



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

DB 3394
UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I

1995

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTÉ"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 13 novembre 1995

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
HENRI POINCARÉ - NANCY I
Mention pharmacologie**

par

Pascale DEWACHTER

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies de Génie Biologique
option Rhéologie

**INHIBITEURS CALCIQUES,
ACTIVATEURS POTASSIQUES
ET BRONCHOSPASME EXPÉRIMENTAL
À L'HISTAMINE**

MEMBRES DU JURY

Juges Professeur Marie-Claire LAXENAIRE
 Docteur Christine ATKINSON-CAPDEVILLE
 Docteur Claude SAUNIER

Rapporteurs Professeur Alain LOCKHART
 Professeur Charles ADVENIER



104 026597 3

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Année Universitaire 1995/1996

Membres du personnel enseignant

Doyen : C. VIGNERON

Vice Doyen : G. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
M^{lle} BESSON Suzanne
M^{lle} GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. RICHARD Georges
M. SOLEIL Jean

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacodynamie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologie
M ^{lle}	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
M ^{me}	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
M ^{lle}	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Botanique
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	KERGOSIEN Yannick	Mathématiques - Biophysique
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M.	LEMAY René	Droit et économie pharmaceutique
M.	LOPPINET Vincent	Chimie thérapeutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M ^{me}	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

PROFESSEURS ASSOCIES OU INVITES

M	BAVEYE Philippe	Santé - Environnement
M.	BODEMEIER Roland	Pharmacie Galénique
Mle	CHARGOIS Anne	Pharmacologie
M.	O'KANE Maurice	Biochimie
M.	SHUVAEV Vladimir	Biochimie
Mme	STOIANOV Marina	Biochimie clinique
Mme	STREIBLOVA Eva	Biochimie microbienne
M.	VAN STRALEN Paul	Toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Chimie Analytique
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacodynamie
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen - Sécurité industrielle
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mle	FAIVRE Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
Mme	HOFFMAN Marie Antoinette	Pharmacie Clinique
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE OU INVITE

M.	PURI Rajesh	Biologie cellulaire
----	-------------	---------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	AZRIA	Pharmacologie
M.	BARADEL	Conseils vétérinaire
Mme	BLOCH	Gynécologie
M.	CAMUZEUX	Maintien à domicile
M.	CHARPIGNON	Gestion, Commercialisation
M.	DANOUX	Comptabilité
M.	DEMANGE	Pharmacie clinique
M.	DOUCHE	Services de la distribution pharmaceutique
Mme	EVARD	Services de la distribution pharmaceutique
M.	FRANCAIS	Services de la distribution pharmaceutique
M.	GABLE	Maintien à domicile
M.	GIESENFELD	Pharmacie clinique
Mme	GILGENKRANTZ	Génétique
M.	HACHET	Services de la distribution pharmaceutique
M.	JACQUOT	Assurance - qualité
M.	JOUAULT	Services de la distribution pharmaceutique
M.	JOZEAU	Pharmacovigilance - Effets indésirables des médicaments
Mme	LABAEYE	Audiologie
M.	LAMOTTE	Physique (acoustique)
M.	LE FLOCH	Gestion, Droit du travail, Droit commercial
M.	LEVIN	Services de la distribution pharmaceutique
M.	LOUIS	Sémiologie
Mle	MANGIN	Pharmacie clinique
M.	MAUARY	Sémiologie
M.	MAY	Maladies infectieuses
M.	NICOLAY	Anatomie
M.	PARDON	Services de la distribution pharmaceutique
Mle	PICAUT	Pharmacie clinique
M.	RENAUX	Secourisme
M.	RETOURNARD	Electronique
M.	ROLLET	Secourisme
M.	ROUYER	Législation, Podologie, Orthopédie
M.	SIMON	Audiologie
M.	TURKAWKA	Relations humaines, techniques de la communication
Mle	WOLF	Services de la distribution pharmaceutique

A la mémoire de mon père

**"Mon passé se dissout
je fais place au silence"**

Paul Eluard, notre vie

A Madame le Professeur M.C. LAXENAIRE

Professeur d'Anesthésiologie et de Réanimation Chirurgicale

Nous la remercions pour le grand honneur qu'elle nous fait de siéger en tant que présidente de ce jury.

Nous avons eu l'honneur d'être son élève et elle nous a transmis le goût de la communication scientifique, essence du dialogue, du partage des idées et de l'ouverture vers autrui.

Elle nous a fait partager avec enthousiasme son grand intérêt pour la recherche clinique, trait d'union entre recherche fondamentale et médecine clinique.

Son dynamisme, sa rigueur, sa curiosité et sa disponibilité intellectuels ont été et resteront un exemple pour notre exercice professionnel.

Son ouverture d'esprit à l'heure de l'Europe nous aura permis l'apprentissage de la langue anglaise, langage de communication médicale par excellence, dans des conditions d'enseignement très agréables.

Qu'elle trouve ici le témoignage de notre gratitude et de notre respect.

A Monsieur le Professeur A. LOCKHART

Professeur de Physiologie

Nous le remercions pour le grand honneur qu'il nous
fait de siéger dans ce jury.

Il nous a accueillie avec bienveillance et a accepté de
s'intéresser à ce travail avec attention.

Que cette thèse soit le modeste témoin de notre
sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur C. ADVENIER

Professeur de Pharmacologie

Nous le remercions pour le grand honneur qu'il nous
fait de siéger dans ce jury.

Qu'il soit assuré de notre gratitude.

A Madame le Docteur C ATKINSON-CAPDEVILLE

Maître de conférences

Nous la remercions pour le grand honneur qu'elle nous fait de siéger dans ce jury.

Elle nous a accueillie avec beaucoup de sympathie et de confraternité féminine.

Qu'elle trouve par cette étude l'expression de notre sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur C.G. SAUNIER

Directeur de Recherches à l'INSERM

Professeur associé de Pharmacologie à l'Université de Montréal

Il nous a accueilli à l'Unité INSERM avec beaucoup de bienveillance, de sympathie, d'amitié et de paternalisme.

Il a guidé nos pas dans le monde de la recherche avec enthousiasme, patience, sagacité et vitupération.

Notre collaboration professionnelle fut un enrichissement tant professionnel que personnel en sachant nous conseiller à bon escient avec la sagesse de l'âge.

Sa rigueur intellectuelle, son esprit d'analyse et son travail acharné resteront un modèle pour notre exercice professionnel.

Nous le remercions pour le grand honneur qu'il nous fait de siéger dans ce jury.

Que cette thèse soit un bien modeste gage de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur R. PESLIN

Directeur de l'unité INSERM 14

Il nous a accueillie chaleureusement au sein de l'équipe de recherche.

Il a su prodiguer avec grand intérêt les conseils nécessaires à la réalisation de ce travail.

Que cette thèse soit le modeste témoin de notre sincère reconnaissance.

A l'équipe de l'unité INSERM 14

Pour son accueil chaleureux et courtois

et en particulier à

Bernadette CLEMENT

Claude DUVIVIER

Claudia GALLINA

Denise HARTEMANN

Josette LAMBERT

Marie-Claude ROHRER

Sans qui, ce travail n'aurait pu être réalisé

Pour leur aide précieuse et constante

Pour leur disponibilité permanente et leur professionnalisme à l'élaboration de ce travail

Qu'ils soient assurés de mon respect et de ma sincère reconnaissance

A ma mère

A mes soeurs

A mon frère

A ma famille

A mes amis

Pour leur soutien constant

A Marie-José TOUSSAINT

Pour sa patience, sa disponibilité permanente, son
professionalisme.

Pour les heures passées à la frappe de cette thèse.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.



INTRODUCTION

Le bronchospasme est une complication redoutable en anesthésie et chez les sujets porteurs de bronchopneumopathie chronique obstructive (asthme et parfois bronchite chronique), complication survenant au cours de différentes circonstances étiopathogéniques mais également favorisée par l'hypoxie. A l'heure actuelle, aucun médicament ne peut prétendre à une prévention efficace du bronchospasme pour une évolution qui peut être dramatique. L'asthme aigu grave tue chaque année en France 1500 à 2000 patients le plus souvent jeunes. Il s'agit donc d'un problème majeur de santé publique.

Plusieurs études ont montré que les inhibiteurs calciques atténuent la réactivité bronchique à l'histamine (Barnes et coll 1981, Brugman et coll 1983, Cerrina et coll 1981, Corris et coll 1983, Fanta et coll 1982). Les effets sont en général modestes. Certains pourraient avoir une action plus spécifique sur les voies aériennes, mais de nos jours, ils n'ont pas été retenus dans la prévention ou le traitement de l'asthme. Les activateurs potassiques ont été également étudiés dans le bronchospasme expérimental à l'histamine et testés cliniquement chez des patients asthmatiques avec quelques succès.

Le but de ce travail a été d'étudier *in vivo* les effets de certains activateurs potassiques à doses équi-hypotensives sur la contraction de la fibre musculaire lisse à l'histamine et de comparer leurs effets avec ceux des inhibiteurs calciques.

BUT DU TRAVAIL

Les médicaments qui bloquent l'entrée du calcium à travers les canaux spécifiques de la membrane plasmique ont été, autrefois, pressentis dans le traitement de l'asthme (So et coll 1986), mais n'ont pas prouvé leur efficacité à l'égard du bronchospasme chez les sujets asthmatiques (Hendeles et Harman 1987). Il est vraisemblable que des inhibiteurs calciques, avec des effets plus sélectifs vis à vis des voies aériennes, puissent être développés. En effet, la nicardipine inhibe la constriction de la fibre muscle lisse des voies aériennes à une posologie non toxique (Zhang et Lai 1991). Cependant les concentrations requises de nicardipine qui inhibent la libération d'histamine par les mastocytes humains sont supérieures aux concentrations obtenues avec les posologies conventionnelles de ce médicament (Kim et coll 1985). Un espoir s'est forgé avec les activateurs potassiques. En effet, ils sont relaxants *in vitro* sur la fibre musculaire lisse isolée des voies aériennes chez l'animal et chez l'homme. Les études *in vivo* ont confirmé partiellement leur action bronchodilatatrice (Black et Barnes 1990a, Black et coll 1990b). Chez l'asthmatique, le cromakalim a montré une efficacité dans l'asthme nocturne (Williams et coll 1990) alors que le levcromakalim n'en a pas (Kidney et coll 1993).

Dans la présente étude, nous avons comparé l'action de certains activateurs potassiques et inhibiteurs calciques sur un modèle de bronchospasme expérimental à l'histamine. Nous avons observé les variations des résistances et de l'élastance pulmonaires totales après un aérosol d'histamine chez des lapins anesthésiés, curarisés et ventilés artificiellement. Les médicaments étaient injectés préventivement à posologies équi-hypotensives pour les hypotenseurs. Ces posologies étaient déterminées expérimentalement et progressivement à doses croissantes chez des lapins différents. Un maximum de trois lapins était en général nécessaire afin d'obtenir une chute de la pression artérielle de 60 % environ.

Le rôle du monoxyde d'azote (NO) dans le bronchospasme à l'histamine a été évalué grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de la NO synthétase et de produits générateurs de NO. Enfin, comme les radicaux libres peuvent contribuer à la bronchoconstriction

(Katsumata et coll 1990), la capacité du tissu pulmonaire à relarguer des radicaux libres dans ces circonstances a été appréciée à partir d'un homogénat de tissu pulmonaire prélevé à la fin des expériences.

PHYSIOLOGIE

PHYSIOPATHOLOGIE

DE

L'HYPERRÉACTIVITÉ

BRONCHIQUE

3 PHYSIOLOGIE - PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE

Trente cinq ans après la mise en évidence par Tiffeneau (1958) de «l'hypersensibilité pulmonaire» des asthmatiques à l'acétylcholine et à l'histamine, les mécanismes responsables de l'hyperréactivité bronchique sont toujours incomplètement déterminés. Paradoxalement, la physiopathologie de la réactivité bronchique est mieux connue même si les mécanismes ou la séquence des mécanismes responsables ne sont pas complètement élucidés (Lockhart et coll 1989). Il s'agit par conséquent d'une voie de recherche active dont le but est une meilleure approche de la physiopathologie avec pour objectif une prise en charge thérapeutique plus adaptée. L'hyperréactivité bronchique fait partie de l'asthme. Cependant, les deux entités hyperréactivité bronchique et asthme ne sont pas synonymes. Nous allons dans un premier temps nous intéresser à l'effecteur principal de la réactivité bronchique qu'est le muscle lisse bronchique puis de façon détaillée à l'hyperréactivité bronchique "normale". Enfin, nous rappellerons brièvement les mécanismes physiopathologiques de l'hyperréactivité bronchique et ses composantes multifactorielles.

3.1 Le muscle lisse bronchique : effecteur principal de la réactivité bronchique

Un des effecteurs principaux de la réactivité bronchique est le muscle lisse des voies aériennes (Boushey et coll 1980, Woolcock et coll 1984). Il est réparti le long de l'arbre trachéo-bronchique depuis la trachée jusqu'aux bronchioles terminales (Moreno et coll 1986, Stephens 1987) mais ce sont les bronches de diamètre inférieur à 5 mm c'est-à-dire à partir de la 3^{ème}/4^{ème} génération qui ont une implication plus importante dans la physiologie et la physiopathologie de la réactivité bronchique humaine. **C'est la relation entre muscle lisse et hyperréactivité bronchique qui a stimulé la**

recherche dans le domaine des mécanismes cellulaires de la contraction.

Nous aborderons trois aspects.

- **le contrôle par les messagers extra-cellulaires**
- **la transduction membranaire du signal extracellulaire**
- **le fonctionnement des éléments contractiles**

3.1.1 Contrôle du muscle lisse des voies aériennes par les messagers extra-cellulaires (tableau I)

Deux types de messagers extracellulaires contrôlent la contraction du muscle lisse bronchique grâce à une interaction avec des récepteurs spécifiques présents sur la membrane cellulaire musculaire : les neurotransmetteurs du système nerveux autonome et les médiateurs produits par les cellules inflammatoires

3.1.1.1 Les neurotransmetteurs du système nerveux autonome

Même si une altération du système nerveux autonome n'est pas la cause principale de l'asthme et de l'hyperréactivité bronchique, l'interaction des effets des neurotransmetteurs et des médiateurs de l'inflammation influence vraisemblablement le tonus bronchomoteur et la réactivité bronchique aux stimuli. Les neurotransmetteurs sont libérés lors de la stimulation du système nerveux autonome.

3.1.1.1.1 L'innervation pulmonaire

- Fibres nerveuses afférentes

Plusieurs types de récepteurs des fibres nerveuses afférentes existent dans les voies aériennes.

Tableau I

Principaux messagers extracellulaires qui contrôlent la contraction du muscle lisse des voies aériennes par interaction avec des récepteurs spécifiques présents sur la membrane cellulaire musculaire.

	Messenger extracellulaire	Récepteur membranaire musculaire	Effet sur le muscle lisse des voies aériennes
Neurotransmetteurs	Acétylcholine Adrénaline VIP, PHI, PHM Tachykinines : SP NKA CGRP NO	M ₃ Bêta 2 Récepteurs spécifiques NK1 NK2 Récepteur spécifique Récepteur non spécifique	Contraction Relaxation Relaxation Contraction Contraction Contraction Relaxation
Médiateurs	Histamine Eicosanoïdes : Prostaglandine D ₂ Prostaglandine F ₂ α Thromboxane A ₂ E ₂ /I ₂ Leucotriènes Endotheline Ep DRF (?)	H ₁ Récepteur spécifique ? Récepteur spécifique ? Récepteur spécifique ? Récepteur spécifique ? Récepteur spécifique ? Récepteur spécifique ? (?)	Contraction Contraction Contraction Relaxation Contraction Contraction Relaxation

- **Les récepteurs à l'élongation** sont des terminaisons nerveuses de fibres myélinisées situées sur le muscle lisse des voies aériennes de conduction et stimulées par des changements de tension dans la paroi des voies aériennes de conduction (mécanorécepteurs). Ils répondent aussi à des stimulations chimiques comme le CO₂ et sont responsables du réflexe de Hering-Breuer.

- **Les récepteurs aux irritants** sont des terminaisons nerveuses de fibres myélinisées situées entre et au dessous des cellules épithéliales. Ils répondent aux stimuli chimiques, aux gaz nocifs et aux particules inhalées. Leur stimulation entraîne une bronchoconstriction réflexe.

- **Les fibres C** sont des terminaisons nerveuses des fibres C non myélinisées.

- **Fibres nerveuses efférentes**

Le contrôle autonome se fait à partir des systèmes cholinergique, adrénergique, non adrénergique non cholinergique (NANC) (Barnes 1986, Leff 1988).

- **Le système nerveux cholinergique**

L'innervation parasympathique cholinergique constitue le plus important système nerveux bronchoconstricteur chez l'homme et l'animal (Gabella 1987). Les fibres nerveuses parasympathiques cholinergiques suivent le nerf vague jusqu'aux ganglions parasympathiques situés dans la paroi bronchique. L'acétylcholine libérée par les fibres cholinergiques post-ganglionnaires active les récepteurs muscariniques (M₁, M₂, M₃) sur les cellules cibles et la bronchoconstriction est médiée par les récepteurs M₃ (Roffel et coll 1990). Il semble exister un rétrocontrôle de libération d'acétylcholine en activant des récepteurs M₂ localisés aux terminaisons cholinergiques dans les voies aériennes (Minette et Barnes 1990). Ainsi, dans l'asthme, comme d'autres situations cliniques associées à une hyperréactivité bronchique, les mécanismes inhibiteurs de la

libération d'acétylcholine pourraient être modifiés et contribueraient à l'exacerbation de l'hyperréactivité bronchique.

• **Le système nerveux adrénergique**

Contrairement à d'autres espèces animales, le poumon humain ne contient que très peu de fibres nerveuses sympathiques (Barnes 1986). La présence de fibres sympathiques a été démontrée dans les vaisseaux bronchiques, les glandes de la sous-muqueuse et peut-être dans les ganglions parasympathiques ainsi que sur les fibres cholinergiques post-ganglionnaires. L'innervation orthosympathique du muscle lisse respiratoire est pratiquement inexistante. (Barnes 1990, Richardson et Beland 1976, Richardson 1979). On retrouve toutefois des récepteurs bêta-adrénergiques en abondance sur le muscle lisse respiratoire mais ceux-ci sont probablement activés par l'adrénaline circulante (Nadel et Barnes 1984, Bai 1992). En plus de la noradrénaline, un autre neurotransmetteur, le neuropeptide Y (NPY) est colocalisé dans les terminaisons nerveuses sympathiques et pourrait être colibéré avec la noradrénaline (Potter 1988). Chez l'animal, le neuropeptide Y diminue la transmission cholinergique et est un vasoconstricteur puissant du muscle lisse artériolaire (Barnes et coll 1991b).

- **Récepteurs bêta-adrénergiques**

Les récepteurs β -adrénergiques (RBA) sont divisés en deux sous-types selon leur seuil de réponse à la noradrénaline et à l'adrénaline : les RBA₁ et les RBA₂. Le nombre relatif de RBA₁ et RBA₂ varie d'une espèce à l'autre, chez l'humain, 70 % des récepteurs sont des RBA₂ et 30 % des RBA₁ (Barnes 1992, Bai 1992). De plus, les RBA₂ sont polymorphes et auraient un rôle dans certains asthmes graves (Potter 1995). La stimulation des récepteurs β -adrénergiques produit une relaxation puissante du muscle lisse respiratoire, augmente le transport actif d'ions, la sécrétion de mucus et la production de surfactant. Elle module également la transmission cholinergique et inhibe la libération de médiateurs par les mastocytes (Bai 1992). Même si un défaut majeur des récepteurs β -adrénergiques n'est pas à l'origine de l'hyperréactivité bronchique, des

anomalies de fonctionnement de ces récepteurs pourraient contribuer à augmenter la bronchoconstriction.

- Récepteurs alpha-adrénergiques

Les récepteurs alpha-adrénergiques sont classés en deux sous-types selon leurs propriétés pharmacologiques, les α_1 et les α_2 . Il existe peu de récepteurs alpha-adrénergiques dans le poumon humain (Barnes 1992). Chez certains mammifères, en revanche, on trouve des récepteurs α -adrénergiques sur le muscle lisse des voies aériennes périphériques. Ils sont localisés aux vaisseaux pulmonaires et bronchiques et semblent également exister sur les cellules de l'épithélium bronchique. *In vitro*, la stimulation adrénergique augmente la sécrétion de mucus et produit une contraction du muscle lisse respiratoire mais chez l'homme et chez le chien, cet effet n'est apparent que si les tissus ont été contractés au préalable par de l'histamine ou de la sérotonine ou s'ils proviennent de poumons malades (Barnes 1990, Kneussl et Richardson 1978). *In vivo*, chez l'animal, la stimulation α -adrénergique induit une vasoconstriction des vaisseaux pulmonaires et bronchiques et une inhibition de la perméabilité vasculaire (Lockhart et coll 1992). Il existe chez les asthmatiques une certaine hyperréactivité aux agonistes α -adrénergiques qui est le reflet de l'hyperréactivité bronchique non spécifique plutôt que sa cause.

