cardiol.* **1985**; 5: 99-105.

Longo N. Insulin stimulates the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase and the Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter of human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* **1996**; 1281: 38-44.

Longo N, Scaglia F, Wang Y. Insulin increases the turnover rate of Na⁺-K⁺-ATPase in human fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2001**; 280: 912-919.

López-Lázaro M. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. *Expert Opin Ther Targets.* **2007**; 11: 1043-1053.

Love JN. Beta-blocker toxicity : a clinical diagnosis. *Am J Emerg Med.* **1994**; 12: 356-357.

Love JN, Howell JM, Litovitz TL, Klein-Schwartz W. Acute beta blocker overdose: factors associated with the development of cardiovascular morbidity. *J Toxicol Clin Toxicol.* **2000**; 38: 275-281.

Lucchesi BR, Medina M, Kniffen FJ. The positive inotropic action of insulin in the canine heart. *Eur J Pharmacol.* **1972**; 18: 107-115.

M

Ma G, Brady WJ, Pollack M, Chan TC. Electrocardiographic manifestations: digitalis toxicity. *J Emerg Med.* **2001**; 20: 145-152.

Magnan C, Ktorza A. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC – Endocrinologie.* **2005**; 2: 241-264

Mahdyoon H, Battilana G, Rosman H, Goldstein S, Gheorghide M. The evolving pattern of digoxin intoxication: observations at a large urban hospital from 1980 to 1988. *Am Heart.* **1990**; 120: 1189-1194.

Maier S, Aulbach F, Simm A, Lange V, Langenfeld H, Behre H, Kersting U, Walter U, Kirstein M. Stimulation of L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovasc Res.* **1999**; 44: 390-397.

Maitai CK, Njoroge DK, Munenge RW. Interaction between nifedipine and digoxin in rats. *East Afr Med J.* **1995**; 72: 75-76.

Malmberg K. Prospective randomised study of intensive insulin treatment on long term survival after acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. DIGAMI (Diabetes Mellitus, Insulin Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction) Study Group. *BMJ.* **1997**; 314: 1512-1515.

Manoach SM, Hamilton RJ. Amrinone and verapamil overdose study design. *Acad Emerg Med.* **1997**; 4: 839-840.

Marasciulo FL, Montagnani M, Potenza MA. Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr Med Chem.* **2006**; 13: 1655-1665.

Markey F. What is SPR anyway? *BIA journal.* **1999**; 6: 14-17.

Marques RG, Fontaine MJ, Rogers J. C-peptide: much more than a byproduct of insulin biosynthesis. *Pancreas*. **2004**; 29: 231-238.

Marques I, Gomes E, de Oliveira J. Treatment of calcium channel blocker intoxication with insulin infusion: case report and literature review. *Resuscitation*. **2003**; 57: 211-213.

Matsui H, Schwartz, A. ATP-dependent binding of H³-digoxin to a Na + K⁺-ATP-ase from cardiac muscle. *Fed Proc*. **1967**; 26: 398.

Matsui H, Schwartz A. Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the (Na⁺-K⁺)-dependent ATPase from cardiac tissue. *Biochim Biophys Acta*. **1968**; 151:655-663.

Mavrakanas T, Bastide D. Peptide C : un coproduit de la biosynthèse de l'insuline ou une hormone peptidique active ? *La Presse Médicale*. **2009**; 38: 68-72.

McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, Izumo S. Phosphoinositide 3-kinase (p110 α) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003**; 100: 12355-12360.

Mégarbane B, Baud FJ. Assistance circulatoire au cours des intoxications par cardiotropes. **2006**.

<http://www.toxicologie-clinique.org/stc2006/stcorale1angers.pdf>

Mégarbane B, Baud FJ. Intoxication par inhibiteur calcique : Une intoxication sévère avec des traitements spécifiques en cours de développement. *Urgence pratique*. **2008**; 86: 5-10.

Mégarbane B, Deye N, Baud FJ. Assistance circulatoire périphérique au cours des intoxications aiguës par cardiotropes. *Réanimation*. **2009**; 18: 428-438.

Mégarbane B, Donetti L, Blanc T, Chéron G, Jacobs F and Groupe d'experts de la SRLF. Intoxications graves par médicaments et substances illicites en réanimation. *Réanimation*. **2006**; 15: 332-342.

Mégarbane B, Karyo S, Baud FJ. The role of insulin and glucose (hyperinsulinaemia/ euglycaemia) therapy in acute calcium channel antagonist and beta-blocker poisoning. *Toxicol Rev*. **2004**; 23: 215-222. (a)

Mégarbane B, Karyo S, Baud F. Intoxications aiguës par les bêta-bloquants : aspects cliniques et thérapeutiques. *Ann Toxicol Anal*. **2004**; 4: 245-251. (b)

Meek SE, Persson M, Ford GC, Nair KS. Differential regulation of amino acid exchange and protein dynamics across splanchnic and skeletal muscle beds by insulin in healthy human subjects. *Diabetes*. **1998**; 47: 1824-1835.

Mehta SR, Yusuf S, Díaz R, Zhu J, Pais P, Xavier D, Paolasso E, Ahmed R, Xie C, Kazmi K, Tai J, Orlandini A, Pogue J, Liu L; CREATE-ECLA Trial Group Investigators. Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial. *JAMA*. **2005**; 293: 437-446.

Mekhail T, Kaur H, Ganapathi R, Budd GT, Elson P, Bukowski RM. Phase 1 trial of Anvirzel in patients with refractory solid tumors. *Invest New Drugs*. **2006**; 24: 423-427.

Meyer C, Schwaiger M. Myocardial blood flow and glucose metabolism in diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. **1997**; 80: 94-101.