• Système nerveux non adrénergique non cholinergique excitateur (NANCe)

L'existence du NANCe dans les voies aériennes a été mise en évidence chez le cobaye où la stimulation des bronches par un champ électrique *in vitro* et où la stimulation électrique du nerf vague *in vivo* entraîne une bronchoconstriction. Cette bronchoconstriction n'est pas inhibée par les antagonistes cholinergiques ou adrénergiques, en revanche elle est bloquée par une toxine : la tétrodotoxine indique ainsi sa nature neuronale (Andersson et coll 1983). Elle est également abolie par un prétraitement par la capsaïcine : substance qui déplete les fibres C de leurs neuropeptides

indiquant qu'elle est due à une libération de neuropeptides des fibres C du système sensitif. Chez l'homme, les fibres C constituent un contingent du nerf vague. Une population de ces fibres contient des neuropeptides dont les principaux sont les tachykinines, le peptide dérivé du gène de la calcitonine (CGRP) et le gastrin-releasing peptide (GRP). Les tachykinines sont représentées par la substance P et la neurokinine A. Il s'agit de peptides qui ont une homologie de séquence C-terminale. Les récepteurs de la substance P sont présents sur le muscle lisse bronchique de la trachée aux bronchioles et sur l'endothélium vasculaire. Ils sont présents en moins grand nombre sur le muscle lisse vasculaire, l'épithélium bronchique et les glandes sous muqueuses (Barnes 1991a). Les récepteurs de la neurokinine A sont présents sur le muscle lisse bronchique. Les effets des tachykinines sont liés à l'activation par l'extrémité C-terminale de récepteurs spécifiques sur les cellules cibles. Enfin, la neurokinine A induit une contraction du muscle lisse bronchique plus puissante que la substance P. En revanche le CGRP ne semble pas exercer d'effet contractile sur les bronches humaines et un rôle anti-inflammatoire du CGRP dans l'hyperréactivité bronchique a été suggéré (Barnes et coll 1991b). Enfin, l'implication du GRP n'a pas encore été étayée.

Ainsi, les neuropeptides du système sensitif, substance P, neurokinine A, CGRP et GRP semblent capables de produire des symptômes caractéristiques des maladies allergiques respiratoires, asthme et rhinite allergique. Dans un avenir proche, on devrait pouvoir évaluer le rôle réel du système NANCe dans l'inflammation des voies aériennes et l'entretien des maladies allergiques respiratoires.

• Le système nerveux non adrénérgique non cholinérgique inhibiteur (NANC_i)

Ce système est le seul système nerveux relaxant présent dans les voies aériennes humaines chez les sujets sains mais également chez les sujets asthmatiques (Michoud et coll 1988). Les effets du NANC_i ne sont probablement pas dus à un système nerveux distinct mais plutôt à un neurotransmetteur colibéré avec l'acétylcholine (Barnes 1992).

L'oxyde nitrique (monoxyde d'azote, NO) est un neuromédiateur possible du NANCi (Nijkamp et Folkerts 1994). Il joue un rôle-clé dans la régulation physiologique des fonctions des voies aériennes et est impliqué dans les maladies des voies aériennes (Barnes et Belvisi 1993b). La NO-synthétase, catalyse la conversion de L-arginine en L-citrulline, réaction enzymatique au cours de laquelle de l'oxyde nitrique est formé. Trois enzymes (NO-synthétases) ont été isolées et clonées (Bredt et coll 1991).

- **La forme neuronale**

- **La forme constitutive** (cNOS) s'exprime dans les cellules endothéliales et neuronales mais également dans les plaquettes, mastocytes et neutrophiles (Barnes et Belvisi 1993b). Cette enzyme est calcium et calmoduline dépendante et libère en quelques secondes ou minutes des picomoles d'oxyde nitrique en réponse à une stimulation des récepteurs (Moncada 1992) par des agonistes comme l'acétylcholine, la bradykinine, le PAF et l'histamine. La forme constitutive est impliquée dans la régulation physiologique de la fonction des voies aériennes.

- **La forme inductible** (iNOS) n'est pas dépendante du calcium intracellulaire ou de la calmoduline mais nécessite des cofacteurs. Une déficience d'un de ces facteurs dévie la production d'oxyde nitrique en H₂O₂ ou anion superoxyde (Pou et coll 1990).

L'oxyde nitrique est synthétisé et libéré par les terminaisons nerveuses des systèmes nerveux central et périphérique (Bult et coll 1990). Il semble qu'il exerce son effet bronchodilatateur par action directe sur le muscle lisse bronchique d'une part et de façon indirecte d'autre part en diminuant la libération d'acétylcholine des terminaisons nerveuses cholinergiques (Barnes 1993a). Enfin, il y a peu de temps, le peptide intestinal vasoactif (VIP) était considéré comme un neuromédiateur important du NANCi. En fait, si chez l'homme le NANCi est médié uniquement par l'oxyde nitrique (Belvisi et coll 1992), chez le cobaye la réponse bronchodilatatrice est médiée par cette molécule et probablement par le VIP.

L'oxyde nitrique peut avoir des effets pro-inflammatoires. En effet, les quantités importantes d'oxyde nitrique synthétisées par la forme inductible peuvent être délétères. Dans les tissus inflammatoires, l'oxyde nitrique réagit rapidement avec l'anion

superoxyde avec pour conséquence la formation de peroxydinitrites toxiques. L'expression de la forme inductible a été retrouvée dans l'épithélium de patients asthmatiques mais pas chez les patients sains (Kobzik et coll 1993, Hamid et coll 1993). Enfin, l'oxyde nitrique a été détecté dans l'air exhalé chez l'homme et l'animal (Gustafsson et coll 1991).

L'oxyde nitrique peut réguler sa propre synthèse (figure 1) en modulant l'activité de la forme inductible tant au niveau de l'ARN_m que l'activité enzymatique (Assreuy et coll 1993) De plus, Rogers (Rogers et coll 1992) a montré que l'oxyde nitrique et l'ion superoxyde inhibent la forme constitutive qui peut être stimulée par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules épithéliales après stimulation du récepteur (figure 1). L'oxyde nitrique produit stimule la guanylate cyclase qui engendre la production de GMPc dans la cellule musculaire lisse. Le GMPc diminue la concentration intracellulaire de calcium par un certain nombre de mécanismes (Ahlner et coll 1991) avec pour conséquence une relaxation ou une suppression de la contraction. Au contraire, il se pourrait (Nijkamp et coll 1994) que de fortes concentrations d'oxyde nitrique produites par la forme inductible dans les cellules inflammatoires ou épithéliales après stimulation par des cytokines/endotoxines, puissent réguler l'activité de la forme constitutive. Cela pourrait perturber le mécanisme inhibiteur de la bronchoconstriction. Il n'est pas exclu que de fortes concentrations d'oxyde nitrique désensibilisent la guanylate cyclase. La conséquence serait une diminution de la production de GMPc dans la cellule musculaire lisse, une augmentation intracellulaire du taux de calcium et finalement une bronchoconstriction (Nijkamp et coll 1994).

3.1.1.2 Les médiateurs produits par les cellules inflammatoires

Le muscle lisse des voies aériennes possède également des récepteurs membranaires spécifiques de médiateurs essentiellement libérés par les cellules inflammatoires.

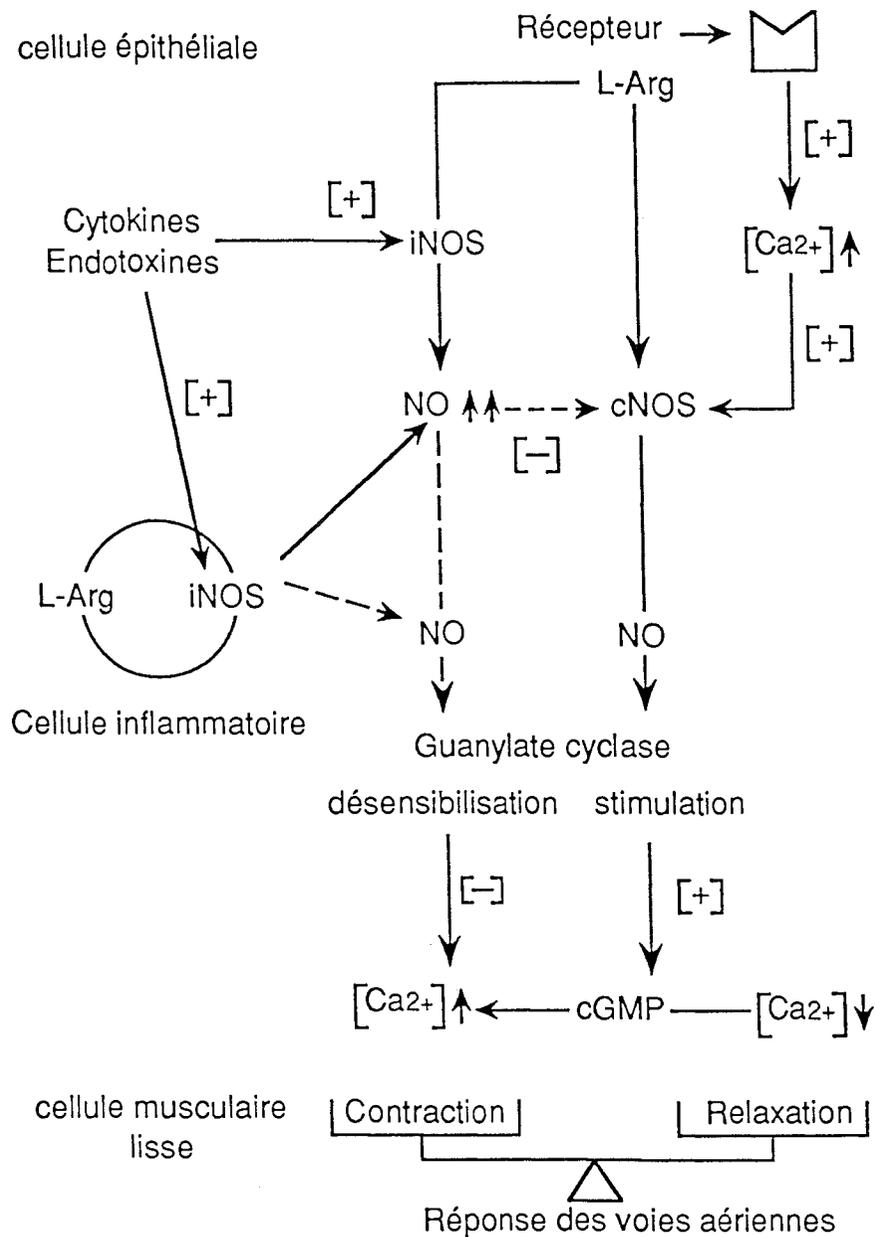


Figure 1 - Hypothèse concernant la balance de la réponse des voies aériennes.

La stimulation du récepteur augmente la concentration du calcium intracellulaire dans la cellule épithéliale. Il y a activation de la forme constitutive de la NO-Synthétase (cNOS) et formation d'oxyde nitrique à partir de la L-Arginine. L'oxyde nitrique stimule la guanylyl cyclase, et favorise la production de GMPc dans le muscle. De fortes concentrations d'oxyde nitrique, produites par la forme inductible de la NO-synthétase dans les cellules inflammatoires ou épithéliales après stimulation par cytokines/endotoxine, peuvent supprimer l'activité de la forme constitutive de la NO-Synthétase ou désensibiliser la guanylyl-cyclase. Les deux phénomènes mènent à une production diminuée de GMPc. Cela favorise une augmentation de la concentration intra-cellulaire de calcium et une contraction des voies aériennes.

(d'après Nijkamp F.P., Folkerts G., *Clinical and experimental allergy*, 1994)

- **L'histamine** contracte le muscle bronchique par action sur le récepteur histaminergique de type H₁.

- **Les eicosanoïdes** sont dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique, à partir des phospholipides membranaires par action de la phospholipase A₂. Ils sont synthétisés "*de novo*" lors de l'excitation cellulaire à la différence des médiateurs préformés. Beaucoup de ces eicosanoïdes, aussi bien ceux de la famille des prostaglandines que ceux de la famille des leucotriènes possèderaient des récepteurs spécifiques sur la membrane du muscle bronchique (Barnes 1987).

Les **médiateurs paracrines**, produits par les cellules de l'épithélium bronchique peuvent agir directement sur des récepteurs spécifiques présents sur la membrane du muscle bronchique. C'est le cas de **l'endothéline**, peptide dont il existe trois types, libérée par l'épithélium bronchique humain qui contracte le muscle bronchique pour des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Mc Kay et coll 1991).

3.1.2 Transduction membranaire du message extra-cellulaire

La transduction membranaire du message extracellulaire recouvre l'ensemble des phénomènes qui permettent de "**traduire**" **l'information extracellulaire** (interaction messenger-récepteur) **en information intracellulaire** (formation ou augmentation de concentration du second messenger). C'est la concentration en calcium libre cytoplasmique qui contrôle le fonctionnement de la machinerie contractile. En effet, certaines expériences réalisées sur des préparations musculaires dont les membranes cellulaires ont été perméabilisées aux ions grâce à des détergents ou des toxines montrent que l'augmentation de la concentration calcique au voisinage immédiat de l'appareil contractile depuis 10⁻⁷ M jusqu'à 10⁻⁵ M, contracte le muscle de façon concentration dépendante jusqu'à l'amplitude de la contraction de la fibre intacte. Ces résultats cités par Marthan (1992a) ont été retrouvés pour des faisceaux de muscle bronchique humain pelés

chimiquement (Savineau et Marthan, résultats non publiés). Le contrôle de la machinerie contractile par l'ion calcium fait intervenir des étapes de contrôle intermédiaire ainsi que d'autres seconds messagers que l'ion calcium. Il s'agit d'un mécanisme de couplage entre messager extra-cellulaire et augmentation de la concentration en calcium libre cytoplasmique. Ce couplage peut être soit direct par influx de calcium extracellulaire, soit indirect par mise en jeu d'un second messenger intermédiaire qui libère le calcium stocké dans les compartiments intra-cellulaires. Classiquement, on distingue **deux mécanismes de couplage excitation-contraction**. En effet, dans beaucoup de muscles lisses, un potentiel d'action précède la contraction. Ce potentiel d'action est de nature calcique, c'est-à-dire lié à l'influx de Ca^{2+} extracellulaire dans les cellules. Ce couplage entre variation du potentiel de membrane et contraction musculaire est appelé **couplage électromécanique**. Cependant, lorsque les cellules musculaires lisses sont complètement dépolarisées, l'application d'un agoniste peut également entraîner une contraction qui est alors indépendante d'une variation du potentiel de membrane. Ce couplage est appelé **pharmacomécanique** ou plus exactement **chimiomécanique**. Cette classification est redevenue d'actualité depuis qu'il a été mis en évidence que la première étape du message extracellulaire (l'activation des protéines G) est probablement commune au couplage électro et chimiomécanique dans le muscle bronchique comme dans d'autres cellules excitables (Coburn et coll 1990).

En effet, il est probable que les protéines G qui se lient aux nucléotides de la classe des guanines constituent le premier niveau de transduction de l'information dans la membrane cellulaire du muscle bronchique bien que la caractérisation de ces protéines dans ce muscle soit encore très incomplète (Coburn et coll 1990).

3.1.2.1 Couplage électromécanique

Deux types de canaux ioniques dont l'ouverture est contrôlée par une variation de potentiel de membrane ont été identifiés dans le muscle bronchique. Ce sont les canaux calciques et potassiques. Ils sont respectivement détaillés dans les chapitres 4.5 et 6.1.1.

3.1.2.2 Couplage chimiomécanique

Le couplage chimiomécanique recouvre l'ensemble des mécanismes qui permettent la transduction du message extracellulaire en augmentation de la concentration calcique cytoplasmique indépendamment d'une variation du potentiel de membrane.

L'augmentation de la concentration calcique cytoplasmique est essentiellement liée à une libération de calcium à partir des compartiments intracellulaires (réticulum sarcoplasmique) en rapport avec le métabolisme des phosphoinositides membranaires.

• **Système des Phosphoinositides**

En l'absence de calcium extracellulaire, la stimulation du muscle lisse bronchique humain par l'acétylcholine induit des contractions liées à la libération du calcium à partir des compartiments intracellulaires (Marthan et coll 1987a). L'amplitude des contractions induites par des agonistes cholinergiques en l'absence de calcium extracellulaire est peu différente de celle obtenue en présence de calcium extracellulaire (Marthan et coll 1987b), enfin une mobilisation massive du calcium extracellulaire par un ionophore induit une contraction dont l'amplitude n'est pas supérieure à celle produite par un agoniste cholinergique (Marthan et coll 1988a). La transduction membranaire entre messenger extracellulaire et libération du calcium dans le cytoplasme fait intervenir le métabolisme des phosphoinositides membranaires. Au sein des phospholipides membranaires, les phosphoinositides présentent deux caractéristiques principales : l'inositol porte cinq groupements hydroxyle, peut être phosphorylé trois fois pour donner entre autre du phosphatidyl inositol triphosphate (IP₃). L'IP₃ est le second messenger qui libère le calcium intracellulaire stocké dans les organites intracellulaires (autres que la mitochondrie). Il se fixe sur un récepteur couplé à un canal calcique, augmente la probabilité d'ouverture de ce canal et permet l'afflux du calcium dans le cytoplasme (Ehrlich et Watras 1988).

• Métabolisme des phosphoinositides dans le muscle bronchique

Le métabolisme des phosphoinositides et la formation d'IP₃ assurent le couplage entre le message extracellulaire et la libération de calcium intracellulaire.

- La stimulation du muscle bronchique par un agoniste cholinergique entraîne, avec une diminution de la masse des phosphoinositides membranaires, une augmentation de celle du diacylglycérol (DAG) respectivement source et métabolite formé au cours de la synthèse d'IP₃ (Baron et coll 1984).

- Le GTP gamma S (analogue des protéines G) active la phospholipase C qui permet la phosphorylation de l'IP₂ en IP₃ dans le myocyte bronchique isolé (Murray et coll 1989) traduisant que l'activation du métabolisme des phosphoinositides fait intervenir une protéine G.

- L'IP₃ libère le calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture (Twort et Van Breemen 1989).

- L'IP₃, comme tous les autres seconds messagers, est rapidement métabolisé puisque la stimulation cholinergique n'entraîne qu'une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire d'IP₃ (Chilvers et coll 1989).

- Il existe une bonne corrélation entre la fixation de certains agonistes comme l'histamine à leur récepteur membranaire, la contraction musculaire bronchique et l'hydrolyse des phosphoinositides (Grandordy et coll 1986).

- Beaucoup de messagers extracellulaires du muscle lisse bronchique (neurotransmetteurs y compris ceux du NANC et médiateurs comme les leucotriènes)

activent le métabolisme des phosphoinositides et confirment l'importance du couplage chimiomécanique dans la transduction membranaire des messages dans le muscle.

3.1.3 Fonctionnement des éléments contractiles

Les connaissances des mécanismes cellulaires de la contraction du muscle bronchique sont encore très incomplètes (Marthan 1992a). Il apparaît qu'à la différence du muscle strié dont l'activité dépend étroitement du métabolisme oxydatif, le muscle lisse bronchique développe une contraction lente et maintenue, quasi indépendante de ce type de métabolisme (Marthan 1992b). Les deux protéines responsables de la contraction dans tous types de muscle lisse sont l'actine et la myosine.

- **L'actine** est un filament fin composé de deux polymères linéaires de 42000 Da enroulés en hélice autour d'une autre protéine : la tropomyosine.

- **La myosine** : les filaments de la myosine sont épais, bipolaires et composés de grosses molécules asymétriques. C'est un hétéramère composé de deux chaînes lourdes (200000 Da) et quatre chaînes légères (deux de 20000 Da et deux de 17000 Da). L'une des extrémités globulaires de la myosine est un site enzymatique (myosine ATPase), qui en hydrolysant l'ATP permet la jonction à l'actine (Adelstein et Eisenberg 1980).

3.1.3.1 Phosphorylation de la myosine.

La phosphorylation réversible de la myosine constitue une étape contrôlée préliminaire au développement de son activité ATPasique en présence d'actine (Sellers et coll 1981). Les chaînes légères de la myosine sont phosphorylées grâce à une enzyme : la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). Cette enzyme est activée par l'ion calcium après interaction avec la calmoduline et inactivée par phosphorylation grâce à une

kinase AMPc-dépendante. Ainsi, un premier mécanisme de contraction du muscle lisse des voies aériennes fait intervenir (figure 2) :

- l'augmentation de calcium intracellulaire (Ca^{2+}_i)
- la liaison Ca^{2+}_i -calmoduline
- l'activation de la MLCK
- La phosphorylation des chaînes légères de la myosine
- l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase de la myosine phosphorylée combinée avec l'actine
- l'établissement des ponts actine-myosine qui s'attachent et se détachent rapidement ("normally cycling cross-bridge") entraînent le raccourcissement et la mise en tension du muscle.

Ce type de réponse cellulaire dans laquelle il y a proportionnalité entre d'une part, les augmentations de la concentration du second messager (Ca^{2+}_i) et de la phosphorylation de la myosine, et d'autre part l'intensité de la force développée, est décrit sous le terme de fonctionnement en **modulation d'amplitude** (Marthan 1992b).