Meyer M, Stremski E, Scanlon M. Verapamil-induced hypotension with dextrose-insulin. *J Toxicol Clin Toxicol*. **2001**; 39: 500.

Meyer MT, Stremski E, Scanlon MC. Successful resuscitation of a verapamil intoxicated child with a dextrose-insulin infusion. *Clin Intensive Care*. **2003**; 14: 109-113.

Michael DJ, Ritzel RA, Haataja L, ChowRH. Pancreatic beta-cells secrete insulin in fast- and slow-release forms. *Diabetes*. **2006**; 55: 600-607.

Mijatovic T, Mathieu V, Gaussin JF, De Nève N, Ribaucour F, Van Quaquebeke E, Dumont P, Darro F, Kiss R. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia*. **2006**; 8: 402-412.

Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. **2007**; 1776: 32-57.

Mikhailova L, Mandal AK, Argüello JM. Catalytic phosphorylation of Na,K-ATPase drives the outward movement of its cation-binding H5-H6 hairpin. *Biochemistry*. **2002**; 41: 8195-8202.

Miles PDG, Levisetti M, Reichart D, Khoursheed M, Moossa AR, Olefsky JM. Kinetics of insulin action *in vivo*: identification of rate-limiting steps. *Diabetes*. **1995**; 44: 947-953.

Min L, Deshpande K. Diltiazem overdose haemodynamic response to hyperinsulinaemia-euglycaemia therapy: a case report. *Crit Care Resusc*. **2004**; 6: 28-30.

Morgan O, Griffiths C, Baker A, Majeed A. Fatal toxicity of antidepressants in England and Wales 1993–2002. *Health Stat Q*. **2004**; 23: 18-24.

Morris-Kukoski CL, Biswas AK, Parra M, Smith. Insulin “euglycemia” therapy for accidental nifedipine overdose. Abstract. *J Toxicol Clin Toxicol*. **2000**; 38: 577. [Abstract]

Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sørensen TL, Petersen J, Andersen JP, Vilsen B, Nissen P. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*. **2007**; 450: 1043-1049.

Moucari R, Marcellin P, Asselah T. Stéatose au cours de l’hépatite chronique C : rôle de l’insulino-résistance et des facteurs viraux. *Gastroenterol Clin Biol*. **2007**; 31: 643-654.

Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev*. **2007**; 28: 463-491.

Murugavel P, Pari L, Sitasawad SL, Kumar S, Kumar S. Cadmium induced mitochondrial injury and apoptosis in *in vitro* cells: protective effect of diallyl tetrasulfide from garlic. *Int J Biochem Cell Biol*. **2007**; 39: 161-170.

N

Negre-Salvayre A, Salvayre R. Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : Implication en physiopathologie vasculaire. *OCL*. **2005**; 12: 433-438.

Nesher M, Shpolansky U, Rosen H, Lichtstein D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci*. **2007**; 80: 2093-2107.

Newman RA, Yang P, Pawlus AD, Block KI. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol Interv*. **2008**; 8: 36-49.

Nguyen B, Tanious FA, Wilson WD. Biosensor-surface plasmon resonance: Quantitative analysis of small molecule–nucleic acid interactions. *Methods*. **2007**; 42: 150-161.

Niggli V, Sigel E. Anticipating antiport in P-type ATPases. *Trends Biochem Sci*. **2008**; 33: 156-160.

O

O'Neill BT, Abel ED. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J Clin Invest*. **2005**; 115: 2059-2064.

Ogawa H, Shinoda T, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2009**; 106: 13742-13747.

Ohtomo Y, Aperia A, Sahlgren B, Johansson BL, Wahren J. C-peptide stimulates rat renal tubular Na⁺, K⁺-ATPase activity in synergism with neuropeptide Y. *Diabetologia*. **1996**; 39: 199-205.

Ohtomo Y, Bergman T, Johansson BL, Jörnvall H, Wahren J. Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na⁺, K⁺-ATPase activity of renal tubule segments. *Diabetologia*. **1998**; 41: 287-291.

Opie LH. Proof that glucose-insulin-potassium provides metabolic protection of ischaemic myocardium? *Lancet*. **1999**; 353: 768-769.

Orban JC, Deroche D, Ichai C. Septic shock: blood glucose regulation. *Ann Fr Anesth Reanim*. **2006**; 25: 275-279.

Orci L, Vassalli JD, Perrelet A. The insulin factory. *Sci Am*. **1988**; 259: 85-94.

Orlowski J, Lingrel JB. Differential expression of the Na, K-ATPase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits genes in a murine myogenic cell line. *J Biol Chem*. **1988**; 263: 17817-17821.

Ortiz-Munoz L, Rodriguez-Ospina LF, Figueroa-Gonzalez M. Hyperinsulinemic-euglycemic therapy for intoxication with calcium channel blockers. *Bol Asoc Med P R*. **2005**; 97: 182-189.

Oubaassine R, Bilbault P, Roegel JC, Alexandre E, Sigrist S, Lavaux T, Jaeger A, Pinget M, Kessler L. Cardio protective effect of glucose-insulin infusion on acute digoxin toxicity in rat. *Toxicology*. **2006**; 224: 238-243.

P

Parant F, Ducluzeau R, Lardet G, Gagnieu MC, Mouslma M. Suivi des digoxinémies chez les patients traités par fragments Fab antidigitaliques : un défi pour le biologiste. *Ann Biol Clin*. **2003**; 61: 645-653.

Pierce GN, Ganguly PK, Dzurba A, Dhalla NS. Modification of the function of cardiac subcellular organelles by insulin. *Adv Myocardiol*. **1985**; 6: 113-125.

Pigeyre M. Effets de l'insuline sur le système nerveux central. *Ann Endocr*. **2007**; 68: 73-88. [Abstracts]

Pizon AF, LoVecchio F, Matesick LD. Calcium channel blocker overdose: One center's experience. *J Toxicol Clin Toxicol*. **2005**; 43: 679-680. [Abstract]

Place R, Carslon A, Leiken J, Hanashiro P. Hyperinsulin therapy in the treatment of verapamil overdose. *J Toxicol Clin Toxicol.* **2000**; 38: 577-578. [Abstract]

Plewa MC, Martin TG, Menegazzi JJ, Seaberg DC, Wolfson AB. Hemodynamic effects of 3, 4-diaminopyridine in a swine model of verapamil toxicity. *Ann Emerg Med.* **1994**; 23: 499-507.

Plum L, Belghart BF, Brüning JC. Central insulin action in energy and metabolism. *J Clin Invest.* **2006**; 116: 1761-1767.

Pocas ES, Costa PR, da Silva AJ, Noel F. 2-Methoxy-3,8,9-trihydroxy coumestan: a new synthetic inhibitor of Na⁺,K⁺-ATPase with an original mechanism of action. *Biochem Pharmacol.* **2003**; 66: 2169-2176.

Pohler HF. A little goes a long way: Clinical management of calcium channel blocker overdose. *J Emerg Nurs.* **2006**; 32: 347-349.

Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, Montagnani M. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2005**; 289: 813-822.

Prassas I, Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov.* **2008**; 7: 926-935.

R

Rami L, Giunti C, Mebazaa A, Ichai C. Choc cardiogénique : quel ionotrope choisir. In : Sfar éditeur. Conférences d'actualisation. 46^e Congrès national d'anesthésie et de réanimation. **2004**: 425-440.

Rasmussen L, Husted SE, Johnsen SP. Severe intoxication after an intentional overdose of amlodipine. *Acta Anaesthesiol Scand.* **2003**; 47: 1038-1040.

Rebsomen L, Pitel S, Boubred F, Buffat C, Feuerstein JM, Raccach D, Vague P, Tsimaratos M. C-peptide replacement improves weight gain and renal function in diabetic rats. *Diabetes Metab.* **2006**; 32: 223-228.

Reikeras O, Gunnes P, Sorlie D, Ekroth R, Jorde R, Mjos OD. Haemodynamic effects of low and high doses of insulin during beta-receptor blockade in dogs. *Clin Physiol* **1985**; 5: 455-467. **(a)**

Reikeras O, Gunnes P, Sorlie D, Ekroth R, Mjos OD. Metabolic effects of low and high doses of insulin during beta-receptor blockade in dogs. *Clin Physiol* **1985**; 5: 469-478. **(b)**

Reikeras O, Gunnes P, Sorlie D, Ekroth R, Jorde R, Mjos OD. Haemodynamic, effects of high doses of insulin during acute left ventricular failure in dogs. *Eur Heart J.* **1985**; 6: 451-457. **(c)**

Ren J, Sowers JR, Natavio M, Brown RA. Influence of age on inotropic response to insulin and insulin-like growth factor I in spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1999**; 221: 46-52.

Repke KR, Megges R, Weiland J, Schön R. Location and properties of the digitalis receptor site in Na⁺/K⁺-ATPase. *FEBS Lett.* **1995**; 359:107-109.

Reeves AS, Collins JH, Schwartz A. Isolation and characterization of (Na,K)-ATPase proteolipid. *Biochem Biophys Res Commun.* **1980**; 95: 1591-1598.

Rich RL, Myszka DG. BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *J Mol Recognit.* **2001**; 14: 223-228.

Rigler R, Pramanik A, Jonasson P, Kratz G, Jansson OT, Nygren P, Ståhl S, Ekberg K, Johansson B, Uhlén S, Uhlén M, Jörnvall H, Wahren J. Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**; 96: 1318-1323.

Rorsman P, Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* **2003**; 46: 1029-1045.

S

Salhanick SD, Shannon MW. Management of calcium channel antagonist overdose. *Drug Saf.* **2003**; 26: 65-79.

Sharma A, Tefera L, Aminzay A. Toxicity, beta blocker. **2009**.
<http://emedicine.medscape.com/article/813342-overview>

Sakaue S, Nishihira J, Hirokawa J, Yoshimura H, Honda T, Aoki K, Tagami S, Kawakami Y. Regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes *in vitro*. *Mol Med.* **1999**; 5: 361-371.

Sampson SR, Brodie C, Alboim SV. Role of protein kinase C in insulin activation of the Na-K pump in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol.* **1994**; 266: 751-758.

Sanger F, Thompson EO. The amino-acid sequence in the glycol chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J.* **1953**; 53: 366-374.

Sanger F, Thompson EO. The amino-acid sequence in the glycol chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates, *Biochem J.* **1953**; 53: 353-366.

Satomi N, Sakurai A, Haranaka K. Relationship of hypoglycemia to tumor necrosis factor production and antitumor activity: Role of glucose, insulin, and macrophages. *J Natl Cancer Inst.* **1985**; 74: 1255-1260.

Sauder P. Prise en charge médicamenteuse des intoxications par cardiotoxiques (digitaliques exclus). **2006**.
<http://www.toxicologie-clinique.org/stc2006/stcorale1angers.pdf>

Sauder P, Le Tacon S, Kara F. Intoxications par antiarythmiques de classe I et inhibiteurs calciques. Enseignements supérieurs Médecins, Urgences. **2003**.
www.sfm.u.org/fr/formation/cours_sup/telecharger/?id=18

Sauvé R. Le patch clamp : une nouvelle façon de voir les canaux ioniques. *Med Sci (Paris).* **1987**; 3: 538-545.