Un autre type de réponse cellulaire dans lequel la force de contraction est maintenue alors que la concentration en second messager Ca^{2+}_i diminue est décrit sous le terme de fonctionnement en **modulation de sensibilité** (Marthan 1992a). En effet, si la stimulation prolongée du muscle par un messager extracellulaire entraîne une réponse tonique maintenue, les augmentations de Ca^{2+}_i et de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine ne sont que transitoires. Cependant les mécanismes qui rendent compte de la contraction maintenue sont encore controversés.

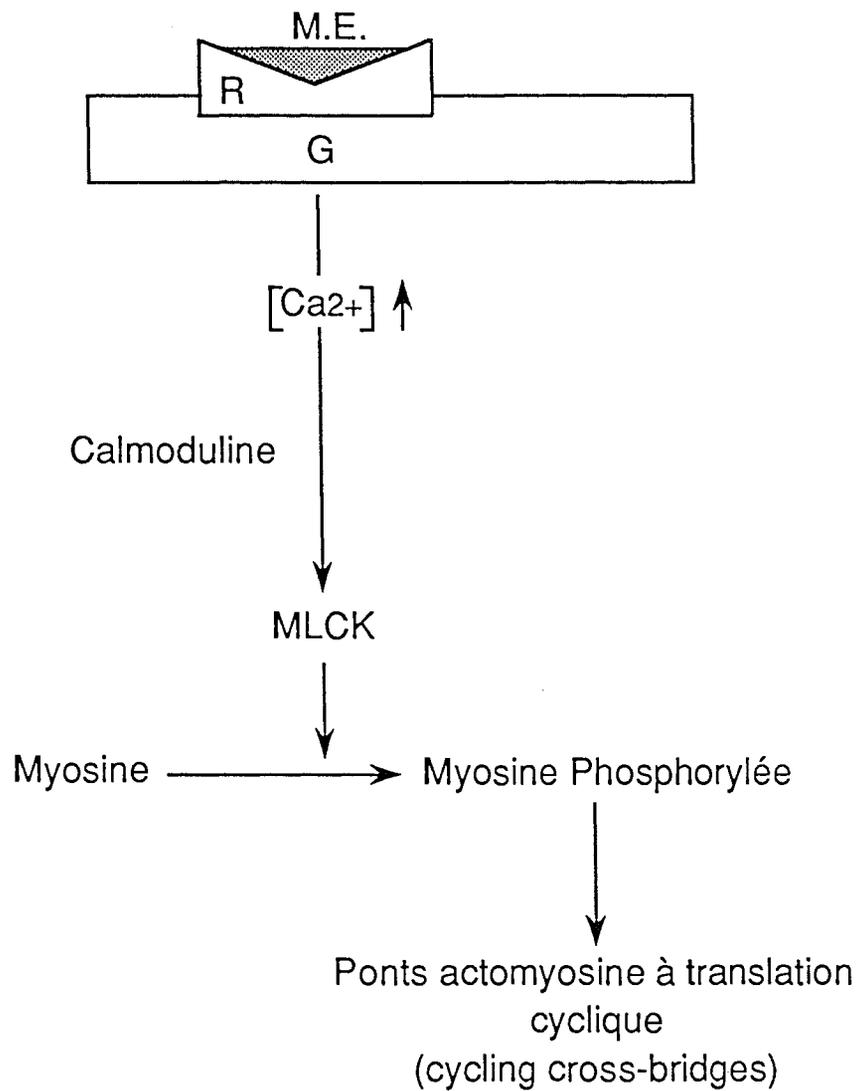


Figure 2 - **Phosphorylation de la myosine.**

L'interaction messenger extracellulaire (M.E.)-récepteur (R) augmente la concentration en calcium libre cytoplasmique (Ca^{2+}) et permet sa liaison à la calmoduline. La liaison calcium-calmoduline active la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK) qui phosphoryle la myosine. L'activité ATPasique de la myosine phosphorylée permet l'établissement de ponts actomyosine à translation cyclique ("normally cycling cross-bridges") qui permettent le raccourcissement et la mise en tension du muscle.

3.2 Hyperréactivité bronchique : définition

Il existe une réactivité bronchique «normale» chez les sujets sains qui traduit la tendance des voies aériennes à développer une obstruction bronchique modérée en réponse à une stimulation non spécifique par des agents physiques ou chimiques. Le rôle physiologique de cette réactivité bronchique est encore mal connu mais pourrait intervenir **dans la distribution intrapulmonaire de la ventilation** et donc **dans celle des rapports ventilation-perfusion** (Otis 1983). Elle pourrait également **protéger** le parenchyme pulmonaire **contre l'inhalation de substances toxiques ou allergéniques en quantité importante**. L'hyperréactivité est définie par une modification de la relation stimulus bronchique «quantifiable» - réponse bronchique obstructive «mesurable» qui s'exprime graphiquement par une modification de la courbe dose (de stimulus) - réponse (obstruction bronchique) par rapport à celle des sujets normaux. Trois critères (Marthan 1992b) différencient la courbe dose-réponse du sujet hyperréactif de celle du sujet normal (figure 3).

1 - La sensibilité est plus grande c'est-à-dire que **la courbe est déplacée vers la gauche**, ou encore, il faut des doses moindres d'agonistes pour induire une réponse. Cette information est quantifiée par la valeur de la dose produisant un effet donné mesuré par diverses méthodes spirométriques.

2 - La réactivité est plus marquée, c'est-à-dire que, quelle que soit la dose, l'obstruction bronchique induite est d'amplitude supérieure à celle du sujet normal.

3 - Il n'y a pas de «plateau» (figure 3). L'amplitude de cette réponse maximale est habituellement de l'ordre de 20 à 30 % de diminution de la valeur du VEMS pour des doses d'histamine ou de méthacholine supérieures à 8 μ moles. L'hyperréactif bronchique ne présente pas de plateau, ou au moins, celui-ci n'est pas mesurable. En effet, chez les hyperréactifs sévères, des doses de l'ordre de 0,1 μ mole entraînent des diminutions

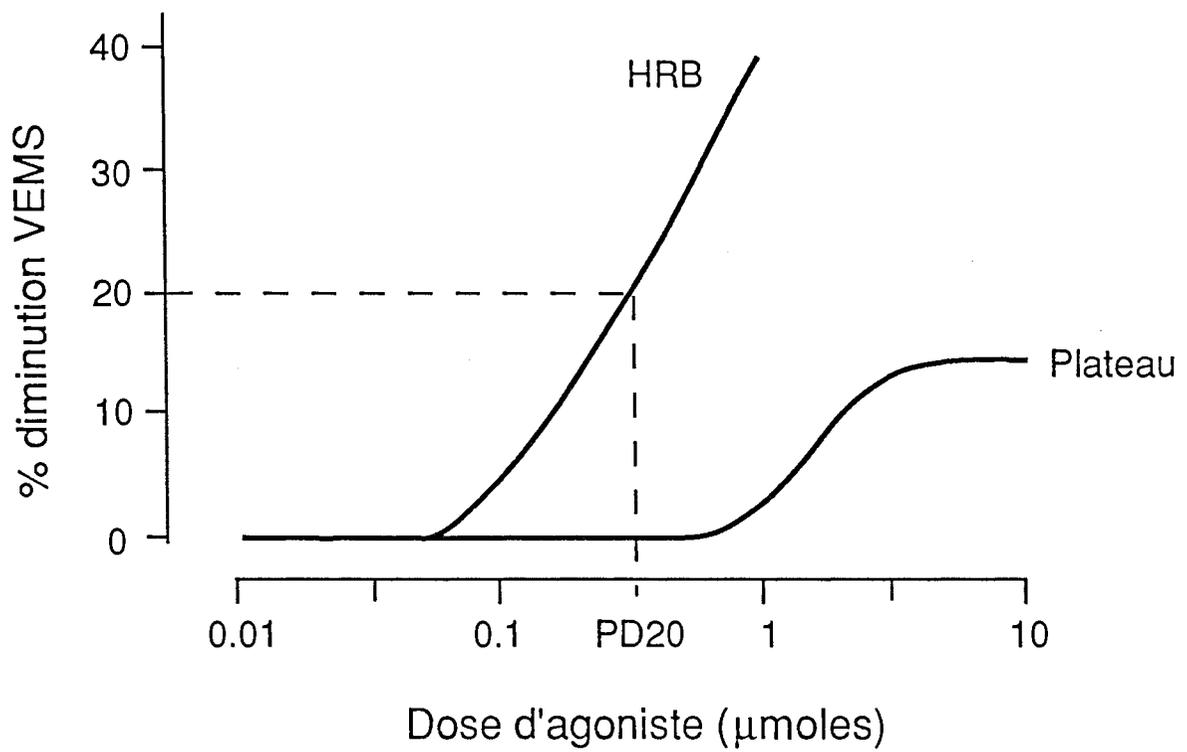


Figure 3 - Courbe dose réponse du sujet hyperréactif/normal.

importantes d'environ 40 % de la valeur du VEMS sans qu'il n'apparaisse de plateau (Woolcock et coll 1984, Sterk et coll 1985).

Une des caractéristiques essentielles de l'hyperréactivité bronchique est le fait que la réponse "excessive" des voies aériennes n'est pas spécifique d'un stimulus particulier. Les stimuli directs sont ceux agissant directement sur le muscle lisse bronchique pour induire l'apparition de l'obstruction bronchique (métacholine, histamine, carbachol...). **Les stimuli indirects** sont ceux qui déclenchent l'obstruction bronchique par libération secondaire de médiateurs ou activation des voies nerveuses bronchoconstrictrices (exercice, inhalation d'air sec, β bloquants). Enfin, les stimuli sont parfois classés selon leur nature physicochimique ou leur rôle biologique. **Les stimuli physiques** sont l'exercice, l'air froid, l'hyperventilation ou l'inhalation de solutions hypo ou hyperosmolaires. **Les stimuli pharmacologiques** comportent les médiateurs du système nerveux autonome (agoniste cholinergique, antagoniste adrénergique...), certaines amines biologiquement actives (histamine), certains peptides (bradykinine), les métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines et leucotriènes) ou certains neuropeptides (substance P). **Les stimuli chimiques** comprennent notamment les polluants gazeux comme l'ozone, le dioxyde de soufre ou le dioxyde d'azote (Marthan 1992b).

3.2.1 Mécanismes de l'hyperréactivité bronchique

La physiopathologie de l'hyperréactivité bronchique a une origine multifactorielle que nous allons aborder point par point pour un souci de présentation.

3.2.1.1 Rôle de l'inflammation des voies aériennes et de l'atopie

La notion d'inflammation des voies aériennes est un point-clé dans l'asthme et les modifications retrouvées au niveau des voies aériennes concernent essentiellement la

muqueuse, la membrane basale et la sous-muqueuse bronchique. L'infiltrat cellulaire est très caractéristique et est marqué par la présence d'éosinophiles, de lymphocytes, de mastocytes et de macrophages. Toutes ces cellules ont la caractéristique d'être activées contrairement aux sujets normaux. Cet infiltrat inflammatoire de la muqueuse est présent même chez les asthmatiques peu sévères (Beasley et coll 1989) et survient précocement dès les premiers symptômes de l'asthme (Laitinen et coll 1983). L'intensité de cet infiltrat est corrélée à la sévérité clinique de l'asthme (Bousquet et coll 1990), au niveau d'obstruction bronchique (Gibson et coll 1989, Walker et coll 1991) et est augmentée au cours des épisodes d'exacerbation. L'éosinophile est le type cellulaire inflammatoire reconnu comme le fait marquant sur le plan histologique du poumon asthmatique à l'autopsie et dans le liquide de lavage alvéolaire après provocation antigénique chez des patients porteurs d'un asthme allergique (Demonchy et coll 1985, Kirby et coll 1987, Walker et coll 1991) qui prédomine dans la sous-muqueuse (Beasley et coll 1989, Jeffery et coll 1989, Bradley et coll 1991). La protéine cationique de l'éosinophile (ECP), la protéine majeure (MBP) et la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN) sont des protéines basiques contenues dans les granules de l'éosinophile et relarguées en grande quantité dans l'expectoration, le lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA) (Wardlaw et coll 1988, Bousquet et coll 1990) et les tissus bronchiques des asthmatiques. Plusieurs études ont montré une relation entre la concentration de protéines basiques présentes dans le LBA et la gravité de l'asthme (Bousquet et coll 1990, 1991) ou l'intensité de l'hyperréactivité bronchique (Wardlaw et coll 1988). Les éosinophiles sont capables aussi de sécréter une grande quantité de médiateurs phospholipidiques dont le leucotriène (LTC_4) qui est un puissant bronchoconstricteur à l'état basal et après asthme induit après inhalation d'allergène. Les éosinophiles sécrètent également en grande quantité le facteur activateur des plaquettes (PAF). Son rôle dans l'asthme est fondé sur un chimiotactisme vis à vis des éosinophiles, une augmentation de l'adhésion aux cellules endothéliales et de l'hyperréactivité bronchique ainsi que ses propriétés vasodilatatrices. Ainsi, l'éosinophile joue un rôle primordial, cependant le rôle des chémoattractants comme le PAF n'explique pas la migration préférentielle des éosinophiles plutôt que des neutrophiles. Les

mastocytes, quant à eux, sont des cellules résidentes des voies aériennes et jouent un rôle important, en particulier dans les réactions allergiques immédiates mais aussi dans l'asthme non allergique (Gibson et coll 1993). Il est probable que ces cellules jouent un rôle dans la persistance de la réaction inflammatoire. En effet, elle libère des médiateurs chimiotactiques comme le LTB_4 et récemment, il a été montré qu'elles avaient le pouvoir de sécréter des cytokines comme l'interleukine-3 (Il-3), l'interleukine-5 (Il-5) et le «Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor» (GMCSF) qui peuvent recruter et activer les éosinophiles, monocytes et polynucléaires neutrophiles (Gordon et coll 1990). Ceci fait de ces cellules un probable pivot de la réaction inflammatoire asthmatique par leur rôle de starter et d'entretien de la réaction. Les lymphocytes présents dans l'infiltrat inflammatoire sont essentiellement des lymphocytes T qui exercent un rôle central dans la genèse et l'entretien de l'inflammation bronchique asthmatique. Ils sont activés comme cela a été mis en évidence dans les biopsies (Bentley et coll 1992) et le LBA (Robinson et coll 1993) des sujets asthmatiques et ont la capacité de sécréter une grande quantité de lymphokines. Ainsi, l'Il-3, l'Il-5 et le GMCSF sont des cytokines sécrétés par les lymphocytes T qui ont une action puissante pour recruter, prolonger, assurer la survie et activer les éosinophiles. D'autres cellules comme les macrophages et les neutrophiles jouent un rôle encore mal précisé dans l'inflammation asthmatique.

3.2.1.2 Existe-t-il une composante génétique ?

L'existence d'une composante héréditaire, génétique de l'hyperréactivité bronchique non spécifique est un sujet controversé. L'étude de la génétique de l'hyperréactivité bronchique dans l'espèce humaine est difficile, parce qu'il n'y a pas de phénotype bien défini et parce que dans certaines affections comme l'asthme, la composante inflammatoire est acquise au premier plan. Il y a plusieurs études de concordance chez des jumeaux mono ou dizygotes, de distribution dans la population générale et de transmission familiale dont les résultats sont en faveur de la transmission de génération en génération de l'hyperréactivité bronchique dans l'espèce humaine. Ceci

est vrai pour la réponse des bronches aux agonistes cholinergiques tant sont rares les études génétiques faites avec d'autres stimuli. Il n'y a pas de consensus sur le mode de transmission de cette hyperréactivité bronchique.

3.2.1.3 Rôle de l'épithélium

Les cellules épithéliales bronchiques recouvrent l'ensemble des voies aériennes. Le film de mucus qui tapisse le pôle apical et l'organisation du cytosquelette expliquent leur fonction de barrière de protection vis à vis d'agents inhalés organiques ou non. La desquamation des cellules épithéliales bronchiques est un phénomène très commun dans l'asthme. Ainsi, l'épithélium bronchique a été proposé comme pièce maîtresse dans le développement et le maintien de l'hyperréactivité bronchique. D'abord considéré comme une simple barrière physique limitant l'accès des agents exogènes aux autres cellules des voies aériennes, des études menées à partir de 1985 ont suggéré un rôle actif avec la sécrétion d'un facteur relaxant virtuel ; l'EpDRF (facteur relaxant dépendant de l'épithélium). Une enzyme : l'endopeptidase 24.11 (également appelée endopeptidase neutre, enképhalinase ou EC 3.4.24.11) est fixée en grandes quantités à la surface des cellules épithéliales des voies respiratoires (Johnson et coll 1985) et serait responsable de la métabolisation de certains médiateurs. Une baisse de l'activité de l'endopeptidase 24.11 pourrait être responsable de l'hyperréactivité bronchique. L'action des glucocorticoïdes permet ainsi une augmentation de l'expression de l'endopeptidase 24.11 et pourrait expliquer les effets bénéfiques chez l'asthmatique (Borson et Gruener 1991). Beasley (Beasley et coll 1989) a mis en évidence une corrélation nette entre le nombre de cellules épithéliales bronchiques dans le premier recueil de LBA et l'hyperréactivité bronchique. Des études expérimentales menées chez l'animal et chez l'homme ont montré que l'épithélium pouvait régler le tonus du muscle lisse bronchique sous-jacent (Pavlovic et coll 1989). En revanche, les cellules épithéliales bronchiques obtenues par brossage chez l'asthmatique libèrent dans le surnageant d'importantes quantités de 15HETE, de PGE₂ et de fibronectine (Campbell et coll 1993). Cette libération est spontanée et diffère

donc nettement du profil fonctionnel usuel de cellules épithéliales bronchiques de sujets normaux. Le 15HETE est un médiateur pro-inflammatoire (Salari et Chan-Yeung 1989). La PGE₂ est un métabolite des phospholipides membranaires par la voie de la cyclo-oxygénase. Ses propriétés bronchodilatatrices sont les plus connues mais il est possible que la PGE₂ entraîne oedème et vasodilatation. Enfin, la fibronectine est une glycoprotéine qui joue un rôle important dans l'attachement cellulaire, en particulier à la membrane basale. On lui attribue une fonction essentielle dans les processus de réparation épithéliale. Ainsi, les cellules épithéliales bronchiques chez l'asthmatique ont la capacité de recruter et d'activer des cellules effectrices (éosinophiles) ou régulatrices (T-lymphocytes) de l'inflammation ; elles interviennent dans la régulation du tonus musculaire bronchique, mais aussi vasculaire ; une activité NO-synthétase inductible existe dans l'épithélium de patients asthmatiques (absente chez les sujets témoins), activité amplifiée par le TNF- α en culture (Hamid et coll 1993). L'épithélium des voies aériennes et le muscle lisse lui-même pourrait sécréter NO *in situ* (Barnes 1993a). Enfin, il est difficile d'affirmer si les cellules épithéliales bronchiques sont la cause première des phénomènes physiopathologiques et par conséquent des symptômes de l'asthme, mais il est certain qu'elles participent à l'inflammation bronchique comme source de médiateurs pro-inflammatoires et comme cible des effets délétères.

3.2.1.4 L'oedème bronchique, les facteurs mécaniques et vasculaires

La résistance à l'écoulement du gaz dans les bronches dépend non seulement de la bronchomotricité mais aussi de l'état de la circulation bronchique. La congestion et l'oedème augmentent l'épaisseur de la paroi des bronches et amplifient l'effet sur leur calibre de la contraction du muscle lisse, ceci d'autant plus qu'il s'agit de bronches de moyen ou petit diamètre. De nombreux médiateurs, neuromédiateurs, médiateurs paracrines libérés par des cellules de l'épithélium ou des cellules inflammatoires ont à la fois des effets bronchomoteurs et vasculaires. Il existe en outre un couplage mécanique

entre bronchomotricité et phénomènes vasculaires. La bronchoconstriction favorise la congestion et l'extravasation dans la paroi des bronches puisque le diamètre du muscle lisse diminue plus que le diamètre externe des bronches. De plus, la dépression intrathoracique notamment dans l'asthme entraîne une surcharge mécanique des deux ventricules et favorise la survenue d'oedème bronchique et pulmonaire. Les effets de ce couplage mécanique sont renforcés en cas d'inflammation des voies aériennes, celle-ci favorisant la congestion et la fuite vasculaires. Certains stimuli comme l'exercice et l'hyperventilation favorisent la vasodilatation trachéobronchique et par conséquent l'asthme post exercice et en est, peut-être, le primum movens. A l'opposé, la vasodilatation et la congestion bronchique peuvent avoir un rôle protecteur en accélérant la clairance de substances bronchoconstrictrices ou, dans le cas de l'exercice, en réduisant l'amplitude de refroidissement et de la perte d'eau des voies aériennes. L'importance relative de la contraction du muscle lisse et des phénomènes vasculaires dans l'hyperréactivité bronchique dépend probablement de facteurs individuels comme par exemple l'intensité et la nature de phénomènes inflammatoires intrapariétaux.

Ainsi, comme l'affirme Lockhart (Lockhart et Coll 1994) les travaux réalisés jusqu'à maintenant ont permis de répondre à des questions importantes, principalement dans le domaine clinique et physiopathologique à savoir :

- l'asthme est une maladie dont la caractéristique essentielle est l'hyperréactivité bronchique qui joue un rôle important tout comme l'allergie impliquée dans de nombreux cas,
- plusieurs stimuli peuvent mettre en évidence l'hyperréactivité bronchique,
- l'évaluation de l'hyperréactivité bronchique, qui dans le cas des épreuves de provocation par des substances pharmacologiques est bien standardisée, peut être utile au clinicien pour préciser des asthmes atypiques, pour l'investigation de l'asthme professionnel et pour tenter de préciser le besoin en médicaments,
- les mécanismes de l'hyperréactivité bronchique sont multiples (rôle du muscle, de l'inflammation, de l'oedème etc...).