Saviuc P, Hanna J, Danel V. Epidémiologie des intoxications : plus de 2000 décès par an. *Rev Prat.* **1999**; 481: 2054-2057.

Schaumann W, Kaufmann B, Neubert P, Smolarz A. Kinetics of the Fab fragments of digoxin antibodies and of bound digoxin in patients with severe digoxin intoxication. *Eur J Clin Pharmacol.* **1986**; 30: 527-533.

Scheiner-Bobis G, Farley RA. Subunit requirements for expression of functional sodium pumps in yeast cells. *Biochim Biophys Acta*. **1994**; 1193, 226-234.

Scheiner-Bobis G. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur J Biochem*. **2002**; 269: 2424-2433.

Schramm M, Klieber HG, Daut J. The energy expenditure of actomyosin-ATPase, Ca(2+)-ATPase and Na+,K(+)-ATPase in guinea-pig cardiac ventricular muscle. *J Physiol*. **1994**; 481: 647-662.

Schreiber D. Toxicity, Digitalis. *Emedicine*. **2008**.

<http://emedicine.medscape.com/article/814404-overview>

Schwartz A, Matsui H, Laughter AH. Tritiated digoxin binding to (Na+ + K+)-activated adenosine triphosphatase: possible allosteric site. *Science*. **1968**; 160:323-325.

Seronde MF. Digoxine - Digitoxine. **2005**.

<http://www.besancon-cardio.org/cours/62-digoxine-digitoxine.php>

Sharabani-Yosef O, Bak A, Langzam L, Lui Z, Nir U, Braiman L, Sweadner KJ, Sampson S. Rat skeletal muscle in culture expresses the alpha1 but not the alpha2 protein subunit isoform of the Na+/K+ pump. *J Cell Physiol*. 1999; 180: 236-244.

Shepherd G. Treatment of poisoning caused by betaadrenergic and calcium-channel blockers. *Am J Health Syst Pharm*. **2006**; 63: 1828-1835.

Shepherd G, Klein-Schwartz W. High-dose insulin therapy for calcium-channel blocker overdose. *Ann Pharmacother*. **2005**; 39: 923-930.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzamelis I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. **2006**; 116: 3015-3025.

Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*. **2005**; 115: 2108-2118.

Shiratori O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: *in vitro* and *in vivo* studies. *Gann*. **1967**; 58: 521-528.

Sima AA, Zhang W, Sugimoto K, Henry D, Li Z, Wahren J, Grunberger G. C-peptide prevents and improves chronic type 1 diabetic polyneuropathy in the BB/Wor rat. *Diabetologia*. **2001**; 44: 889-897.

Simpson CD, Mawji IA, Anyiwe K, Williams MA, Wang X, Venugopal AL, Gronda M, Hurren R, Cheng S, Serra S, Zavareh RB, Datti A, Wrana JL, Ezzat S, Schimmer AD. Inhibition of the sodium potassium adenosine triphosphatase pump sensitizes cancer cells to anoikis and prevents distant tumor formation. *Cancer Res*. **2009**; 69: 2739-2747.

Sirianni AJ, Osterhoudt KC, Calello DP, Muller AA, Waterhouse MR, Goodkin MB, Weinberg GL, Henretig FM. Use of lipid emulsion in the resuscitation of a patient with prolonged cardiovascular collapse after overdose of bupropion and lamotrigine. *Ann Emerg Med*. **2008**; 51: 412-415.

Skou JC. The Identification of the Sodium Pump. *Biosci Rep*. **2004**; 24: 436-451.

Sjöquist M, Huang W, Johansson BL. Effects of C-peptide on renal function at the early stage of experimental diabetes. *Kidney Int*. **1998**; 54: 758-764.

Smith NP, Crampin EJ. Development of models of active ion transport for whole-cell modelling: cardiac sodium-potassium pump as a case study. *Prog Biophys Mol Biol.* **2004**; 85: 387-405.

Smith TW, Haber E, Yeatman L, Buttler VP. Reversal of advanced digoxin intoxication with Fab fragments of digoxin-specific antibodies. *NEJM.* **1976**; 284: 797-800.

Spiller HA. Management of antidiabetic medications in overdose. *Drug Saf.* **1998**; 19: 411-424.

Stanton MG. Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of adenosine triphosphate. *Anal Biochem.* **1968**; 22: 27-34.

Sticherling C, Oral H, Horrocks J, Chough SP, Baker RL, Kim MH, Wasmer K, Pelosi F, Knight BP, Michaud GF, Strickberger SA and Morady F. Effects of digoxin on acute, atrial fibrillation-induced changes in atrial refractoriness. *Circulation.* **2000**; 102: 2503-2508.

Stenkvist B, Bengtsson E, Eriksson O, Holmquist J, Nordin B, Westman-Naeser S. Cardiac glycosides and breast cancer. *Lancet.* **1979**; 1: 563.

Stenkvist B, Bengtsson E, Eklund G, Eriksson O, Holmquist J, Nordin B, Westman-Naeser S. Evidence of a modifying influence of heart glucosides on the development of breast cancer. *Anal Quant Cytol.* **1980**; 2: 49-54.

Stenkvist B, Bengtsson E, Dahlqvist B, Eriksson O, Jarkrans T, Nordin B. Cardiac glycosides and breast cancer, revisited. *N Engl J Med.* **1982**; 306: 484.

Straub SG, Sharp GW. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev.* **2002**; 18: 451-463.

Sweadner KJ, McGrail KM, Khaw BA. Discoordinate regulation of isoforms of Na,K-ATPase and myosin heavy chain in the hypothyroid postnatal rat heart and skeletal muscle. *J Biol Chem.* **1992**; 267:769-773.

Sweadner KJ, Rael E. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics.* **2000**; 68:41-56.

Sweeney G, Klip A. Regulation of the Na,K-ATPase by insulin: why and how? *Mol Cell Biochem.* **1998**; 182: 121-133.

Sweeney G, Klip A. Mechanisms and consequences of Na⁺,K⁺-pump regulation by insulin and leptin. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* **2001**; 47: 363-372.

T

Taboulet P, Cariou A, Berdeaux A, Bismuth C. Pathophysiology and management of beta-blocker self poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol.* **1993**; 31: 531-552.

Taegtmeyer H. Metabolic support for the postischaemic heart. *Lancet.* **1995**; 345: 1552-1555.

Takebayashi K, Aso Y, Inukai T. Initiation of insulin therapy reduces serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* **2004**; 53: 693-699.

Thacker D, Sharma J. Digoxin toxicity. *Clin Pediatr (Phila).* **2007**; 46: 276-279.

Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2000**; 279: 541-566.

Therien AG, Pu HX, Karlsh SJ, Blostein R. Molecular and functional studies of the gamma subunit of the sodium pump. *J Bioenerg Biomembr.* **2001**; 33: 407-414.

Trouiller P, Oliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet.* **2002**; 359: 2188-2194.

Trovati M, Anfossi G, Cavalot F, Massucco P, Mularoni E, Emanuelli G: Insulin directly reduces platelet sensitivity to aggregating agents. *Studies in vitro and in vivo.* *Diabetes.* **1988**; 37: 780-786.

Tsimaratos M, Roger R, Chabardès D, Mordasini D, Hasler U, Doucet A, Martin PY, Féraillé E . C-peptide stimulates Na⁺-K⁺-ATPase activity via PKC alpha in rat medullary thick ascending limb. *Diabetologia.* **2003**; 46: 124-131.

Tsimaratos M. les effets physiologiques du peptide connecteur. *Arch Pediatr.* **2005**; 12: 442-448.

Tu CY, Hung SW, Tsou LT, Chang YC, Wang WS. Simultaneous flow cytometric assessment for cellular types and phagocytic abilities of the haemocytes of the hard clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Shellfish Immunol.* **2007**; 23: 16-23.

Tuncok Y, Hazan E, Oto O, Guven H, Catalyurek H, Kalkan S. Relationship between high serum digoxin levels and toxicity. *Int J Clin Pharmacol Ther.* **1997**; 35: 366-368.

U

Urtizbera M, Rochdi M, Sabouraud A, Bismuth C, Scherrmann JM. Relationship between red blood cell potassium and plasma digitoxin concentrations in intoxicated patients. *Pharmacol Toxicol.* **1991**; 68: 237-242.

V

Vacheron A, Le Feuvre C, Di Matteo J. les grandes thérapeutiques. In *Cardiologie* Ed Elsevier Masson. **1999**:721-722.

Vague P, Coste TC, Jannot MF, Raccach D, Tsimaratos M. C-peptide, Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase, and diabetes. *Exp Diabetes Res.* **2004**; 5: 37-50.

van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients, *N Engl J Med.* **2001**; 345: 1359-1367.

Van den Berghe G. How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? *J Clin Invest.* **2004**; 114: 1187-1195.

Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van Wijngaerden E, Bobbaers H, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med.* **2006**; 354: 449-461.

Vasilets LA, Schwarz W. Regulation of endogenous and expressed Na⁺/K⁺ pumps in *Xenopus* oocytes by membrane potential and stimulation of protein kinases. *J Membr Biol.* **1992**; 125: 119-132.

Vella V, Pandini G, Sciacca L, Mineo R, Vigneri R, Pezzino V, Belfiore A. A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates growth of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* **2002**; 87: 245-254.

Vér Â, Szanto I Bayasz T and Csemerly P, Vegh E, Somogyi J. Changes in the expression of Na⁺/K⁺ -ATPase isoenzymes in the left ventricle of diabetic rat hearts: effect of insulin treatment. *Diabetologia.* **1997**; 40: 1255-1262.

Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E, Kerb R, Brinkmann U, Jaillon P, Funck-Brentano C, Becquemont L. Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol.* **2003**; 58: 809-812.

Viardot A, SGrey ST, Mackay F, Chisholm D. Potential anti-inflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype. *Endocrinology.* **2007**; 148: 346-353.

Vincent MA, Dawson D, Clark AD, Lindner JR, Rattigan S, Clark MG, Barrett EJ. Skeletal muscle microvascular recruitment by physiological hyperinsulinemia precedes increases in total blood flow. *Diabetes.* **2002**; 51: 42-48.

Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Klivanov AL, Clark MG, Rattigan S, Barrett EJ. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake *in vivo*. *Diabetes.* **2004**; 53: 1418-1423.

Vollenweider P, Tappy L, Randin D, Schneiter P, Jéquier E, Nicod P, Scherrer U. Differential effects of hyperinsulinemia and carbohydrate metabolism on sympathetic nerve activity and muscle blood flow in humans. *J Clin Invest.* **1993**; 92: 147-154.

von Lewinski D, Bruns S, Walther S, Kogler H, Pieske B. Insulin causes [Ca²⁺]_i-dependent and [Ca²⁺]_i-independent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circulation.* **2005**; 111: 2588-2595.

von Mach MA, Gauer M, Meyer S, Omogbehin B, Schinzel H, Kann PH, Weilemann LS. Antidiabetic medications in overdose: a comparison of the inquiries made to a regional poisons unit regarding original sulfonylureas, biguanides and insuline. *Int J Clin Pharmacol Ther.* **2006**; 44: 51-56.

von Mach MA, Meyer S, Omogbehin B, Kann PH, Weilemann LS., Epidemiological assessment of 160 cases of insulin overdose recorded in a regional poisons unit. *Int J Clin Pharmacol Ther.* **2004**; 42: 277-280.