3.2.1.5 Rôle des radicaux libres dans le bronchospasme

Si le rôle du NO semble largement démontré dans le bronchospasme, l'éventuelle action des radicaux libres oxygénés (RLO) est moins connue. Les effets des RLO sur le système bronchique ont été étudiés précédemment (Katsumata et coll 1990, Lansing et coll 1993). Il semble établi selon Stevens (Stevens et coll 1995) que les RLO contribuent à la bronchoconstriction et à l'hyperréactivité bronchique. C'est ce que nous avons voulu vérifier chez nos animaux en mesurant les RLO dans le tissu pulmonaire à la fin de l'expérience.

CANAUX CALCIQUES

4 CANAUX CALCIQUES

4.1 Structure moléculaire - catégories

Le canal calcique est un canal ionique transmembranaire, similaire dans son mode de fonctionnement aux autres canaux cationiques qui permettent le passage du sodium et du potassium selon un gradient électrochimique. La différence de concentration de calcium entre le milieu intra (10^{-7} moles) et extra-cellulaire (10^{-3} moles) est très importante et permet la création de ce gradient. Les canaux calciques jouent un rôle important à l'apport de calcium à la cellule musculaire (couple excitation-contraction) et à la cellule nerveuse avec la libération de neurotransmetteurs (Reuter 1983).

Le canal calcique a une structure macromoléculaire. Sa configuration est cylindrique avec un pore aqueux en son centre (Hille 1984b) (figure 4). Il est constitué de cinq sous-unités désignées α_1 , α_2 , β , γ , δ .

- **La sous-unité α_1** (figure 5) : a un poids moléculaire de 212000 Dalton. Elle est constituée d'une seule chaîne peptidique et présente 4 motifs identiques comprenant chacun 6 segments transmembranaires numérotés de S_1 à S_6 (figure 5). Le segment S_4 possède des charges positives et on pense qu'il correspond au site sensible au voltage. Le site de liaison aux antagonistes du calcium est situé dans la boucle, entre les segments S_5 et S_6 du quatrième motif, au niveau de l'extrémité extracellulaire du récepteur pour les dihydropyridines et à l'extrémité intracellulaire du récepteur pour les phénylalkylamines. Mais il est fort probable que la boucle extracellulaire du segment S_5 - S_6 du troisième motif intervienne également comme site de fixation des dihydropyridines (Catterall et Striessing 1992).

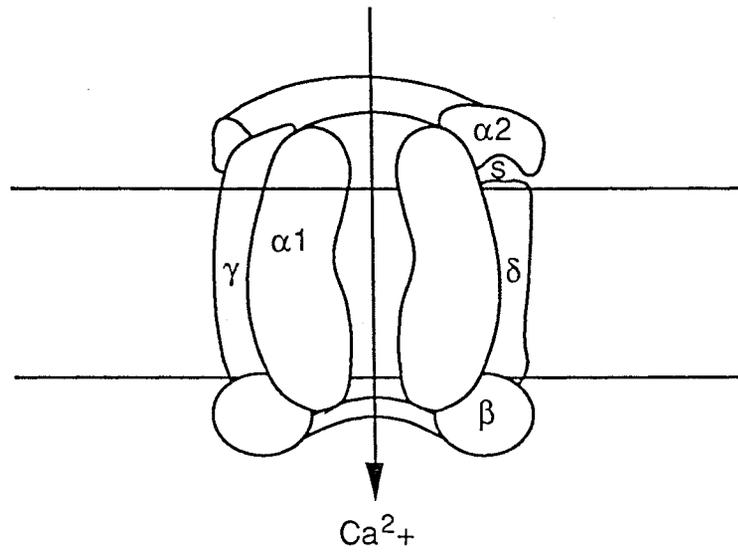


Figure 4 - Configuration du canal calcique avec ses cinq sous-unités($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , δ)

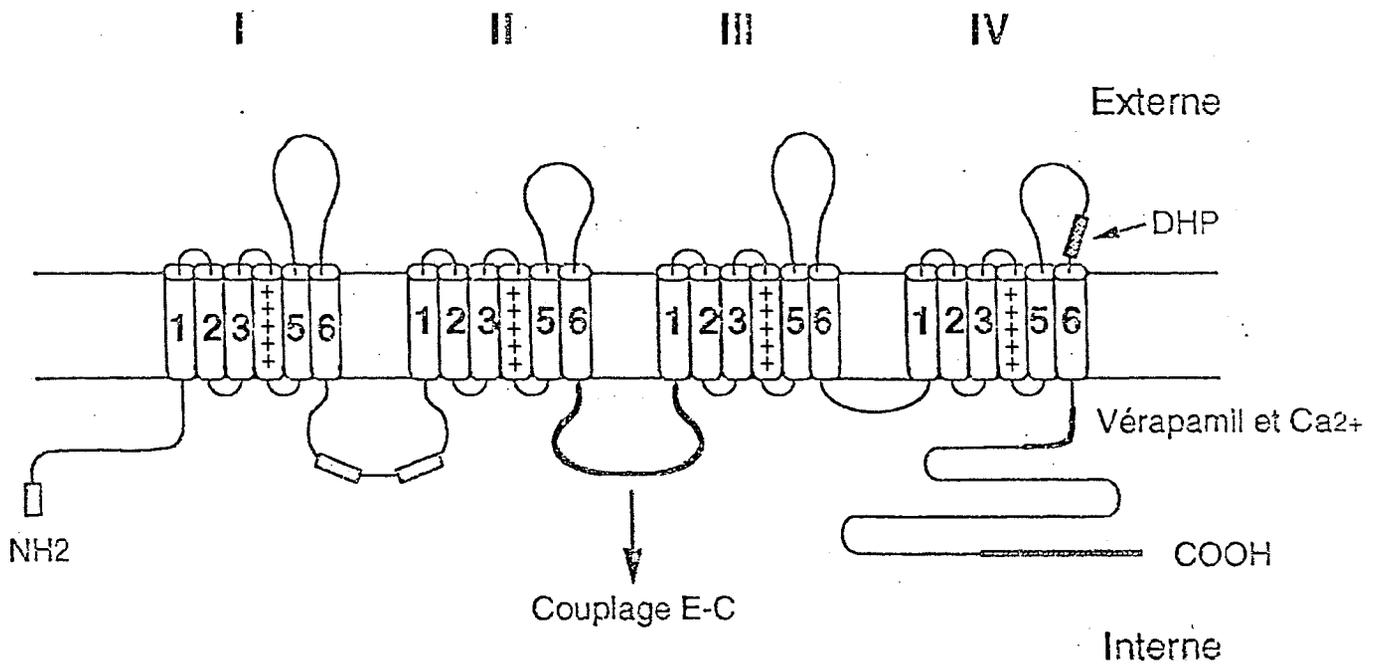


Figure 5 - Structure de la sous-unité α_1 des canaux calcium de type L indiquant leurs principales caractéristiques. On note la localisation des sites de liaison des antagonistes du calcium et la partie responsable du couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique.

Ainsi, la sous-unité α_1 porte le canal et les sous-unités Δ : sites de liaison aux antagonistes calciques. Les ADN complémentaires codant pour toutes ces sous-unités ont été clonés. Ainsi, la sous-unité α_1 a elle seule peut former un canal calcique mais les sous-unités auxiliaires jouent un rôle très important aussi bien au niveau des propriétés biophysiques qu'au niveau de la régulation ou de la pharmacologie du canal (Nargeot, 1992).

- **La sous-unité α_2 , δ** : est une protéine membranaire glycosylée de 125000 Dalton. La sous-unité δ ancre la protéine α_2 à la membrane plasmique (extracellulaire) par un pont disulfure.

- **La sous-unité β** : est une protéine constituée de 524 acides aminés (Ruth et coll 1989) et est située dans la membrane cellulaire.

- **La sous-unité γ** : est une protéine membranaire constituée de 222 acides aminés (Bosse et coll 1990). La séquence d'acides aminés contient 4 domaines membranaires et 2 sites extracellulaires de glycosylation. Cette protéine serait spécifique du muscle squelettique.

Plusieurs types de canaux calciques sont connus et caractérisés par des différences fondamentales dans les mécanismes d'ouverture et de fermeture. Certains canaux calciques sont dépendants du voltage : ce sont les canaux **VOC (Voltage Operated Channel)**. Ils s'ouvrent en réponse à une dépolarisation membranaire appropriée. Il en existe trois types (tableau II). D'autres sont dépendants d'un récepteur : **ROC (Receptor-Operated channel)** et s'ouvrent en réponse à l'activation d'un récepteur associé (Bolton 1979).

Tableau II

Canaux calciques VOC

Sous-groupes	L	N	T
Conductance (pS)	25	12-20	8
Seuil d'activation	haut	haut	bas
Vitesse d'inactivation	basse	modérée	rapide
Inhibiteurs sélectifs	Dihydropyridines Phénylalkylamines	ω -conotoxine	aucun
Sites	Neurones, muscle lisse, muscle strié	Neurones	Cellules du pacemaker cardiaque, neurones, certains muscles lisses
Fonctions	Couple excitation-contraction dans le muscle cardiaque et muscle lisse	Modulation des neurotransmetteurs	Elaboration de l'activité du pacemaker

(D'après Watson, Trends Pharmacol Sci, 1992)

4.1.1 Canaux VOC

Les canaux VOC existent dans la plupart des cellules. Ils sont intégrés à la membrane protéique et composés de combinaisons différentes de sous unités α et β avec pour conséquence des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques distinctes. Les sous-unités α (Godfraind et Govoni 1995) possèdent

- un filtre de sélectivité qui reconnaît le calcium
- un site sensible aux variations du voltage
- un site phosphorylable sensible à l'occupation des récepteurs β -adrénergiques
- un système de porte dont l'ouverture et la fermeture sont dépendants d'un changement de conformation protéique

Il existe deux portes, l'une d'activation, l'autre d'inactivation. Le canal calcique peut exister sous forme de trois états : repos, ouverture ou activation, fermeture ou inactivation.

A l'état de repos et d'inactivation le calcium ne peut traverser la membrane. **L'état de repos** est caractérisé par la fermeture de la porte d'activation et l'ouverture de la porte d'inactivation. Lors de la dépolarisation, à un niveau donné de potentiel de membrane, la porte d'activation s'ouvre et le calcium traverse la membrane selon le gradient de concentration.

La fermeture de la porte d'inactivation détermine **l'état inactivé**. Cet état n'est pas équivalent à l'état de repos car la porte d'activation reste ouverte mais le canal est réfractaire à toute activation.

Le retour à l'état de repos survient lorsque le potentiel de membrane est restauré par les mouvements potassiques.

- **Le type L** (late ou lent) (Nowycky et coll 1985, Fox et coll 1987 a b) activé par un haut voltage, est un canal qui conduit un courant de longue durée et de large conductance (25 pS). Il est distribué dans tout l'organisme et est modulé non seulement

par les inhibiteurs calciques des trois classes, les modifications du potentiel de membrane mais également par les hormones et neurotransmetteurs. La sous-unité $\alpha 1$ est le récepteur pharmacologique des antagonistes du calcium.

- **Le type T** (transient ou rapide) (Nowycky et coll 1985, Fox et coll 1987 a et b), est un canal calcique (Carbone et Lux 1984) rapide (Cognard et coll 1986) activé par un bas voltage (Carbone et Lux 1984) et caractérisé par un courant éphémère de faible conductance (9 pS). Il est identifié dans de nombreux tissus en particulier les neurones, les muscles lisses, les muscles striés cardiaques et squelettiques, et est insensible aux inhibiteurs calciques. Il est activé par de faibles dépolarisations à partir de potentiels très négatifs, s'ouvre de façon transitoire et pourrait être modulé par des neurotransmetteurs comme la noradrénaline. Leur rôle physiologique est mal connu.

- **Le type N** (neuronal) (Nowycky et coll 1985) n'est ni T ni L, mais est activé par un haut voltage et conduit un courant relativement rapide ou intermédiaire (15 pS). Il n'a été décrit que dans les neurones et est activé par de fortes dépolarisations à partir de potentiel de membrane négatif. Il pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la libération de neurotransmetteurs. Il est insensible aux inhibiteurs calciques.

Un ou plusieurs types de canaux calciques dépendants du voltage peuvent exister dans un type cellulaire particulier. Les types T et L existent dans le coeur et le muscle squelettique mais pas le N (Bean 1985, Cognard et coll 1986). Les canaux calciques de type L et T ont été caractérisés dans le muscle lisse (Friedman et coll 1986, Loirand et coll 1986).

4.1.2 Canaux ROC

Ces canaux incluent un canal ionique non spécifique associé à un récepteur nicotinique (Changeux et coll 1984) et des canaux chlorés associés à des récepteurs

GABA (Iversen 1984). Certains canaux ioniques associés à des récepteurs sont perméables au calcium et peuvent ainsi être considérés comme des canaux ROC. Dans le muscle lisse existent des canaux qui s'ouvrent par l'activation de récepteurs à l'ATP (Benham et Tsien 1987). Il existe différents types de canaux ROC.

Les canaux calciques semblent avoir un système d'entrée identique aux canaux sodiques avec possibilité de transformation en trois différentes conformations ou états (Tsien 1983). Un de ces états est la fonction ouverte et correspond au stade activé. Les deux autres correspondent à la fonction fermée avec un stade désactivé et un stade inactivé. Les canaux calciques sont divisés en deux groupes en fonction du stimulus excitatoire nécessaire à la conversion en stade activé. Un groupe est voltage dépendant et est transformé en stade activé une fois que le potentiel membranaire a atteint un niveau seuil. L'autre groupe semble être associé à des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique. La transformation en stade activé peut être obtenue par interaction des récepteurs avec les neurotransmetteurs ou hormones. Beaucoup de cellules excitables possèdent ces deux types de canaux.

4.2 Les canaux calciques de la fibre musculaire lisse bronchique

Il n'existe qu'un seul type de canal calcique potentiel-dépendant (VOC) dans la membrane plasmique des cellules musculaires lisses des voies aériennes chez l'homme (Marthan et coll 1989a). La conductance de ces canaux calciques de type L observés dans le muscle lisse des voies aériennes est de 25 pS. L'ouverture peut être inhibée par les dihydropyridines et l'inactivation peut être favorisée, d'une part par l'entrée de calcium dans la cellule et d'autre part, par une dépolarisation cellulaire. L'ouverture de ces mêmes canaux calciques est promue par l'activation des récepteurs muscariniques et β . Quoiqu'il en soit, le rôle de l'ouverture des canaux calciques de type L dans la médiation des effets contractiles des agonistes muscariniques ou des effets relaxants des agonistes β est peu clair. Mais il existe également des canaux ROC. Ils ont été mis en évidence dans le

muscle lisse bronchique humain en 1991 grâce à la technique de mesure de la concentration calcique intracellulaire par sonde fluorescente (Murray et Kotlikoff 1991). Ces canaux peuvent être activés par l'histamine et permettent une entrée de calcium extracellulaire en fonction du gradient électrochimique (lié aux ions Ca^{2+}). Ils ne sont pas bloqués par les antagonistes des canaux calciques potentiel-dépendants.

Les ions calcium qui génèrent une réponse mécanique des cellules du muscle lisse peuvent être mobilisés des réservoirs calciques intracellulaires et/ou du pool calcique extracellulaire (calcium libre et lié). Il existe deux voies d'accès pour que le calcium traverse la membrane cellulaire et gagne l'appareil contractile. L'une est le canal ROC et l'autre le VOC (Bolton, 1979), qui dans le muscle lisse, sont deux entités distinctes.

4.3 Pharmacologie des canaux calciques

L'analyse des propriétés des canaux ioniques a été possible grâce au développement de la technique du patch clamp (Hamill et coll 1981). D'importantes investigations pharmacologiques et biochimiques ont été complémentaires d'études électrophysiologiques (Miller 1987, Triggle et Janis 1987), et ont permis la découverte d'agents ayant une action sélective sur les canaux calciques. Ces médicaments sont non seulement utilisés dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Janis et Triggle 1984) mais continuent à être utilisés afin d'élucider les propriétés moléculaires des canaux calciques. Il existe trois classes chimiques distinctes auxquelles on peut ajouter diverses molécules ayant une activité inhibitrice calcique.

- **Les dérivés des 1-4 dihydropyridines (DHP)**
- **Les phénylalkylamines**
- **Les benzothiazépines**

La plupart des médicaments développés semblent avoir plutôt une action sur les canaux calciques de type L. Cependant, les études réalisées ne l'ont pas été

systématiquement avec tous les médicaments ni sur tous les types de canaux. Le canal calcique de type L est le seul connu, sensible aux 1-4 dihydropyridines, mais également à toutes les dihydropyridines. Ces canaux possèdent des récepteurs de haute affinité pour ces médicaments et un des récepteurs se lie spécifiquement aux dérivés de la 1-4 dihydropyridine selon une constante de dissociation (Glossman et coll 1985b). D'autres travaux (Hamilton 1987) ont suggéré qu'il existait plus d'un site de fixation de haute affinité associé aux récepteurs des dihydropyridines. En effet, l'un est associé à l'activation du canal calcique et l'autre à son inhibition. Mais il existe d'autres récepteurs qui se lient aux phénylalkylamines (type vérapamil), au bepridil et aux benzothiazépines (Glossmann et coll 1985, Murphy et coll 1983). Les phénylalkylamines et le bepridil semblent se lier à un même récepteur distinct de celui des dihydropyridines. Le RO 40-5967, un dérivé benzimidazolyl-tétraline substitué bien que différent largement par sa structure du vérapamil se lie sur les membranes cardiaques au même site que le [³H] desméthoxy-vérapamil (Clozel et coll 1991). Les benzothiazépines peuvent se lier au récepteur des phénylalkylamines, bépridil (Murphy et coll 1983) ou à un récepteur distinct et couplé allostériquement au récepteur des phénylalkylamines, du bepridil et des benzothiazépines et agissent de façon compétitive au niveau des récepteurs des canaux calciques de type L (Murphy et coll 1983). Ainsi, comme les benzothiazépines favorisent la liaison des dihydropyridines, alors que les phénylalkylamines et le bepridil inhibent la liaison des dihydropyridines, il est licite de concevoir un site de fixation pour les benzothiazépines et un autre pour les phénylalkylamines et le bepridil. Dans cette optique, des sites de fixation de haute et faible affinité pour les phénylalkylamines ont été décrits dans les membranes cellulaires cardiaque, musculaire, squelettique et cérébrale. Ainsi, il existe au moins 3 voire 4 (peut-être plus) récepteurs médicamenteux distincts sur les canaux calciques de type L, capables d'interaction allostérique.

4.4 Caractéristiques fonctionnelles des canaux calciques

La pénétration des ions calcium dans le cytosol par l'intermédiaire de pores se fait en plusieurs étapes. L'étape initiale consiste en une interaction réversible entre l'ion divalent et un site de liaison situé à proximité ou au niveau de la surface du canal (Hagiwara et Byerly 1981). Cette réaction nécessite de l'énergie. Certains aspects dynamiques de ce mouvement ionique simulent ceux observés dans les réactions enzymatiques qui obéissent à la loi de Michaelis-Menten (Hagiwara et Takahashi 1967, Hagiwara et Byerly 1981). Ainsi, l'interaction entre certains cations et le site de liaison canalaire peut être caractérisée par une constante de dissociation invariable tant que les conditions physicochimiques ne sont pas modifiées (température, potentiel membranaire etc...). La relation entre le taux de pénétration de cations à travers les canaux calciques et la concentration de cations extracellulaires définit une courbe de saturation hyperbole (Hagiwara et Takahashi 1967).

- Le taux de saturation des sites de liaisons à l'intérieur ou sur les canaux calciques est un des éléments qui apporte de l'énergie au mouvement cationique.
- Le second paramètre est l'interaction entre le champ électrique membranaire et la charge ionique qui traverse la membrane.

Dans le pore aqueux du canal calcique, la force électromotrice qui permet au cation de pénétrer la cellule, peut être inhibée par la configuration stérique des groupes réactifs ou en d'autres termes par des barrières d'énergie. L'une de ces barrières semble être suffisamment importante pour permettre l'entrée de certains cations et empêcher le mouvement d'autres. Une telle barrière a la capacité de conférer une action sélective au canal et réduit ainsi le type d'ions autorisés à traverser la membrane. Cette barrière est considérée comme un filtre sélectif (Hille 1984) qui comme les autres barrières d'énergie sert à réguler la vitesse avec laquelle un cation traverse le pore aqueux. Le processus de vitesse détermine l'intensité électrique maximale qu'un ion donné peut générer par ses mouvements à travers une population de canaux calciques dans certaines conditions.

Quand la relation entre l'afflux ionique et la concentration ionique extracellulaire produit une courbe de saturation hyperbole, il devient implicite sur le plan conceptuel qu'un seul ion puisse traverser le canal à un moment donné (Hess et Tsien 1984). Le canal calcique possède une séquence de trois barrières d'énergie et ne peut contenir qu'un seul cation sur un des deux sites de fixation ou simultanément deux cations qui occupent deux sites. Quand les deux sites sont occupés, il existe une force répulsive entre les deux cations qui favorise l'évacuation d'un cation de l'un ou de l'autre des deux sites dans le milieu environnant.

4.4.1 Régulation des canaux calciques par les neurotransmetteurs, la protéine kinase C, la protéine G

Les canaux calciques de la plupart des cellules sont régulés par deux types différents de neurotransmetteurs.

- Le premier identifié et le mieux connu est le **second messager** qui régule les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation.

- Le second découvert plus récemment correspond à la **protéine G**.

Ainsi, les canaux sont régulés par une phosphorylation AMPc dépendante ou par une protéine régulatrice. Les effets inhibiteurs de l'activation des récepteurs muscariniques des cellules cardiaques sont plutôt liés à une diminution de l'AMPc, à une diminution des taux actifs d'AMPc dépendants de la protéine kinase et une nette déphosphorylation de la protéine régulatrice (Reuter 1983). Certains canaux calciques semblent être soumis à la régulation de la protéine kinase AMPc dépendante comme les cellules du muscle squelettique alors que d'autres comme les cellules du muscle lisse ne le sont pas. L'AMPc contrôle la synthèse des récepteurs des effecteurs des canaux calciques et des canaux de type L.

L'élucidation du mécanisme complexe de la régulation des différents types de canaux calciques devrait intervenir grâce aux progrès de la biologie moléculaire.

4.5 Activation des canaux VOC

Il est possible d'étudier la relation entre le potentiel membranaire et l'importance du courant qui traverse les canaux calciques VOC. Le potentiel membranaire doit être réduit à un niveau seuil avant que tout courant calcique ne soit détectable. Lorsqu'il se positive, un courant d'entrée calcique est induit (Hille 1984). Cette augmentation progressive du courant calcique est la conséquence d'une augmentation progressive de la conductance ionique (c'est-à-dire une diminution de la résistance électrique) qui reflète l'activation d'un nombre croissant de canaux calciques (Hille 1984). Ainsi, une partie de la force électromotrice (c'est-à-dire l'interaction entre les ions calcium et le champ électrique membranaire) devient plus faible en même temps que le potentiel membranaire devient plus positif (Hille 1984). Ce phénomène diminue le flux du courant entrant. Tant que les échanges au niveau du potentiel de membrane sont modérés, l'augmentation de la conductance ionique semble avoir une plus grande influence sur le flux du courant que ne le fait la diminution de la force électromotrice, ce qui est rendu évident par l'augmentation progressive du courant calcique. Quoiqu'il en soit, les variations du potentiel membranaire deviennent suffisamment importantes afin d'activer un pourcentage suffisant de canaux calciques. Pendant que le potentiel membranaire devient plus positif, l'entrée du courant calcique augmente progressivement jusqu'à atteindre un maximum (Hille 1984). Ensuite, il diminue progressivement. La dépolarisation (augmentation de la positivité) cellulaire augmente la conductance des canaux calciques voltage-dépendant et est fonction du comportement stochastique des canaux calciques. Ainsi, pour un potentiel membranaire donné, tous les canaux calciques membranaires fluctuent entre le stade désactivé et le stade activé. La transformation du canal du stade désactivé en stade activé semble requérir la position de particules chargées ou de parties composantes à l'intérieur

du canal (Hagiwara et Byerly 1981). Ce procédé est dans les deux cas voltage et temps dépendant (Hille 1984b).

4.6 Inactivation des canaux VOC

Il existe plusieurs types de canaux calciques voltage-dépendants, chacun réagissant à sa façon à une réduction du potentiel membranaire. L'élévation de la conductance est une conséquence directe de l'ouverture des canaux. Un canal calcique inactivé ou désactivé est fermé et ne permet pas l'afflux d'ions. Le stimulus spécifique qui initie la transformation d'un canal calcique du stade désactivé ou activé en un stade inactivé varie en fonction du type de canal calcique. Dans la plupart des tissus, les canaux calciques voltage-dépendants, quoique rapidement activés par une diminution du potentiel membranaire ne sont pas inactivés par un niveau du potentiel membranaire maintenu bas dans le temps. Le calcium libre intracellulaire est le stimulus inactivant (Towart et Schramm 1984). Pour Eckert et Chad (1984), le calcium libre intracellulaire réagit réversiblement avec les sites de fixation des canaux calciques. Chaque interaction ion calcium-canal calcique conduit hypothétiquement à une déphosphorylation enzymatique d'une partie du canal et produit ainsi une inactivation du canal (Eckert et Chad 1984). Les ions calcium intracellulaires sont supposés avoir une affinité pour les sites de fixation canaux si le canal est activé ou inactivé. L'inactivation des canaux calciques est supposée être la conséquence de l'interaction réversible entre les sites de fixation des canaux calciques et les ions calcium intracellulaires. Ainsi, le taux de canaux calciques devenant inactivés est probablement dépendant de la concentration de calcium libre cytosolique. La concentration intracellulaire d'ions calcium des cellules excitables au repos est habituellement très basse. Cependant, une augmentation importante de la concentration induite par une baisse suffisante du potentiel membranaire initie un afflux substantiel de calcium intracellulaire. Si l'afflux résultant d'ions calcium produit une augmentation progressive de la concentration intracellulaire d'ions calcium, qui,

idéalement est linéaire en fonction du temps, alors la fraction moyenne des canaux calciques inactivés augmente comme une fonction hyperbolique. Cela signifie que l'inactivation des canaux calciques peu après la dépolarisation membranaire est relativement rapide. Quoiqu'il en soit, au fur et à mesure du temps et de l'augmentation du taux de calcium libre cytosolique, l'inactivation plus tardive des canaux calciques est lente. L'augmentation hyperbolique fonction du temps de la fraction des canaux calciques inactivés peut être considérée comme une base dynamique de l'inactivation calcium-dépendante du processus. Mais ceci peut être modifié par plusieurs facteurs. Un des facteurs est la variation dans le temps de l'afflux cellulaire du calcium. L'entrée du courant calcique augmente rapidement. Une fois ces variations terminées et en l'absence de l'influence d'autres modifications, le flux de courant déploie une amplitude constante qui signifie l'obtention de nouvelles conditions d'équilibre pour l'activation des canaux calciques. Ainsi, après la dépolarisation membranaire, le courant calcique présente une forte augmentation en amplitude, atteint un pic (en dessous de l'état d'équilibre pour l'activation), puis une chute lente. Mais, il existe certains processus intracellulaires qui altèrent incontestablement la concentration de calcium libre cytosolique. Il s'agit :

- de la diffusion des ions calcium en dehors des sites d'interaction avec les canaux calciques,
- de l'interaction entre les ions calcium et les sites de fixation intracellulaires,
- de la séquestration et/ou de l'expulsion des ions calcium par des pompes à calcium énergie-dépendantes.

En dépit de l'influence de ces facteurs modificateurs, le pourcentage du processus d'inactivation calcium-dépendant est biphasique. Initialement, il existe une phase rapide d'inactivation qui correspond à la pente raide de la courbe hyperbolique, la phase lente correspond à la pente plus douce de la courbe.

4.7 Canaux calciques ROC

Les canaux calciques étroitement unis aux récepteurs membranaires et activés par l'interaction agoniste-récepteur sont appelés ROC. Ils jouent un rôle important dans le comportement fonctionnel du muscle lisse et certaines cellules sécrétoires. En raison du manque de données expérimentales caractérisant les canaux calciques ROC, leurs propriétés spécifiques restent largement inconnues.

PHARMACOLOGIE

DES INHIBITEURS

CALCIQUES

5 PHARMACOLOGIE DES INHIBITEURS CALCIQUES

L'obstruction des voies aériennes rencontrée dans l'asthme ou dans d'autres maladies respiratoires est souvent traitée de première intention par des agonistes des récepteurs β_2 ou dans des cas plus sévères par corticothérapie inhalée ou systémique. Les agonistes β_2 sont des bronchodilatateurs très efficaces mais leur possible association à une augmentation de la morbidité et de la mortalité dans l'asthme a été soulevée. Ainsi, une réflexion récente concernant le traitement de l'asthme a réformé les agonistes des récepteurs β_2 au rang de médicaments de sauvetage de l'obstruction aiguë des voies aériennes et suggère plutôt l'utilisation régulière d'anti-inflammatoires (British Thoracic Society 1990, National Heart, lung and blood institute 1991).

L'industrie pharmaceutique focalise la recherche sur des antagonistes de médiateurs spécifiques comme les leucotriènes (Musser 1989) ou le PAF (Platelet Activating Factor) (Saunders et Handley 1987). La recherche s'oriente vers des agents ayant un potentiel d'activités pharmacologiques multiples, avec pour perspective d'influer sur la maladie à différents degrés pathologiques. Une telle approche concerne les modulateurs des canaux ioniques et particulièrement les inhibiteurs calciques. Il est en effet logique de s'intéresser au blocage de l'entrée du calcium comme éventualité thérapeutique dans l'asthme depuis que l'on sait que la contraction de la fibre musculaire lisse, la libération de médiateurs, la production de mucus et la synthèse des médiateurs inflammatoires sont des phénomènes calcium-dépendants (Barnes 1991a).

5.1 Rôle du calcium dans les fonctions des voies aériennes

Le rôle du calcium dans les systèmes biologiques est bien établi et il est acquis que l'augmentation du calcium libre intracellulaire permet de lier un événement initialisé dans la membrane à une réponse cellulaire. La membrane cellulaire est une barrière phospholipidique relativement imperméable aux cations, comme le calcium. La structure membranaire varie afin de permettre le passage du calcium au cours des différents

événements physiologiques et physiopathologiques. Le rôle physiopathologique du calcium dans les voies aériennes est résumé dans les tableaux III, IV, V.

Les inhibiteurs calciques forment un groupe hétérogène avec des propriétés structurales, électrophysiologiques et pharmacologiques différentes. Ces médicaments sont utilisés dans le traitement des maladies cardio-vasculaires mais sont également indispensables à l'étude du flux calcique en physiologie et physiopathologie. Plusieurs événements physiopathologiques impliqués dans l'asthme bronchique sont calcium-dépendants, ainsi, les inhibiteurs calciques pourraient jouer un rôle dans la prévention et le traitement de cette pathologie. La régulation du tonus bronchomoteur est aussi dépendante du calcium, et la concentration cytoplasmique de calcium libre semble être le premier signal intracellulaire (Coburn 1977). Plusieurs études ont montré que les inhibiteurs calciques atténuent la réactivité bronchique à la métacholine (Massey et coll 1988), à l'histamine (Williams et coll 1981, Barnes et coll 1981, Corris et coll 1983) et à différents facteurs incluant l'effort (Rafferty et coll 1987) chez le sujet asthmatique. Les effets sont en général modestes hormis certaines études avec la nifédipine dans l'asthme d'effort (Cerrina et coll 1981). Chez l'animal, *in vivo*, la nifédipine a été efficace en bloquant la bronchoconstriction induite par le carbachol ou l'histamine (Brugman et coll 1983, Fanta et coll 1982) mais pas le vérapamil (Russi et coll 1983). Nous avons étudié les effets de certains inhibiteurs calciques à doses équi-hypotensives sur la réactivité de la fibre musculaire lisse bronchique et nous ne détaillerons dans ce chapitre que les inhibiteurs calciques utilisés dans ce travail.

5.2 Classification chimique des antagonistes du calcium (tableau VI)

5.2.1 Les dihydropyridines

La première substance commercialisée dans ce groupe fut la nifédipine. La modification des substituants sur le noyau dihydropyridine est probablement en grande

Tableau III

Rôle physiopathologique du calcium dans les fonctions des voies aériennes

<u>I Libération de médiateurs</u>	
Immunologique	Entrée de Ca ⁺⁺ extracellulaire
Non immunologique	Mobilisation de Ca ⁺⁺ intracellulaire
<u>II Synthèse de médiateurs</u>	
Ca ⁺⁺ stimule la synthèse de la 5-lipooxygénase et probablement de la phospholipase A ₂	
<u>III Secrétions trachéobronchiques</u>	
Glycoprotéines	
augmentation Ca ⁺⁺ extracellulaire	augmentation des sécrétions
augmentation Ca ⁺⁺ intracellulaire	augmentation des sécrétions
diminution Ca ⁺⁺ extracellulaire	augmentation des sécrétions
Electrolytes	
diminution Ca ⁺⁺ extracellulaire	diminution de la résistance électrique
augmentation Ca ⁺⁺ intracellulaire (Ca ⁺⁺ ionophore A23187)	augmente sécrétion du chlore et abolit le transport du sodium
Muscle lisse des voies aériennes	
augmentation Ca ⁺⁺ intracellulaire (cytoplasme)	Contraction (couple pharmaco- ou électromécanique)
Diminution Ca ⁺⁺ intracellulaire	Relaxation

(D'après Russi EW, Ahmed T, Chest, 1984)

Tableau IV

Effets pulmonaires des inhibiteurs calciques *in vitro*

<u>I Libération de médiateurs</u>			
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la libération des médiateurs par les mastocytes • Inhibition de la libération du SRSA et du PAF 			
<u>II Synthèse de médiateurs</u>			
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition production de leucotriènes induite par ionophore A-23187 dans le poumon de rat • Inhibition de la synthèse de lipooxygénase (12HETE) induite par l'hypoxie dans les fibroblastes de coeur de rat 			
<u>III Sécrétions trachéobronchiques</u>			
Pas d'information disponible			
<u>IV Muscle lisse des voies aériennes</u>			
(effet sur la contraction de la fibre musculaire lisse)			
Inhibiteur calcique	Stimulus	Espèces	Réponses
Nifédipine	histamine carbachol	cobaye	+
Nifédipine	histamine acétylcholine antigène	cobaye	-
Nifédipine	histamine acétylcholine antigène LTC4 LTD4	homme	+
Vérapamil	antigène	homme	+
Vérapamil	histamine carbachol LTD4	cobaye	+
Vérapamil	acétylcholine	mouton	+
Nitrendipine	carbachol histamine	cobaye	-
Gallopamil	acétylcholine	mouton	+

+ Atténuation de la contraction de la fibre musculaire lisse

- Pas d'effet sur la contraction de la fibre musculaire lisse

(D'après Russi, Chest, 1984)

Effets pulmonaires des inhibiteurs calciques *in vivo*

I Libération de médiateurs			
Inhibition de la libération d'histamine au cours de la bronchoconstriction induite par l'exercice			
II Synthèse de médiateurs			
Inhibition génération thromboxane, PGF ₂ α, PGF ₁ α induite par une endotoxine			
III Sécrétions trachéobronchiques			
Pas d'effet sur la diminution de la clearance muco-ciliaire induite par un antigène			
IV fibre musculaire lisse des voies aériennes			
(effet sur une bronchoconstriction induite)			
Inhibiteur calcique	Stimulus	Espèces	Réponses
Nifédipine	histamine métacholine antigène acide citrique PGF ₂ α	cobaye chien	+
Nifédipine	métacholine histamine EIB froid antigène	homme	+
Vérapamil	antigène	mouton	+
Vérapamil	histamine carbachol métacholine	mouton homme	-
Vérapamil (voie orale)	antigène	homme	-
Vérapamil (inhalé)	antigène LTD4	homme	+
Gallopamil	antigène acétylcholine histamine	homme mouton	+
Gallopamil	antigène	mouton	+
Diltiazem	EIB	homme	-

+ Atténuation partielle ou totale de la bronchoconstriction induite

- Pas d'effet sur la bronchoconstriction induite

(D'après Russi, *Chest*, 1984)

Tableau VI
Antagonistes du calcium.
Première et deuxième génération

	1 ^{ère} génération	2 ^e génération
Les Phénylalkylamines	vérapamil	gallopamil (D 600) anipamil falipamil (AQ-A39) RO 40-5967 tiapamil (RO 11-1781)
Les dihydropyridines	nifédipine	nicardipine amlodipine félodipine isradipine lacidipine nisoldipine nitrendipine nimodipine niguldipine CD 349 mépirodipine MLD 72567 8663 S manidipine (CV-4093)
Les benzothiazépines	diltiazem	clentiazem
Les diphenylpipérazines	cinnarizine	flunarizine

partie, à l'origine des propriétés pharmacologiques faisant état de sélectivité ou de tropisme vasculaire différencié. Une caractéristique commune à toutes ces molécules à l'exception de la nifédipine est l'existence d'un carbone asymétrique. Toutes les substances sont administrées sous forme d'un mélange des deux stéréoisomères. Les caractéristiques de chaque isomère ne sont actuellement pas toutes connues. Le métabolisme hépatique est identique pour toutes les molécules de la série, avec une oxydation, mise en oeuvre du cytochrome P₄₅₀ et formation de l'analogue pyridinique. Certains composés ont un métabolisme stéréospécifique. En plus de la nifédipine, on distingue :

- les dérivés de seconde génération : nisoldipine, nicardipine, nimodipine, nitrendipine et félodipine (2 groupes chlore)
- les molécules plus récentes : amlodipine, isradipine et lacidipine (avec une chaîne latérale).

La nifédipine

Elle a été découverte en même temps que le diltiazem et le vérapamil au début des années 1960. Le problème majeur, lors de l'étude de ses propriétés pharmacocinétiques a été celui de sa photodécomposition à la lumière (Sorkin et coll 1985). La demi-vie est très dépendante de la forme d'administration. La biodisponibilité est faible (43 à 72 %) liée à l'existence d'un effet de premier passage hépatique (30 à 40 %) (Murdoch et Brodgen 1991). 75 à 80% de la dose sont retrouvés sous forme de métabolites dans l'urine. Le volume de distribution (1,32 l/kg) (Robertson et coll 1988) est le reflet d'une forte fixation protéique plasmatique qui se fait essentiellement sur l'albumine (92-98 %) et l' α_1 -glycoprotéine. Les études chez le sujet âgé (Robertson et coll 1988) montrent une diminution du premier passage hépatique et de la clairance sans modification du volume de distribution. Il n'existe aucune modification en cas d'insuffisance rénale, même si des résultats contradictoires ont été retrouvés.

5.2.1.1 Dérivés de seconde génération

La nimodipine est une dihydropyridine à tropisme cérébral qui en vasodilatant les vaisseaux artériels cérébraux augmente le débit sanguin cérébral chez l'homme et l'animal. La sensibilité à la lumière et les taux circulants faibles ($< 10 \mu\text{g/l}$) expliquent en partie les variations importantes des paramètres cinétiques observés. La demi-vie après administration intraveineuse varie de 0,9 à 1,5 h alors qu'après une prise orale on trouve des valeurs de 1,7 à 7,2 h (Langley et Sorkin 1989). La biodisponibilité varie selon la forme administrée (capsule 13 % - comprimé 6 à 11,6 %) mais reste faible compte tenu du premier passage hépatique. Le volume de distribution à l'état d'équilibre varie de 0,94 à 2,3 l/kg tandis que le volume du compartiment central reste faible (0,3 l/kg), reflet d'un fort pourcentage de fixation protéique (98%). Après métabolisme hépatique, tous les métabolites sont excrétés dans l'urine. La clairance d'élimination est très variable d'un sujet à l'autre : elle est en moyenne de 1,19 l/h/kg. Les influences de l'âge et de l'insuffisance rénale n'ont pas été dissociées, il existe une diminution de la clairance avec parallèlement une augmentation de la demi-vie par comparaison à des sujets sains.

La nicardipine est peu hydrosoluble mais surtout moins sensible à la lumière. La demi-vie d'élimination est très courte quelle que soit la voie d'administration (107 minutes après voie intraveineuse et 45-97 minutes après voie orale). La biodisponibilité reste inférieure à 30 % (Sorkin et Clissold 1987). Elle augmente parallèlement à l'augmentation des doses administrées ce qui laisserait supposer une saturation du métabolisme hépatique. Le volume de distribution est de l'ordre de 0,64 l/kg avec un pourcentage de fixation plasmatique de 98-99,5 %. Cette liaison se fait aussi bien sur l'alpha-glycoprotéine que l'albumine et les lipoprotéines. Elle est dépendante du pH plasmatique (si le pH augmente, la liaison augmente). La clairance d'élimination essentiellement métabolique est différente selon la voie d'administration, en moyenne 0,6 l/h/kg après voie intraveineuse et 3 l/h/kg après voie orale. Elle est plus faible quand la dose administrée est plus grande, laissant également supposer une saturation du

métabolisme. Les métabolites formés sont inactifs pharmacologiquement et éliminés par l'urine sous forme libre ou glycuconjuguée, et pour 30 % par voie fécale, après excrétion biliaire. Aucun effet de l'âge ni de l'insuffisance rénale n'a été rapporté. L'importance du premier passage hépatique nécessite la prudence en cas d'insuffisance hépatique. Les formes à libération prolongée assurent une meilleure compliance du sujet en diminuant le nombre de prises, mais surtout réduisent les pics de concentration souvent en relation avec l'apparition d'effets adverses. Celles-ci délivrent de façon continue des quantités plus faibles de nicardipine permettant d'éviter le phénomène de saturation du métabolisme hépatique.