W

Wael AJ, Abdo RJ, Marwan EE, Maud TK, Khalil MB, Anwar BB. Endothelium and myocyte cellular insulin receptor alterations in a rat model of myocardial infarction. *Rev Can Physiol Pharmacol.* **2003**; 81: 267-273.

Wahren J. C-peptide: new findings and therapeutic implications in diabetes. *Clin Physiol Funct Imaging.* **2004**; 24: 180-189.

Walsh K. Akt signaling and growth of the heart. *Circulation.* **2006**; 113: 2032-2034.

Weil E, Sasson S, Gutman Y. Mechanism of insulin-induced activation of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase in isolated rat soleus muscle. *Am J Physiol.* **1991**; 261: 224-230.

Westerbacka J, Yki-Järvinen H, Turpeinen A, Rissanen A, Vehkavaara S, Syrjälä M, Lassila R. Inhibition of platelet-collagen interaction: an *in vivo* action of insulin abolished by insulin resistance in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2002**; 22: 167-172.

Wilffert B, Boskma RJ, van der Voort PH, Uges DR, van Roon EN, Brouwers JR. 4-Aminopyridine (fampridine) effectively treats amlodipine poisoning: a case report. *J Clin Pharm Ther.* **2007**; 32: 655-657.

Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Pol Pharm.* **2006**; 63: 109-115.

Wofford JL, Ettinger WH. Risk factors and manifestations of digoxin toxicity in the elderly. *Am J Emerg Med.* **1991**; 9: 11-15.

X

Xie Z, Askari A. Na (+)/K (+)-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem.* **2002**; 269: 2434-2439.

Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction : from protein interaction to cellular function. *Mol Interv.* **2003**; 3: 157-168.

Y

Yuan TH, Kerns 2nd WP, Tomaszewski CA, Ford MD, Kline JA. Insulin-glucose as adjunctive therapy for severe calcium channel antagonism poisoning, *J Toxicol Clin Toxicol.* **1999**; 37: 463-474.

Yatime L, Buch-Pedersen MJ, Musgaard M, Morth JP, Lund Winther AM, Pedersen BP, Olesen C, Andersen JP, Vilsen B, Schiøtt B, Palmgren MG, Møller JV, Nissen P, Fedosova N. P-type ATPases as drug targets: tools for medicine and science. *Biochim Biophys Acta.* **2009**; 1787: 207-220.

Z

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* **1996**; 183:1533-1544.

Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, Rey S, Hammers H, Chang D, Pili R, Dang CV, Liu JO, Semenza GL. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008**; 105: 19579-19586.

Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* **1996**; 98: 894-898.

**LISTE DES FIGURES
ET
LISTE DES TABLEAUX**

LISTE DE FIGURES

Figure 1 : Fréquence des intoxications par les cardiotropes dans différents services de réanimation.

Figure 2 : Suggestion d'algorithme de prise en charge de la toxicité cardiovasculaire induite par les bloqueurs de canaux calciques et par les bêta-bloquants.

Figure 3 : Rôle du calcium dans la contraction myocardique et effets des bêta adrénergiques (β -Ag), des bêtabloquants ainsi que des bloqueurs de canaux calciques.

Figure 4 : Algorithme de prise en charge des intoxications par bêtabloquant.

Figure 5 : Algorithme de prise en charge des intoxications par inhibiteurs calciques.

Figure 6 : Structure moléculaire de la digoxine, de la digitoxine et de l'ouabaïne.

Figure 7A : Source végétale : digitale laineuse (*Digitalis lanata*).

Figure 7B : Source végétale : digitale pourprée (*Digitalis purpurea*).

Figure 8 : La Na,K-ATPase : (A) structure et régulation ; (B) structure tridimensionnelle et localisation des sites de liaison avec les cations (Na et K) et les glycosides cardiaques.

Figure 9 : Schéma récapitulatif des principales conséquences du transport actif du Na^+ et du K^+ .

Figure 10 : Schéma de la structure et des sites d'interaction de différents composés avec les sous-unités de la Na,K-ATPase.

Figure 11 : Schéma de l'action inhibitrice des glycosides cardiaque sur la pompe Na,K-ATPase et ses conséquences sur le cardiomyocyte.

Figure 12 : Vue d'ensemble des effets de la digoxine.

Figure 13 : Cible d'action des glycosides cardiotoniques pour un effet anti cancéreux.

Figure 14 : Mécanisme d'action des fragments Fab anti-digitalique.

Figure 15 : Structure primaire de l'insuline humaine.

Figure 16 : Structure tridimensionnelle de l'insuline.

Figure 17 : Mécanismes de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas.

Figure 18 : Structure du récepteur à l'insuline.

Figure 19 : Schéma générale des voies de transduction du signal de l'insuline.

Figure 20 : Principaux facteurs humoraux et nerveux de contrôle de la sécrétion d'insuline.

Figure 21 : Voies de signalisation de l'insuline pour une action endothéliale.

Figure 22 : Mécanismes généraux envisagés d'interaction entre l'insuline et la Na/K-ATPase.

Figure 23 : Mécanismes moléculaires de la signalisation par l'insuline.

Figure 24 : Effets pléiotropes de l'insuline.

Figure 25 : Effets propres de l'insuline.

Figure 26 : Schéma des actions de l'insuline sur les vaisseaux et le système nerveux.

Figure 27 : Dispositif du branchement du modèle expérimental.

Figure 28 : Clamp euglycémique/hyperinsulinique 50 UI/kg/h.

Figure 29 : Clamp euglycémique/hyperinsulinique 100 UI/kg/h.