5.2.2 Les phénylalkylamines

Vérapamil

Il y a présence d'un carbone asymétrique avec existence de 2 isomères optiques (-)S et (+)R et les taux faibles ont nécessité d'attendre le développement analytique pour isoler ces deux isomères et avoir des paramètres cinétiques pour chacun. La forme (-)S est la forme active chez le malade mais le vérapamil est toujours administré sous forme d'un racémique (mélange à parts égales des deux isomères). Après l'administration orale, le pic de concentration est atteint en 1 à 2 h, le fort premier passage hépatique réduit la biodisponibilité à 40 %. Celle-ci apparaît plus importante sous la forme (+)R inactive. La demi-vie est courte (2-7 h). Le vérapamil a une clairance hépatique voisine de celle du diltiazem (0,73 l/kg/min). Le volume de distribution du compartiment central est de 4,8 l/kg pour un volume à l'état d'équilibre de 6,2 l/kg (Kates 1983). Le pourcentage de fixation protéique varie de 84 à 91,3 %. L'hypothèse d'une stéréospécificité de l'extraction présystémique a été confirmée par Rasyms (Rasyms et coll 1992) : la forme (-)S a une clairance (16,2 ml/min/kg) 1,7 fois plus élevée que la forme (+)R (10,2 ml/min/kg). Aucune influence de l'âge et de l'insuffisance rénale n'a été montrée. En cas d'insuffisance hépatique, la demi-vie est prolongée avec un risque d'accumulation du produit (Kates 1983)

Le **RO40-5967** est un dérivé benzimidazolé (1S,2S)-2-[2-[[3-(2-benzimidazolyl) propyl] méthyl-amino] éthyl]-6-fluoro-1,2,3,4-tétrahydro-1-isopropyl-2-naphtyl méthoxyacétate dichlorhydrate). C'est une poudre cristalline blanche chimiquement stable, soluble dans l'eau et insensible à la lumière (Clozel et coll 1991). Bien que de structures différentes du vérapamil, il se lie aux récepteurs type-vérapamil des membranes cardiaques. Chez l'homme sain par administration intra-veineuse en 30 minutes, la plus forte concentration de drogue inchangée est atteinte à la fin de la perfusion. Après la phase initiale de distribution, une phase terminale d'élimination a une demi-vie apparente de 10-15 h. Après une dose orale la demi-vie d'élimination n'est pas différente (Clozel et coll 1991). Les inhibiteurs calciques existants ont tous une faible biodisponibilité en raison d'un important effet de premier passage hépatique et une demi-vie relativement courte. Ce nouveau composé RO 40-5967 a une biodisponibilité importante, une demi-vie longue autorisant une prise quotidienne ; il n'entraîne pas d'inotropisme négatif, et pas de vasodilatation périphérique importante chez les sujets normotendus.

5.3 Action des antagonistes du calcium

5.3.1 Action sur le poumon

L'obstruction des voies aériennes chez l'asthmatique est associée à une série d'événements physiopathologiques complexes : la contraction de la fibre musculaire lisse induite par les médiateurs libérés par les cellules inflammatoires, la production excessive de mucus et l'activation de différentes voies nerveuses (Barnes 1989).

Ces événements mènent à une obstruction et une inflammation des voies aériennes ainsi qu'une hyperréactivité bronchique.

Une approche thérapeutique a été tentée en utilisant les inhibiteurs calciques. La source majeure de calcium, pour la plupart des événements aigus des réactions

asthmatiques, provient des réserves intra-cellulaires (Barnes 1991a). Ainsi, il n'est pas surprenant que les inhibiteurs calciques n'aient pas eu plus de succès dans la mesure où ils n'ont été utilisés qu'en période aiguë. Ces composés sont actifs contre l'inflammation associée aux réactions tardives (après exposition antigénique) dans la mesure où le réapprovisionnement du calcium intra-cellulaire à partir des sources extra-cellulaires peut jouer un rôle dans l'inflammation chronique associée à l'asthme. Le rôle des inhibiteurs calciques dans la prévention de l'obstruction des voies aériennes (après exposition antigénique) a été évaluée chez l'animal (Brugman et coll 1983, Russi et coll 1983) et chez l'homme (Ahmed et coll 1988) (Solway et Fanta 1985). Les études chez l'animal ont démontré l'efficacité des inhibiteurs calciques mais les posologies nécessaires ont été associées à des effets secondaires vasculaires. Les études réalisées chez l'homme sont contradictoires en regard de l'efficacité et de la sélectivité pour les voies aériennes. Beaucoup de ces études n'ont pas étudié la voie inhalée. Cependant, le gallopamil a été utilisé en aérosol dans l'obstruction des voies aériennes (allergique) chez l'homme (Ahmed et coll 1988) ; le gallopamil inhibe plus efficacement la phase précoce de l'obstruction des voies aériennes que le cromoglycate de sodium. Chez le mouton allergique (D'Brot et coll 1989), l'aérosol de gallopamil inhibe non seulement la phase précoce de l'obstruction des voies aériennes mais également la phase tardive qui semble être médiée au moins en partie par la libération de leucotriènes par les cellules inflammatoires du poumon (Abraham et coll 1986). Enfin, la libération pulmonaire des leucotriènes est inhibée par les inhibiteurs calciques (Lee et coll 1983). Ainsi, ces études démontrent le potentiel thérapeutique des inhibiteurs calciques dans le traitement de l'asthme en vertu de propriétés relaxantes sur la fibre musculaire lisse et de l'activité anti-asthmatique (inhibition de la phase tardive de l'obstruction des voies aériennes).

5.3.2 Autres effets

Les trois familles chimiques possèdent des profils pharmacologiques différents, liés à leur activité tissulaire.

La nifédipine, chef de file du groupe des dihydropyridines possède une sélectivité vasculaire marquée qui l'expose à une moindre réduction de la contractilité et de la conduction cardiaque que le vérapamil, chef de file des phénylalkylamines dont la sélectivité cardiaque est plus importante. Le diltiazem du groupe des benzothiazépines présente un profil intermédiaire. Les antagonistes calciques possèdent pour le traitement de l'hypertension artérielle de nombreux avantages : ils baissent la pression artérielle par une diminution des résistances périphériques totales. Ils possèdent des propriétés vasodilatatrices coronaires. Ils sont en général bien tolérés sur le plan clinique et leurs effets secondaires, le plus souvent bénins et réversibles, sont généralement liés aux caractéristiques pharmacologiques du produit . Ils ont un profil biochimique neutre pour la glycémie et les lipides et ont un potentiel anti-athéromateux. Enfin, ils sont efficaces et bien tolérés sur le plan clinique et biologique chez le sujet âgé, chez le diabétique insulino-dépendant et chez l'insuffisant rénal.

CANAUX

POTASSIQUES

6 Canaux potassiques

6.1 Rappel d'électrophysiologie cellulaire

Pour un non électrolyte (molécule sans charge électrique), la condition d'équilibre de part et d'autre d'une membrane perméable est obtenue lorsque les concentrations sont égales. Dans ce cas, la différence de potentiel est nulle.

Dans le cas d'un électrolyte, la condition d'équilibre doit également prendre en compte la répartition des charges électriques de part et d'autre de la membrane pour aboutir à une différence de potentiel électrochimique trans-membranaire de valeur nulle. Les concentrations intra- et extra-cellulaires ne peuvent être identiques.

Le potentiel membranaire est défini par l'équation de Nernst :

$$E_m = E_i - E_e = \frac{RT}{ZF} \cdot \log C_e/C_i$$

où Z est la charge de l'ion considéré, F le faraday, E le potentiel électrique, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue, C_e la concentration en milieu extra-cellulaire et C_i la concentration en milieu intra-cellulaire. Une différence de concentration peut donc exister dans les conditions d'équilibre pour un électrolyte si elle est contrebalancée par une différence de potentiel électrique entre les deux compartiments (E_i/E_e). Celle-ci est appelée potentiel d'équilibre, pour les concentrations effectivement observées de l'ion considéré. Ainsi, toute polarisation de la membrane plasmique, quelle qu'en soit la cause, implique, s'il y a équilibre, une inégalité des concentrations intra- et extra-cellulaires de cet ion.

La répartition des principaux électrolytes est extrêmement inégale ; Na^+ et Cl^- sont principalement extra-cellulaires, tandis que le milieu intra-cellulaire renferme essentiellement K^+ comme cation ainsi que des anions organiques. L'équilibre électrochimique n'est atteint que si la membrane cellulaire est de type semi-perméable ; or la membrane ne l'est pour un ion donné que lorsque le canal correspondant est ouvert. Il faut donc qu'il y ait activation de ce canal pour que l'ion atteigne son équilibre électrochimique et impose à la membrane son potentiel d'équilibre. Les canaux ioniques

peuvent donc être comparés à des écluses, activables et désactivables par des événements physiologiques ou pharmacologiques.

Dans le cas de la fibre musculaire striée, la différence de potentiel est de l'ordre de -90 mV. L'équation de Nernst permet de calculer que cette différence de potentiel correspond à un rapport C_e/C_i de 31,6 dans le cas d'un ion monovalent négatif distribué passivement. Un tel rapport n'est observé que pour les chlorures.

La situation est différente pour le K^+ et le Na^+ : des transports actifs trans-membranaires accentuent l'inégalité de concentration de ces ions, qui sont ainsi écartés activement de leur potentiel d'équilibre.

6.2 Rôle électrophysiologique

L'ouverture du canal potassique entraîne un effet de pile entre les concentrations en K^+ intra-cellulaire et extra-cellulaire. Le potentiel de membrane devient plus négatif (hyperpolarisation membranaire) et tend à se stabiliser à des valeurs proches du potentiel d'équilibre du potassium noté E_K .

L'hyperpolarisation membranaire, en s'opposant à la dépolarisation spontanée et en inhibant partiellement la dépolarisation provoquée, empêche l'ouverture des canaux calciques de type VOC (voltage dépendants) et donc la pénétration de calcium dans le milieu intra-cellulaire. En revanche, l'effet de l'hyperpolarisation membranaire sur les canaux calciques et sodiques de type ROC (dépendant d'un récepteur) est incertain.

6.3 Localisation tissulaire

Tout comme les canaux calciques et sodiques, les canaux potassiques sont également présents sur les cellules non excitables. Les canaux potassiques qui sont les plus ubiquitaires semblent faire partie de presque toutes les cellules eucaryotes. Cependant la répartition topographique dans l'organisme des différents types de canaux n'est pas encore bien connue.

6.4 Classification

Contrairement au courant sodique, il existe plusieurs types de courant potassique dont les propriétés sont spécifiques. Différentes classes de canaux potassiques peuvent exister individuellement dans une même cellule et inversement, une même classe peut être décelée sur des cellules totalement différentes. Actuellement, près d'une quinzaine de canaux potassiques ont été mis en évidence (Chalon et coll 1992).

Des études électrophysiologiques récentes et l'utilisation de nouveaux agents pharmacologiques ont montré que les canaux potassiques étaient présents dans les cellules nerveuses, les cellules sécrétrices, les cellules musculaires lisses et squelettiques (Hamilton et Weston 1989, Cook 1988). Les canaux potassiques sont variés et peuvent être modulés par des variations de potentiel de membrane, de concentration ionique calcique ou par activation d'un récepteur (figure 6). De tous les types de canaux ioniques étudiés, les canaux potassiques forment le groupe le plus hétérogène (Rudy 1988). Les canaux potassiques sont, en général, classés selon leur mécanisme d'ouverture (Tableau VII). La conductance des canaux, déterminée par la technique du patch clamp, s'exprime en pico-siémens (pS) : un canal de conductance égale à 10 pS transporte un courant de 1pA lorsque le potentiel est porté à 100 mV au delà du potentiel membranaire.

6.4.1 Les canaux potassiques dépendants du voltage (I_K)

Ils s'ouvrent par des variations du potentiel membranaire (le plus souvent une dépolarisation) qui entraîne une repolarisation ou une hyperpolarisation cellulaire, en conséquence de quoi, ces canaux inhibent les processus excitatoires (Figure 7). Les canaux potassiques sensibles au voltage sont décrits dans la plupart des cellules avec des conductances et des temps d'ouverture différents (tableau VII). Ils sont intégrés à la membrane protéique et composés de différentes combinaisons de

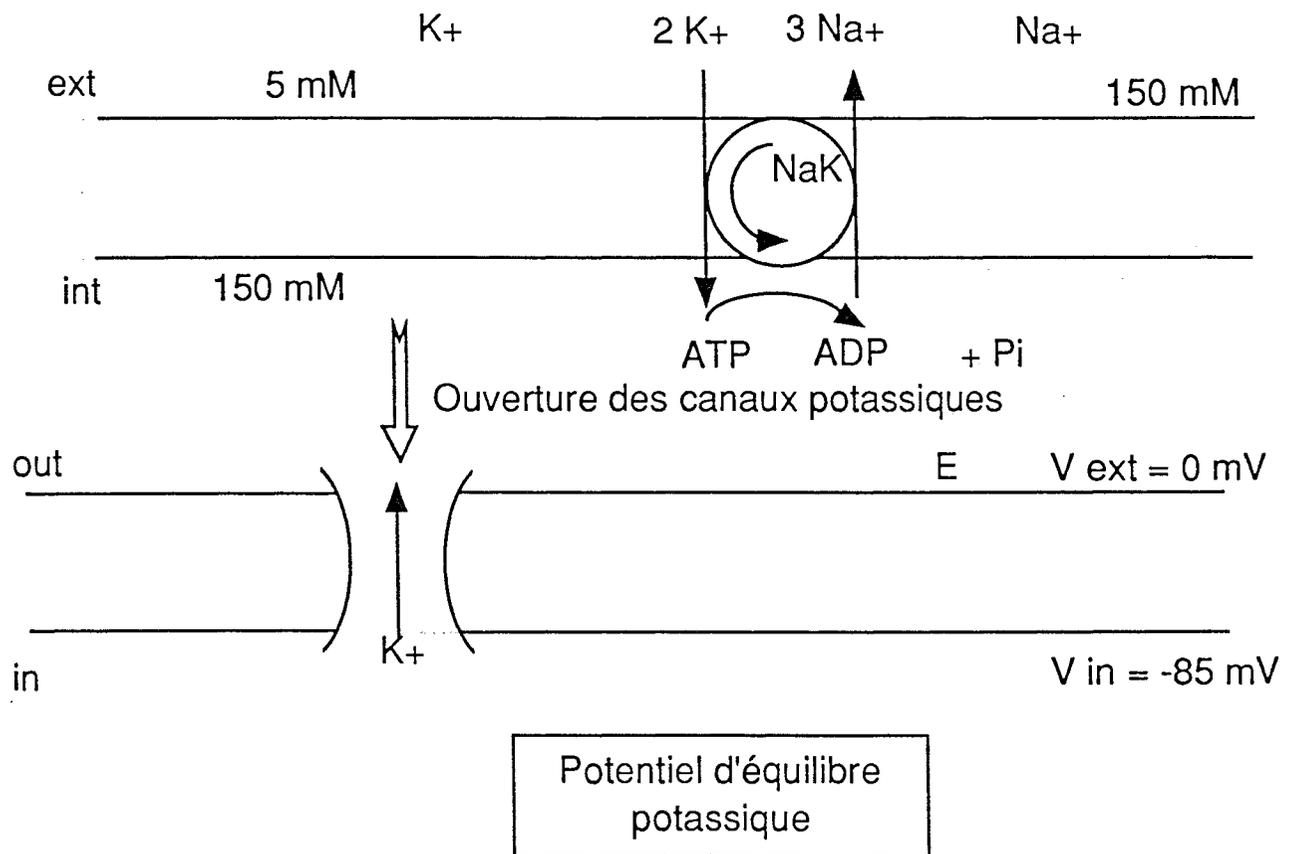


Figure 6 - Gradient ionique transmembranaire et effet de l'ouverture des canaux potassiques.

L'action de la pompe Na/K ATPase (qui fait sortir 3 Na⁺ et fait rentrer 2 K⁺ en consommant une molécule d'ATP) crée le gradient ionique indiqué. Dans ces conditions, l'ouverture des canaux potassiques membranaires entraîne une sortie de potassium. L'intérieur de la cellule devient plus négatif (hyperpolarisation). Le champ électrique résultant à travers la membrane (l'intérieur de la cellule étant à un potentiel beaucoup plus négatif que l'extérieur qui est arbitrairement à 0) s'oppose de plus en plus à la sortie de potassium jusqu'à ce que la force électrique compense la différence de concentration potassique. Le potentiel auquel le gradient électrochimique membranaire disparaît, s'appelle le potentiel d'équilibre potassique et se situe aux environs de -85 mV

Tableau VII : Caractéristiques des principaux canaux potassiques

Canal	Abréviation	Conductance (pS)	Fonction probable
Canal A	K _A	14-20	Régulation de la fréquence du potentiel d'action
Courant de rectification retardé	I _K	5-15	Repolarisation potentiel d'action
Courant de rectification interne	K _{IR}	10-15	- Fixation du potentiel de repos - Repolarisation potentiel d'action
Activé par Acétylcholine	I _{KACH}	10-25	- Régulation de la fréquence du potentiel d'action - Médiation tonus vagal au niveau du myocarde
ATP sensible	I _{KATP}	10-30	Rôle central dans le fonctionnement physiologique du pancréas : contrôle du potentiel membranaire de la cellule β et sécrétion d'insuline gluco-induite
Conductance élevée Ca sensible	I _{KCa}	100-250	- Mécanismes sécrétoires exocrines et endocrines - Repolarisation potentiel d'action des cellules nerveuses et musculaires - Rôle possible dans les mécanismes de sécrétion
Faible conductance Ca sensible	I _{KCa}	5-15	Rôle dans la phase d'hyperpolarisation qui fait suite à chaque potentiel d'action
Conductance intermédiaire	I _{KCa}	18-50	- Régulation du volume cellulaire (GR, lymphocytes) - Activité électrique de certains neurones de mollusques

D'après : Rudy B, *Neuroscience*, 1988 - Edwards G, *Handbook of experimental Pharmacology*, 1994 - Ashcroft FM, *Biochem Soc Trans*, 1990 - Adelman JP, *Neuron*, 1992

leurs deux sous-unités α et β , avec pour résultat des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques distinctes. La sous-unité α contient des domaines pour un pore canalaire, un capteur de voltage, une porte d'activation et un domaine d'inactivation. 4 sous-unités α peuvent former un canal fonctionnel (Olaf Pongs, Institut für Neurale Signalverarbeitung, Hambourg, Allemagne). Les sous-unités β peuvent être des protéines membranaires périphériques qui se lient au domaine cytoplasmique des sous-unités avec formation de canaux qui ont des propriétés distinctes.

6.4.2 Canaux potassiques activés par le calcium ($I_K(\text{Ca})$) : canaux maxi- K^+

Ils sont séparés en trois sous-classes selon la valeur de leur conductance mais aussi selon leur mode de régulation. La mise en jeu de ces canaux semble directement contrôlée par le contact avec le Ca^{2+} intra-cellulaire (Ca^{2+}_i) car l'activation qui s'ensuit est rapide. Mais plusieurs observations laissent présager un contrôle indirect par un second messenger : les $I_K(\text{Ca})$ de conductance élevée de certaines cellules sont activés par des substances qui élèvent la concentration intra-cellulaire d'AMPc. D'autres observations révèlent que certains $I_K(\text{Ca})$ peuvent être inhibés par l'AMPc. Reste à savoir si l'AMPc agit directement sur les canaux ou par régulation de la concentration en Ca^{2+}_i .

Schématiquement, on peut leur attribuer deux grands rôles physiologiques : dans les cellules excitables, ils participent à la régulation de l'excitabilité membranaire et de la sensibilité aux neurotransmetteurs, alors que dans les cellules non excitables, ils régulent les transferts ioniques trans-membranaires.

6.4.3 Canaux potassiques dépendants d'un récepteur

L'activation de certains récepteurs de surface comme les récepteurs muscariniques et les récepteurs à l'adénosine peuvent ouvrir ces canaux. Certains récepteurs pourraient

être directement liés aux canaux potassiques tandis que d'autres pourraient dépendre de la protéine G intermédiaire (Hamilton 1989).

6.4.4 Canaux potassiques dépendants de l'ATP (I_K (ATP))

Une famille intéressante et hétérogène (indépendant du voltage) de canaux potassiques sont fermés par l'ATP intra-cellulaire. L'inhibition par l'ATP est modulée par d'autres nucléotides comme le MgADP. Ainsi, le canal potassique dépendant de l'ATP couple l'excitabilité cellulaire au stade métabolique de la cellule. En général, ces canaux sont sensibles au blocage par les sulfamides comme le glibenclamide (Quast et Cook 1992).

6.5 Les canaux potassiques de la fibre musculaire lisse

Plusieurs types de canaux potassiques sont présents dans la membrane plasmique des cellules musculaires lisses des voies aériennes.

• Canaux potassiques dépendants d'un potentiel

La dépolarisation membranaire active un courant potassique sortant retardé ("delayed rectifier") qui tend à hyperpolariser la membrane ou du moins à limiter la dépolarisation. Ce courant de rectification sortant retardé est potentiel-dépendant (Marthan et coll 1989a). L'injection d'un courant dépolarisant dans les cellules musculaires lisses n'entraîne qu'une dépolarisation très limitée insuffisante pour déclencher un potentiel d'action (Kannan et coll 1983) du fait de la mise en jeu du courant de rectification.