Figure 30 : Clamp euglycémique/hyperinsulinique 200 UI/kg/h.

Figure 31 : Evolution de la kaliémie au cours du clamp euglycémique/hyperinsulinique à 100 UI/kg/h.

Figure 32 : Modification ECG, clamp euglycémique/hyperinsulinique à 100 UI/kg/h d'insuline.

Figure 33 : Activité de la Na,K-ATPase en présence de digoxine sans et avec insuline à différentes concentrations.

Figure 34 : Effet de la digoxine sur les cellules MODE-K.

Figure 35 : Effet de l'insuline sur les cellules MODE-K en présence de digoxine.

Figure 36 : Effet de l'insuline sur les cellules MODE-K en présence d'ouabaïne.

Figure 37 : Schéma explicatif du principe de détection par résonance plasmonique de surface.

Figure 38 : Schéma de principe du BIACORE, sensorgramme associant le phénomène biochimique à la surface du capteur.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : classes des agents impliqués selon le type d'intoxications.

Tableau II : Répartition par classe médicamenteuse.

Tableau III : Intoxications par les cardiotropes (données statistiques des centres antipoison américains, année 2007).

Tableau IV : Principales propriétés des bêtabloquants.

Tableau V : Propriétés pharmacologiques des bloqueurs de canaux calciques.

Tableau VI : Pharmacocinétique des digitaliques disponibles par voie orale.

Tableau VII : Différence entre les origines des insulines.

Tableau VIII : Paramètres Hémodynamique de rat Témoin à To, AVANT la pose du cathéter et APRES la pose du cathéter.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	2
INTRODUCTION	4
1 ^{ère} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIE	6
I. Les intoxications médicamenteuses	7
1. Epidémiologies.....	7
2. Intoxication par les cardiotropes	9
3. Les antidotes	13
II. Effet de l'insuline au cours de l'intoxication aux cardiotropes.....	16
1. Bêtabloquants	16
1.1. Physiopathologie.....	16
1.2. Perfusion d'insuline-glucose lors d'une intoxication par bêtabloquants .	18
2. Les bloqueurs de canaux calciques (BCC).....	19
2.1. Physiopathologie.....	19
2.2. Perfusion d'insuline-glucose lors d'une intoxication les bloqueurs de canaux calciques	21
2.2.1. <i>Expérimentale</i>	21
2.2.2. <i>Cliniques</i>	21
3. Protocoles d'administration de l'insuline-glucose	23
III. Epidémiologie de l'intoxication à la digoxine	26
IV. Aspects pharmacologiques de la digoxine.....	28
1. Structure et origine de la molécule	28
2. Pharmacocinétique des digitaliques	30
3. Mécanismes d'action	31
3.1. Structure de la Na,K-ATPase.....	31
3.1.1. <i>La sous-unité α</i>	31

3.1.2. <i>La sous-unité β</i>	32
3.1.3. <i>La sous-unité γ</i>	33
3.2. Rôles de la Na,K-ATPase.....	35
3.3. Sites et modes d'action des glycosides cardiotoniques.....	36
4. Effets cliniques.....	39
4.1. Action sur le myocarde	39
4.2. Action vasculaire	39
4.3. Action sur le système nerveux autonome (SNA)	40
4.4. Manifestation électrocardiographique	40
4.5. Action diurétiques	41
5. Autres effet des glycosides cardiaques	43
6. L'intoxication digitalique.....	45
6.1. Incidence de l'intoxication aux digitaliques.....	45
6.2. Description clinique de l'intoxication digitalique.....	45
6.3. Physiopathologie de l'intoxication	47
6.4. Le traitement de l'intoxication.....	47
V. Aspects pharmacologiques de l'insuline.....	49
1. Structure	49
2. La sécrétion de l'insuline	51
3. Récepteur à l'insuline (RI)	52
4. Voies de signalisation	53
5. Régulation endogène de la sécrétion d'insuline.....	54
6. Effets généraux	55
6.1. Effets métaboliques	56
6.1.1. <i>Métabolisme glucidique</i>	56
6.1.2. <i>Métabolisme protéique</i>	56
6.1.3. <i>Métabolisme lipidique</i>	56
6.2. Effets non métaboliques.....	57
6.2.1. <i>L'insuline et l'inflammation</i>	57
6.2.2. <i>L'insuline et le système nerveux central</i>	58
6.2.3. <i>L'insuline et les électrolytes</i>	60
6.2.4. <i>Insuline et coagulation</i>	60
7. Insuline et cardiovasculaire.....	61

7.1. Effets sur l'endothélium.....	61
7.2. Effets sur le myocyte	62
7.2.1. <i>Effet inotrope positive</i>	62
7.2.2. <i>Effet sur la Na,K-ATPase</i>	62
VI. Effet de l'insuline au cours d'une intoxication à la digoxine.....	65
OBJECTIFS.....	67
2 ^{ème} PARTIE : TRAVAUX DE RECHERCHE.....	69
I. Mise en place d'un clamp euglycémique/hyperinsulinique.....	70
1. Matériel	70
1.1. <i>Animaux et anesthésie</i>	70
1.2. <i>Produits et matériels</i>	70
1.3. <i>Kit de dosage</i>	70
2. Méthodes	71
2.1. Conditionnement de l'animal.....	71
2.2. Suivi biologique	72
2.2.1. <i>Insulinémie</i>	72
2.2.2. <i>Glycémie</i>	72
2.2.3. <i>Kaliémie</i>	72
2.3. Clamp euglycémique/hyperinsulinique.....	72
3. Résultats.....	73
3.1. Perfusion de glucose et d'insuline.....	73
3.2. Suivi de la kaliémie au cours du clamp euglycémique/hyperinsulinique.....	75
3.3. Analyse des données électrocardiographiques	75
II. Effet du clamp euglycémique/hyperinsulinique sur une intoxication aiguë à la digoxine	78
1. Travail publié dans Toxicology	79
2. Discussion.....	86
2.1. Choix du modèle expérimental.....	86
2.1.1. <i>Dose et animal</i>	86
2.1.2. <i>Modèle d'infusion</i>	86

2.1.3. <i>Le post-traitement</i>	87
2.2. Observations expérimentales	87
2.2.1. <i>Motif du décès</i>	87
2.2.2. <i>Existence d'une hétérogénéité</i>	88
2.2.3. <i>La kaliémie</i>	89
III. Etude <i>in vitro</i> du mécanisme cellulaire des effets de l'insuline dans l'intoxication à la digoxine	90
1. Travail en soumission dans PNAS (2009)	91
2. Résultats complémentaires	117
2.1. Effet de l'insuline sur l'activité de la Na,K-ATPase	117
2.1.1. <i>Matériels et méthodes</i>	117
2.1.2. <i>Résultats</i>	118
2.2. Effet de l'insuline face à l'intoxication à digoxine sur des cellules MODE-K.....	119
2.2.1. <i>Choix du modèle</i>	119
2.2.2. <i>Résultats</i>	119
3. Discussion.....	123
3.1. L'enzyme isolée.....	123
3.1.1. <i>Choix du modèle</i>	123
3.1.2. <i>L'activité de la Na,K-ATPase</i>	123
3.1.3. <i>La résonance plasmon de surface</i>	124
3.2. La culture cellulaire	126
3.2.1. <i>Choix du modèle</i>	126
3.2.2. <i>Etude par cytométrie en flux</i>	126
3.2.3. <i>Etude par immunohistochimie</i>	127
3.3. Difficultés et limites.....	128
3.3.1. <i>L'activité Na,K-ATPasique</i>	128
3.3.2. <i>Source enzymatique</i>	128
3.3.3. <i>Nature de l'isoforme</i>	129
3.3.4. <i>Les concentrations des molécules utilisées</i>	129
CONCLUSION – PERSPECTIVE.....	131

BIBLIOGRAPHIE	144
LISTE DES FIGURES.....	166
LISTE DES TABLEAUX	166
TABLE DES MATIERES	170

Rôle cardioprotecteur de l'insuline dans l'intoxication aiguë à la digoxine : étude *in vivo* et mécanisme d'action cellulaire

Le rapport d'une observation clinique d'une patiente admise en réanimation après auto-injection d'insuline et de digoxine, chez qui la correction de l'hypoglycémie a permis une évolution favorable sans complication, nous a amené à suggérer le rôle bénéfique d'une perfusion d'insuline-glucose lors d'une intoxication aiguë à la digoxine. Bien que l'utilisation de l'insuline dans la prise en charge de pathologies cardiaques graves soit évoquée dans la littérature, à ce jour aucune étude expérimentale n'a évalué l'effet d'une perfusion d'insuline-glucose lors d'une intoxication aiguë à la digoxine. Ainsi, au cours de ce travail, nous nous sommes d'abord intéressés à la mise en évidence de l'effet cardioprotecteur de l'insuline-glucose lors de cette intoxication chez le rat, puis à l'identification des mécanismes d'actions aux niveaux cellulaires.

L'étude de l'effet d'un clamp euglycémique/hyperinsulinique, en pré- et post-traitement d'une intoxication aiguë à la digoxine chez le rat, a permis d'en observer l'effet protecteur. Il s'agissait d'une augmentation de la durée de survie ainsi qu'un retard dans l'apparition des troubles du rythme à l'origine du décès. Les études cellulaires réalisées sur la pompe isolée et sur les cardiomyocytes de rats ont permis de confirmer le rôle cardioprotecteur obtenu *in vivo*. L'insuline prévenait l'entrée en apoptose induite par la digoxine et l'étude des interactions moléculaires a montré que cet effet s'exerce par une action directe sur la pompe Na,K-ATPase en se liant aux sous-unités α et β de l'enzyme.

Ces données ouvrent la voie vers de nouvelles actions possibles de l'insuline dans la cardioprotection face à des agents arythmogènes.

Mots clés : digoxine, insuline, Na,K-ATPase, intoxication, clamp, cardioprotection.

The cardio protective role of insulin on acute digoxin toxicity : in vivo studies and cellular mechanism of action

The case report of a patient admitted in intensive medical care after self-injecting insulin and digoxin, in which intravenous infusion of glucose has not induced cardiac repercussion, led us to raise the hypothesis that insulin may have a cardio-protective effect in case of digoxin toxicity. Although the use of insulin in the management of serious heart diseases is based on several articles, none study has evaluated the effect of glucose-insulin infusion in acute digoxin toxicity. Thus in this work we were interested in highlighting the cardioprotective effect of insulin-glucose against such toxicity in rats and in identifying cellular mechanism of action.

The study of the effect of glucose-insulin infusion on hyperinsulinemic-euglycemic clamp, pre-and post-treatment of acute digoxin toxicity in rats, allowed showing protective effect. There were an improved survival and a delayed onset of arrhythmias cause of death. The study on cellular isolated pump and on rat's cardiomyocytes has proved the cardioprotective effect observed in the *in vivo* study. Insulin prevented onset of way of apoptosis induced by digoxin in cells. Also the study of molecular interactions has shown that this effect is exerted by direct interaction of insulin on the Na, K-ATPase though binding to α and β subunits of this enzyme.

These results open the way for a new prospective action of cardioprotection for insulin against arrhythmic agents.

Keywords : digoxin, insulin, Na,K-ATPase, poisoning, clamp, cardioprotection.