• Canaux potassiques dépendants du calcium

Ils sont activés par l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire notamment liée au relargage du calcium des compartiments intracellulaires au cours de l'interaction agoniste-récepteur (Marthan et coll 1989a) (Kotlikoff 1990).

• Canaux potassiques activés par l'ATP

Les "ouvreurs" de ces canaux (lemakalim) relaxent le muscle lisse bronchique humain (Black et coll 1990b).

Le muscle lisse des voies aériennes semble être différent par certains aspects du muscle lisse des autres organes. Il a un bas niveau d'excitabilité électrique et n'a pas de potentiel d'action spontané. En revanche, il existe une activité en vagues lentes qui pourrait représenter les potentiels d'action atténués par l'ouverture des canaux K^+ et l'augmentation résultante de la conductance du K^+ . Ceci semble être le cas pour les cellules du muscle lisse des voies aériennes humaines car les potentiels d'action sont générés seulement lorsque l'activité du canal K^+ est réduite (Marthan et coll 1989a). Cela signifie que le muscle lisse des voies aériennes est fortement redressé (c'est-à-dire plus résistant aux effets d'un courant dépolarisant qu'hyperpolarisant) et que ce redressement existe sous l'effet de l'activation des canaux potassiques. Si la cellule du muscle lisse des voies aériennes venait à perdre cette faculté "de redressement", une hyperréactivité bronchique pourrait alors apparaître. Il est probable que la présence permanente de médiateurs inflammatoires ayant une action excitatoire "*in vivo*" puisse induire une telle condition. Il y a une certaine évidence à suggérer que les cellules musculaires lisses des voies aériennes dans l'asthme sont plus excitables (Akasaka et coll 1975) et que les propriétés contractiles des cellules musculaires lisses des voies aériennes chez l'animal (Souhrada et Souhrada 1981) et chez l'homme (Black et coll 1990c) soient altérées après sensibilisation. Cela peut être lié aux modifications du flux ionique à travers les canaux de la membrane du muscle lisse.

6.6 Modulation des canaux potassiques de la fibre musculaire lisse : principes généraux

Dans la fibre musculaire lisse, comme dans d'autres cellules excitables, la concentration intra-cellulaire de potassium est approximativement de 150 μM , ce qui

contraste avec la concentration extra-cellulaire de 3,5 μM (Hirst et Edwards 1989). Il existe une perméabilité plasmique du potassium relativement importante, comparée à celle d'autres ions. Ce facteur, couplé à l'activité de la pompe Na/K ATPase et à la synthèse intra-cellulaire d'ions non diffusible donne lieu à un potentiel membranaire de -50 à -60 mV (Hirst et Edwards 1989). Le potentiel (E_k) d'équilibre (figure 7) pour le potassium est approximativement de -90 mV, alors que celui pour d'autres ions est plus positif (Hirst et Edwards 1989). Ainsi, le blocage ou l'inhibition des canaux potassiques dévie le potentiel membranaire vers une dépolarisation, alors que l'ouverture des canaux potassiques résulte en une hyperpolarisation membranaire. Dans la fibre musculaire lisse, la dépolarisation associée à l'inhibition du canal potassique résulte indirectement en l'activation des canaux calciques de type L qui est dépendante de la dépolarisation. Réciproquement, l'ouverture du canal potassique produit une relaxation via la fermeture indirecte des canaux calciques dont l'ouverture est diminuée au cours d'une hyperpolarisation (tableau VIII). Il apparaît ainsi que les activateurs potassiques se comportent comme des bloqueurs des canaux calciques (figure 7)

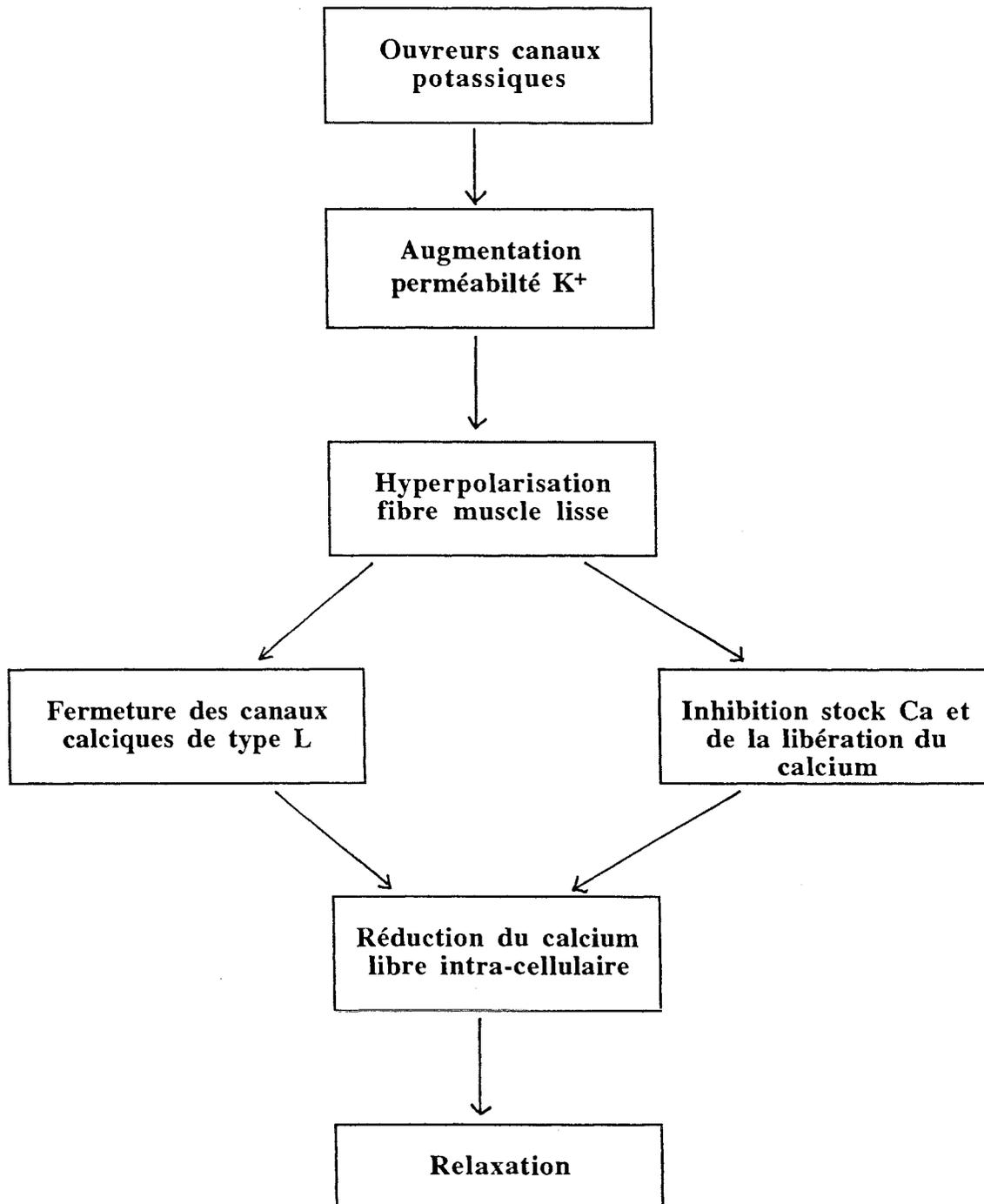
6.7 Régulation des canaux potassiques

La modulation de l'ouverture des canaux potassiques peut résulter de plusieurs signaux cellulaires (comme la protéine de liaison GTP ou la protéine Kinase C) mais dans la plupart des cas, le canal est activé par tout processus qui augmente la concentration intra-cellulaire du calcium (figure 8).

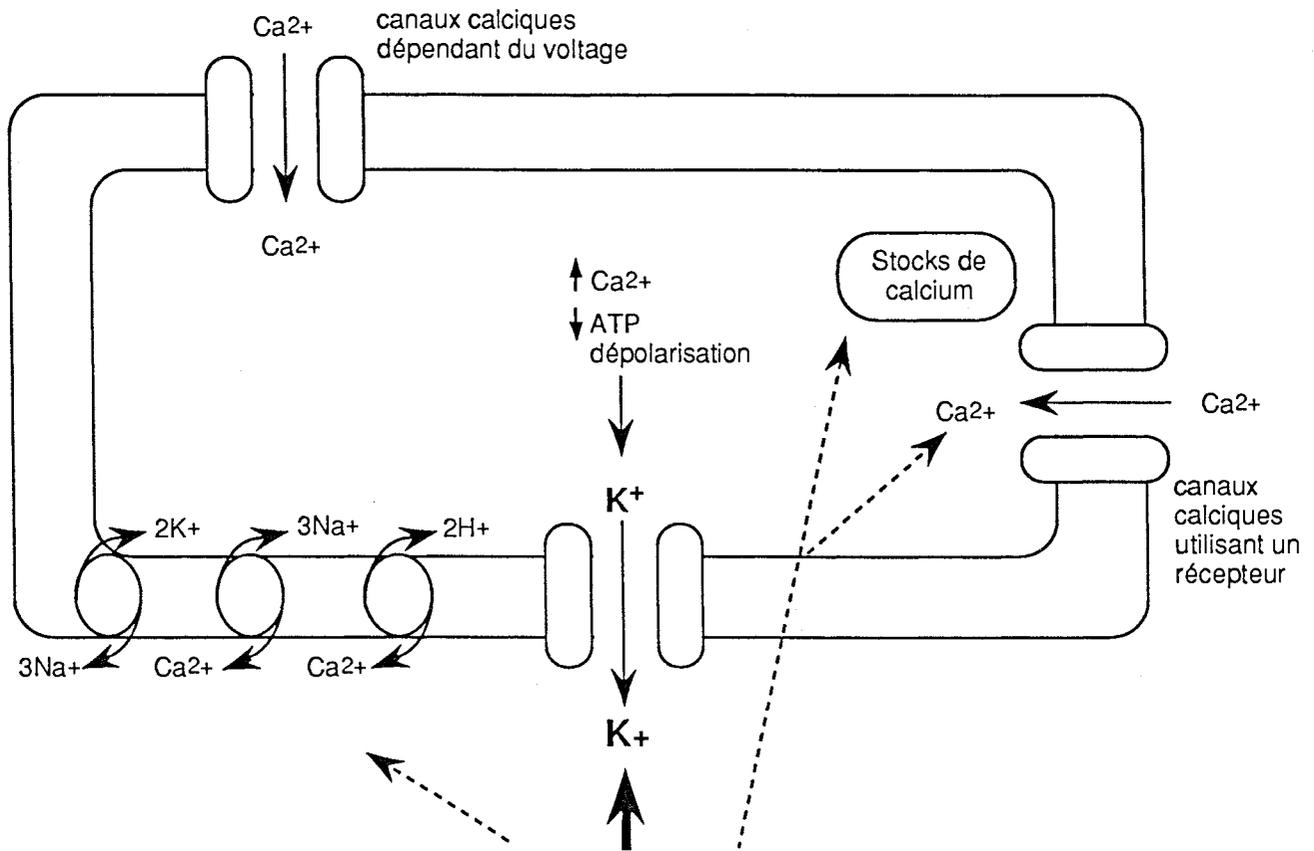
Tableau VIII

**Principes généraux qui sous-tendent la pharmacologie
des "ouvreurs" potassiques**

Ces molécules produisent une hyperpolarisation membranaire et réduisent indirectement la probabilité d'ouverture des canaux calciques de type L. Ceci, couplé aux effets inhibiteurs de stockage et de libération du calcium, génère une réduction du calcium libre intra-cellulaire et une relaxation puissante des tissus comme le muscle lisse. Ce processus est effectivement reversé ou prévenu par les inhibiteurs des canaux potassiques.



(D'après G. Edwards et A.H. Weston, *Cardiovascular drugs and therapy*, 1985)

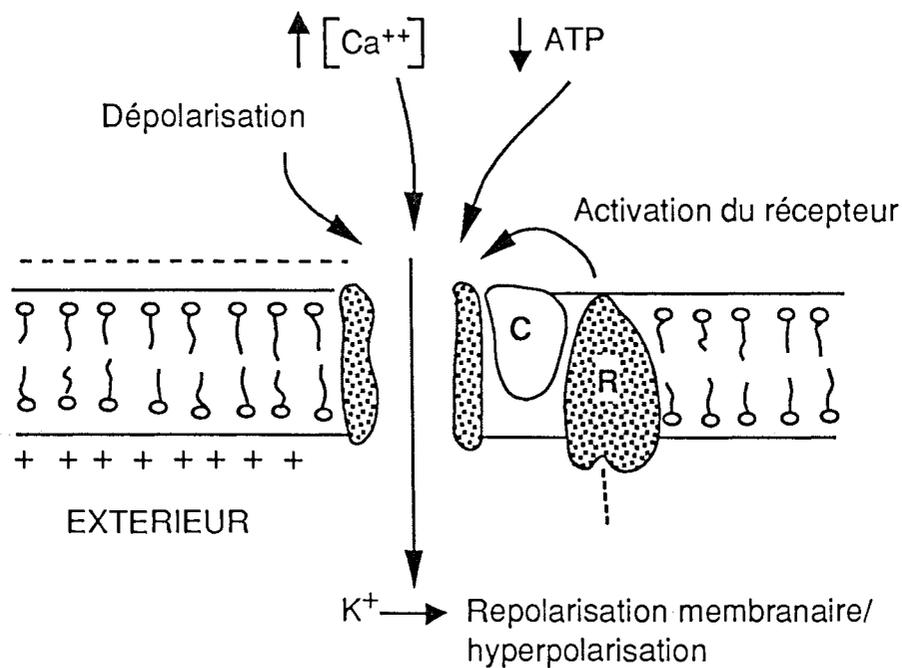


Activateurs des canaux K⁺

Fig. 7 - Représentation schématique d'une cellule musculaire lisse des voies aériennes et mode d'action des activateurs potassiques (d'après BLACK et BARNES, 1990).

La concentration intracellulaire des ions calcium augmente sous l'effet de l'influx de Ca²⁺ provenant de l'espace extracellulaire par les canaux calciques dépendant du voltage ou opérant par l'intermédiaire d'un récepteur, ou provenant des stocks intracellulaires. L'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium, la réduction de l'ATP ou la dépolarisation de la cellule stimule l'efflux d'ions potassium par les canaux potassiques, ce qui entraîne une hyperpolarisation et une relaxation du muscle lisse.

Les activateurs potassiques ouvrent les canaux potassiques et pourraient avoir des actions supplémentaires sur les stocks de calcium intracellulaire, sur les canaux calciques opérant avec un récepteur et les pompes ioniques qui retirent le calcium de la cellule (flèches pointillées).



Activateurs

Cromakalim
 RP 49356
 Pinacidil
 Nicorandil
 Diazoxide

Bloqueurs

Tetraethylammonium
 4-Aminopyridine
 Apamine
 Charybdotoxine
 Leiurotoxin
 Glibenclamide

Fig. 8 - Diversité des canaux potassiques.

Il existe quatre types de canaux potassiques : les canaux K^+ sensibles au voltage qui s'ouvrent en cas de dépolarisation cellulaire ; les canaux K^+ activés par le calcium sensibles à l'augmentation du calcium intracellulaire ; les canaux K^+ opérant par l'intermédiaire d'un récepteur ; et les canaux K^+ contrôlés par l'ATP, sensibles à la diminution de l'ATP intracellulaire.

PHARMACOLOGIE

DES ACTIVATEURS

POTASSIQUES

7 Pharmacologie des activateurs potassiques

Le développement de ces "ouvreurs" des canaux potassiques commença au début des années 1970, mais leur mode d'action fut élucidé plusieurs années plus tard (Bray et coll 1987). La terminologie "ouvreur de canaux potassiques" a été adoptée la première fois en 1985 afin de décrire l'action relaxante de la cromakalim sur la fibre musculaire lisse (Hamilton et coll 1985, 1986). Le terme "ouvreur" avait été délibérément adopté car le mécanisme précis par lequel le cromakalim ouvrait les canaux potassiques était alors (et est toujours) inconnu. D'un point de vue historique, le cromakalim ne fut pas le premier décrit. Avant 1985, les effets du nicorandil (connu comme le SG-75) sur le muscle cardiaque furent énumérés avec la conclusion que cet agent augmentait la conductance potassique des membranes du muscle cardiaque (Furukawa et coll 1981). Plus tard, l'activation de la guanylate cyclase par le nicorandil fut décrite et au moins en Europe, l'accent fut mis sur cette propriété afin d'expliquer les effets vasodilatateurs de cette molécule (Holzmann, 1983). Depuis le nombre de molécules de synthèse s'est considérablement développé. Ces agents peuvent être divisés en 3 groupes

- **les ouvreurs des canaux potassiques sensibles à l'ATP**
- **les molécules hybrides**
- **les ouvreurs des canaux potassiques activés par le calcium à large conductance**

7.1 Les ouvreurs des canaux potassiques sensibles à l'ATP

Ces agents constituent le plus grand nombre d'ouvreurs de canaux potassiques. Ils peuvent être distingués d'autres types de molécules parce que leurs effets sont inhibés par le glibenclamide mais ne sont pas affectés par la charybdotoxine ou par les inhibiteurs

de l'enzyme guanylate cyclase. Ils ont été subdivisés en fonction de leurs structures chimiques.

7.1.1 Les benzopyranes

Le prototype est le cromakalim dont le mécanisme fut élucidé en 1986 (Hamilton et coll 1986). Le développement du cromakalim dans l'hypertension et dans l'asthme a été suspendu en faveur de son énantiomère actif le levromakalim

7.1.2 Les cyanoguanidines

La molécule prototype est la forme racémique du pinacidil et les dérivés voisins comme le P1060 (Ibbotson et coll 1993) et le très puissant P1075 (Bray et coll 1992) ont été l'objet de publications récentes.

7.1.3 Les thioformamides

La majeure partie de ces agents possèdent un carbone chiral et un atome de soufre chiral, entraînant une stéréochimie complexe. Le prototype de ce groupe est l'aprikalim (RP 52891), l'énantiomère le plus actif de la forme racémique RP 49356.

7.1.4 Les pyrimidines

Le prototype de ce groupe est le sulfate de minoxidil. Plus récemment, les propriétés d'ouverture de ce canal potassique d'un autre dérivé des pyrimidines, le LP 805 ont été décrites (Kishii et coll 1992).

7.1.5 Les benzothiadiazines

La molécule la plus étudiée de ce groupe est le diazoxide bien que plusieurs nouveaux dérivés de cette molécule aient été récemment décrits. L'activité hyperglycémiant du diazoxide est due à sa faculté d'ouverture des canaux potassiques des cellules β du pancréas (Zunkler et coll 1988) et ses effets vasodilatateurs sont également associés à cette propriété.

7.2 Les molécules hybrides : combinaison d'ouvreurs dépendants de l'ATP et d'activateurs de la guanylate cyclase

Les japonais ont attiré l'attention sur les propriétés d'ouverture des canaux potassiques par le nicorandil dans le muscle lisse (Furukawa et coll 1981) tandis que les études européennes associaient l'action vasorelaxante du nicorandil à la stimulation de la guanylate cyclase soluble (Holzmann 1983). Le nicorandil induit un courant potassique dépendant de l'ATP dans les myocytes ventriculaires (Hiraoka et Fan 1989). L'action combinée d'ouverture du canal potassique et d'activation de la guanylate cyclase fait que le profil pharmacologique du nicorandil est intéressant (Taira 1989). Une molécule apparentée, le KRN2391, avec des propriétés hybrides similaires et des caractéristiques structurales présentes dans les cyanoguanidines a été décrite récemment (Yanagisawa et Okada 1993).

Les effets de ces ouvreurs de canaux potassiques hybrides sont partiellement antagonisés par le glibenclamide et par les inhibiteurs de la guanylate cyclase.

7.3 Les ouvreurs des canaux potassiques à large conductance activés par le calcium

Ces ouvreurs des canaux potassiques constituent un nouveau développement potentiellement intéressant qui actuellement se situe à un niveau préliminaire. Le SCA 40

(Laurent et coll 1993) et une série de benzimidazoles (Olesen et coll 1993) exercent des actions compatibles avec l'ouverture de ces canaux potassiques.

Seuls seront détaillés dans ce chapitre les agonistes potassiques utilisés lors de l'étude.

7.4 Le nicorandil

Le nicorandil, vasodilatateur coronarien, fut le premier médicament découvert, qui en hyperpolarisant le muscle lisse augmentait la perméabilité de la membrane cellulaire pour le potassium, probablement en ouvrant des canaux potassiques (Furukawa et coll 1981).

Il fut également démontré que la structure du groupe nitrate permettait au nicorandil d'activer la guanylate cyclase et d'augmenter ainsi la concentration du GMPc dans la cellule musculaire lisse avec pour conséquence une relaxation (Holzmann 1983). C'est Frydman (Frydman et coll 1989) en 1989, qui décrit la pharmacocinétique du nicorandil chez l'homme. Après une administration orale (de 5 à 40 mg, doses habituellement utilisées en clinique) rapidement absorbée, le pic plasmatique survient entre 30 minutes et une heure après la prise. La biodisponibilité est de 75 ± 23 %. La concentration maximale et l'aire sous la courbe sont une fonction linéaire de la dose (5-40 mg). Le volume apparent de distribution est de 1,4 l/kg et la liaison aux protéines plasmatiques est faible (< 25 % forme liée). La concentration plasmatique décroît en fonction de deux processus différents : il existe une phase d'élimination rapide avec une demi-vie apparente d'une heure (concernant 96 % de la quantité plasmatique) et 8 à 24 heures après administration (20 mg), la moyenne reste constante à un niveau bas. La signification de ce phénomène est inconnue. La voie principale de la biotransformation semble être une dénitratisation. Dans les urines, de faibles quantités de nicorandil inchangées (< 1 %) et de métabolites dénitratés (< 4 %) sont retrouvés.

7.5 Le cromakalim

Le cromakalim possède 2 atomes de carbone chiraux avec deux substituants de ces deux atomes dans la configuration trans. Le cromakalim est le nom générique du mélange racémique des deux énantiomères (trans). Les propriétés vasodilatatrices de ces médicaments font partie de l'isomère trans (-) (BRL38227, lemakalim ou levcromakalim) qui est à l'heure actuelle en développement. L'information disponible concernant la pharmacocinétique du cromakalim est rare. Après une administration orale à des volontaires sains, le cromakalim est absorbée avec un pic plasmatique survenant 2 à 6 heures après administration. La demi-vie plasmatique est de 22,5 heures, la clearance orale de 3,42 l/heure et le volume de distribution de 111 litres.

7.6 Le levcromakalim

Le levcromakalim (BRL 38227) est l'énantiomère (-) du cromakalim. Il relaxe les artérioles mésentériques du rat en ouvrant le canal potassique de faible conductance, sensible à la glibenclamide (Criddle et coll 1994). Sur le coeur isolé de cobaye, le levcromakalim s'accumule modérément et augmente le débit coronaire avec un certain effet inotrope négatif (Mellemkjaer et Nielsen-Kudsk 1993). Sur le muscle lisse des voies aériennes le BRL 38227 entraîne une relaxation des bronches humaines (Black et coll 1990b) et atténue la bronchoconstriction hypocapnique chez le chien (Lindemann et Freed 1993). Le levcromakalim est plus efficace comme relaxant que antispasmodique ; l'activité relaxante est plus prononcée sur les vaisseaux pulmonaires précontractés par le K^+ que sur les voies aériennes (Dumas et coll 1993)

7.7 le diazoxide

Le diazoxide est un antihypertenseur dont l'administration chronique est marquée par une hyperglycémie, un effet dû à une diminution de sécrétion d'insuline via

l'ouverture des canaux potassiques dépendants de l'ATP du pancréas (Zünkler et coll 1988). Sur l'aorte de lapin, le diazoxide inhibe la réponse vasoconstrictrice à l'angiotensine II, à la noradrénaline et au chlorure de potassium à faibles concentrations. Mais *in vivo* le diazoxide est environ 100 fois moins puissant que le cromakalim pour l'effet hypotenseur chez le rat. Le glibenclamide, puissant bloqueur des canaux potassiques dépendants de l'ATP, inhibe la stimulation de l'efflux de $^{86}\text{Rb}^+$ de la veine porte et de l'aorte par le diazoxide *in vivo* et inverse les variations de la glycémie et les niveaux d'insuline (Quast et Cook 1989).

7.8 Action sur le poumon

Les canaux potassiques dépendants du voltage sont présents dans la membrane cellulaire du muscle lisse. Quand ils s'ouvrent (le potentiel membranaire basal chutant en réaction à un stimulus excitatoire), ces canaux exercent un puissant effet de rectification (Cook 1988). Il a été établi que la perte de ce courant de rectification (par un blocage ou une dysfonction des canaux potassiques) contribue à l'hyperréactivité dans l'asthme (Allen et coll 1986). A l'opposé, la majoration de ce mécanisme par des médicaments ouvreurs des canaux potassiques peut déterminer une efficacité clinique. Alors que les activateurs des canaux potassiques sont de modestes relaxants de la fibre musculaire lisse isolée des voies aériennes, (Chapman et coll 1992), de faibles posologies (0,5 mg per os) de cromakalim chez l'homme, apportent une protection significative vis à vis de l'obstruction des voies aériennes dans l'asthme nocturne (Owen et coll 1989), phénomène associé à une augmentation de la réactivité des voies aériennes. Des posologies plus importantes sont nécessaires afin d'inhiber la bronchoconstriction induite à l'histamine chez l'homme (Baird et coll 1988), et suggère que l'obstruction des voies aériennes peut être altérée par des mécanismes autres que celui patent de relaxation de la fibre musculaire lisse.

Enfin, il a été démontré récemment (Ichinose 1990) chez le cobaye, que le cromakalim était efficace vis à vis de la bronchoconstriction médiée par le NANCe,

pouvant présager une action vis à vis de l'inflammation neurogénique des voies aériennes. Une information plus ample sur l'effet anti-inflammatoire des voies aériennes est maintenant requise.

7.9 Autres effets

Des investigations *in vitro* et *in vivo* ont montré que certains activateurs des canaux potassiques (benzopyranes, thioformamides, le nicorandil et, à un moindre degré, le pinacidil) sont capables de protéger le myocarde vis à vis de la conséquence d'une ischémie transitoire (Gross et coll 1989, Grover et coll 1991). Quand ils sont donnés avant et pendant l'ischémie, ils favorisent la récupération de la fonction contractile, réduisent la taille de l'infarctus (Escande et Caverio, 1992) et atténuent le processus inflammatoire dans la zone d'ischémie (Pieper et Gross 1992). Les activateurs des canaux potassiques sont également utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle (Friedel et Brogden, 1990), de l'hyperréactivité vésicale (Andersson et coll 1988), de la maladie artérielle occlusive (Angersbach et Nicholson 1988) et potentiellement du vasospasme cérébral (Wilkins 1986) ainsi que dans la prophylaxie de l'épilepsie (Gandolfo et coll 1989a, 1989b).

MÉTHODOLOGIE

8 Méthodologie

8.1 Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée selon les directives du conseil canadien de protection des animaux. Le modèle animal utilisé est le lapin mâle de race néo-zélandaise de poids moyen ($2,5 \text{ kg} \pm 0,05 \text{ ESM}$). L'étude a été menée chez 72 lapins randomisés en douze groupes de six avec :

- 1) des inhibiteurs calciques,
- 2) des activateurs potassiques,
- 3) un groupe témoin.

8.1.1 Inhibiteurs calciques

- un groupe reçoit $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ de vérapamil
- un groupe reçoit $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de vérapamil
- un groupe reçoit 1 mg.kg^{-1} de RO 40-5967
- un groupe reçoit $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de RO 40-5967
- un groupe reçoit $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ de nifédipine
- un groupe reçoit $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ de nicardipine
- un groupe reçoit $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ de nimodipine

8.1.2 Activateurs potassiques

- un groupe reçoit 2 mg.kg^{-1} de nicorandil
- un groupe reçoit $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de cromakalim
- un groupe reçoit $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de levromakalim
- un groupe reçoit 30 mg.kg^{-1} de diazoxide

8.1.3 Groupe témoin

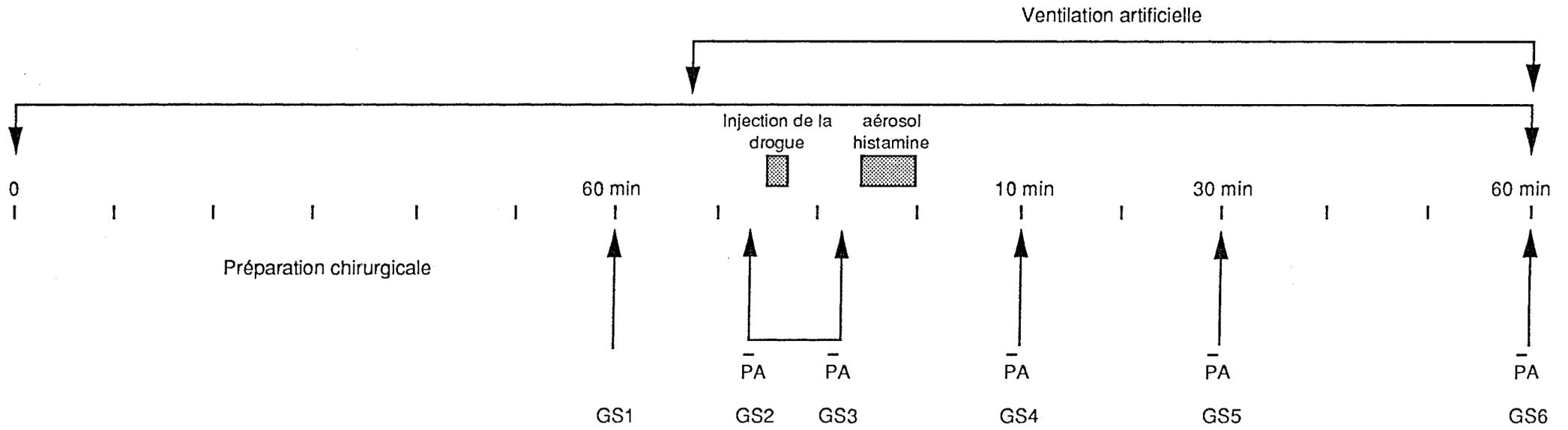
- ce groupe reçoit 2 ml de sérum salé

8.2 Protocole général d'expérience (figure 9)

Avec ce modèle in vivo, il n'est pas possible d'utiliser plusieurs doses de médicament chez le même lapin. Après un premier challenge avec l'aérosol d'histamine une deuxième épreuve est quasiment sans effet. Ainsi, un nouvel animal doit être utilisé pour une autre dose. Compte tenu des variations interindividuelles de la réactivité bronchique à l'histamine chez lapin, nous n'avons pas pu dresser de courbes dose-réponse, trop longues à obtenir, sauf avec le vérapamil et le RO 40-5967. En fait dans tous les autres cas, avant les expériences définitives aux doses indiquées, nous avons utilisé des doses progressives intra-veineuses jusqu'à une diminution de la pression artérielle moyenne d'environ 50 % (en fait 60 %). C'est la limitation technique pour l'utilisation intra-veineuse de ces drogues hypotensives chez un animal vivant. Au delà, on atteint des doses léthales. Ainsi, avec le vérapamil 0,5 mg.kg⁻¹ IV, 50 % des animaux sont morts d'hypotension, et nous avons pris pour comparaison la dose non léthale de 0,3 mg.kg⁻¹. En conséquence, les doses utilisées par voie intra-veineuse dans ce travail doivent être considérées comme les doses maximales possibles.

Toutes les injections sont réalisées par voie intra-veineuse 5 minutes avant l'aérosol d'histamine. Un dernier groupe de 6 lapins reçoit 2 ml de sérum salé sans aérosol d'histamine. Ce groupe a été réalisé pour l'étude des différents paramètres au cours de la ventilation mécanique.

L'animal est placé dans une boîte à contention (IFFA CREDO®) et l'étude débute par la pose d'un cathéter (Surflo aiguille 22 G x 1 TERUMO®) dans la veine auriculaire par lequel une sédation par thiopental (15 mg.kg⁻¹) environ est effectuée en injection intra-veineuse lente. Des réinjections séquentielles sont réalisées en fonction des besoins. Dès l'obtention d'une narcose mais avec persistance d'une ventilation spontanée efficace,



GS : Gaz du sang
 $\bar{P}A$: Pression aortique moyenne

Fig. 9 - Monitoring de l'expérience

le lapin est placé en décubitus dorsal, les quatre membres fixés en extension sur une planche de contention. La tête fixée en hyperextension permet le dégagement de la région cervicale antérieure. On réalise un abord cutané au niveau du cou avec dissection des différents plans musculaires afin de procéder à une dénudation de la trachée qui est alors canulée. On procède ensuite à la pose d'un cathéter artériel pour les prélèvements gazométriques et la mesure de la pression artérielle. La technique de mise en place du cathéter par voie carotidienne est celle décrite par Perlman et Freedman en 1971 (). La carotide interne droite est individualisée, liée, une ponction de la partie sous jacente à la ligature est alors réalisée et un cathéter en polyéthylène PE 60 Clay Adams, Parsippany NJ USA) est introduit dans la carotide. La progression du cathéter est en général aisée, la perception de battements systoliques au niveau de l'extrémité libre confirme la mise en place correcte de ce dernier (à 5 cm de la zone d'introduction du cathéter) qui est alors fixé au niveau inférieur de la portion vasculaire. Ce cathéter sera héparinisé (solution à 50 UI par ml dans du sérum physiologique) après chacun d'eux et permet les prélèvements de gaz du sang (ABL 30, Radiometer® Copenhague, Danemark). Il autorise en outre une prise de la pression artérielle moyenne (mm Hg) et de la fréquence cardiaque ($\text{b}\cdot\text{min}^{-1}$) qui sont mesurées par une jauge de contrainte (Bell and Howell type 4-327, Pasadena CA, USA) avec amplificateur et enregistreur (Gould, Cleveland OH, USA). On aborde ensuite la veine jugulaire interne gauche qui est également isolée sur deux fils. L'extrémité supérieure est ligaturée et on introduit un cathéter en polyéthylène qui permet l'entretien de l'anesthésie et l'injection des médicaments à tester. L'extrémité inférieure de la portion vasculaire individualisée est également ligaturée lorsque le cathéter est en place. La température est monitorée de façon permanente par voie rectale (YSI tele-thermometer Yellow Springs, Ohio, USA). Une fois le lapin conditionné, un prélèvement sanguin artériel est réalisé (GS1). L'animal est curarisé (Bromure de Vécuronium : Norcuron®) à la dose de 0,8 mg et ventilé. Le respirateur utilisé pour la ventilation artificielle (Harvard Apparatus, Southnatick MA, USA) impose un volume courant de 25 ml à une fréquence de $50 \text{ cycles}\cdot\text{min}^{-1}$. La bonne standardisation du poids des lapins a permis de conserver ce réglage pour tous les animaux. Un second prélèvement sanguin est réalisé 5 minutes

après le début de la ventilation artificielle. Après contrôle des paramètres de mécanique ventilatoire, l'activateur potassique ou l'inhibiteur calcique ou la solution saline sont injectés pendant 2 minutes avec un monitoring constant de la pression artérielle. Cinq minutes plus tard, un prélèvement artériel est réalisé. La bronchoconstriction est ensuite induite par l'inhalation d'un aérosol d'histamine pendant une période de 5 minutes. L'orifice d'entrée du ventilateur est connecté à un nébuliseur (Intersurgical, 1493-000 Gould RD, Twickenham, Middlesex, Royaume-Uni) qui contient une solution d'histamine. Le système est actionné par un compresseur qui délivre l'aérosol d'histamine en 5 minutes (Dewachter, 1992).

8.3 Aérosol d'histamine

La quantité de solution d'histamine nébulisée est de $0,26 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, le diamètre moyen des particules émises est de $3,5 \mu\text{m}$ (nébuliseur : Intersurgical, 1493-000 Gould RD, Twickenham, Middlesex, Royaume-Uni). Comme il s'agit d'une solution à 2 %, chaque ml contient $20 \mu\text{g}$ d'histamine et $0,26 \text{ ml}$ contient $5,2 \mu\text{g}$ d'histamine. Le compresseur (Customer Thomas industries® Sheboygan Wis, USA) qui utilise l'atmosphère de la pièce débite $29,5 \text{ litres}\cdot\text{min}^{-1}$ et par conséquent l'aérosol émis contient $176 \mu\text{g}$ d'histamine par litre. Cet aérosol est amené au niveau de la partie aspiration du ventilateur. Enfin, la ventilation artificielle étant constante et le volume/minute délivré de $1,3 \text{ l}/\text{min}$, chaque animal reçoit $228 \mu\text{g}$ d'histamine par minute soit $1140 \mu\text{g}$ d'histamine pendant les 5 minutes de la nébulisation mais environ $1000 \mu\text{g}$ compte tenu de la déposition sur les parois. Les gaz du sang, la pression artérielle moyenne et la fréquence cardiaque sont mesurés 10, 30 et 60 minutes après la fin de l'aérosol d'histamine. Il est peu vraisemblable que l'histamine ait une action vasculaire dans les conditions de l'expérience, par exemple après injection d'un inhibiteur calcique ou d'un activateur potassique entraînant une forte chute de la pression artérielle.

8.4 Entretien de la relaxation et de l'anesthésie

L'entretien de la relaxation étant indispensable aux mesures de mécanique ventilatoire, une seringue électrique de bromure de Vécuronium est branchée immédiatement après le bolus de 0,8 mg au débit de 0,4 mg/h dès la mise en route de la ventilation. Des injections de thiopental sont réalisées de façon ponctuelle pour l'entretien de la narcose.

8.5 Paramètres mesurés

8.5.1 Gaz du sang

La mesure des gaz du sang s'effectue avec un appareil automatique (ABL 30 Radiometer® Copenhague) qui donne le pH, la pression artérielle de CO₂ (PaCO₂) et d'oxygène (PaO₂).

8.5.2 Résistances pulmonaires totales et élastance pulmonaire totale

Avant de placer l'animal sous respirateur, trois étalonnages successifs des résistances et de l'élastance pulmonaires totales sont effectués à l'aide d'un analogue. L'animal est placé sous ventilateur puis curarisé. Les mesures des résistances et de l'élastance pulmonaires sont effectuées par régression linéaire multiple à partir des mesures de pression d'insufflation et de débit (Uhl et Lewis 1974, Bates et coll 1989, Romero et Ludwig 1991). La canule de trachéotomie du lapin est connectée à un tube de 6 cm de long, d'un diamètre interne de 0,7 cm comportant une prise de pression près de la canule (pression trachéale : Ptr) avec un capteur (Honeywell type 176 PC ± 35 cm H₂O, Microswitch, Freeport Il, USA) en série avec un pneumotachographe Fleisch n° 00 (Metabo, Epalinges, Suisse) mesurant le débit trachéal (V'tr). La pression différentielle

du pneumotachographe est mesurée par un capteur différentiel (Celesco® modèle LVCR ± 2 cm H₂O). Le tout est relié à la sortie du ventilateur Harvard®. L'espace mort ajouté est de 7 ml (dont 4,8 ml pour le pneumotachographe) entre la trachée et le tube en Y du ventilateur. Les signaux sont amplifiés, filtrés par des filtres passe-bas ayant une fréquence de coupure à 32 Hz, digitalisés par un convertisseur analogique/digital 12 bits (Digimétrie 12 B 25 M, Perpignan, France) échantillonnés à 20 Hz et traités numériquement par un micro-ordinateur (PC type 386, Dell Austin TX, USA). Les données obtenues pendant une respiration régulière à la fréquence de 50 cycles par minute avec un volume courant de 25 ml sont échantillonnées pendant dix secondes. Le volume (V) est calculé par intégration digitale du débit trachéal (V'). A partir des signaux de V', V et Ptr, les résistances (Rrs) et l'élastance (Ers) thoraco-pulmonaires sont calculées par régression linéaire multiple selon l'équation :

$$P_{tr} = E_{rs} \cdot V + R_{rs} V' + K$$

ou K est une constante reflétant une pression expiratoire positive (PEEP) éventuelle. Les valeurs de Rrs et Ers sont acceptées si les cycles remplissent certaines conditions et si l'accord avec le modèle est bon (écart inférieur à 8 %). Les résultats sont donnés tous les 60 secondes. Le recueil des mesures est effectué jusqu'à la soixantième minute après la fin de l'aérosol d'histamine. Les poumons de l'animal sont récupérés à la fin de chaque expérience pour quantification des radicaux libres.

8.5.3 Pression artérielle et fréquence cardiaque

Les mesures de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque sont effectuées avant l'aérosol d'histamine puis 10, 30 et 60 minutes après l'arrêt de l'aérosol d'histamine. On utilise une jauge de contrainte (Bell and Howell type 4-327 Pasadena CA, USA) et on enregistre la pression et la fréquence cardiaque avec un enregistreur GOULD (Cleveland OH, USA).

8.6 Origine et excipient des médicaments

Le cromakalim fut fournie par Sigma, le levcromakalim généreusement donné par Smith Kline Beecham (Royaume-Uni) et le nicorandil par Bellon (France). La nimodipine fut obtenue par l'intermédiaire des laboratoires Bayer (Allemagne) et la nicardipine par Sandoz (Suisse). Hormis le levcromakalim soluble dans l'eau, ces médicaments sont solubles dans des solutions variées :

- cromakalim (cromakalim 0,002 g dans 10 ml de DMSO 10 %),
- nicorandil (nicorandil 0,006 g, acétone 200 μ l pour 10 ml d'eau),
- nimodipine en solution alcoolique (nimodipine 0,010 g, alcool éthylique 96 % 10 g, polyoxoéthylène glycol 400 8,5 g, citrate de Na 2 H₂O 0,1 g, acide citrique anhydre 0,015 g, eau 31,255 g = 50ml)
- nicardipine en solution acide (nicardipine 0,010 g, sorbitol 0,5 g, eau 10 ml, HCl 0,1 N à pH = 3,5). Tous les solvants ont été testés par voie intra-veineuse sans produit actif (n = 2). Ils n'ont donné aucune altération de la réponse à l'histamine.

8.7 Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée dans un premier temps par une analyse de variance à deux facteurs afin d'étudier l'ensemble des valeurs entre elles. Puis un test de Student a été utilisé afin d'évaluer les différences observées à chaque temps. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives quand $p < 0,05$. Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (ESM).

Pour l'analyse des mesures en série, et notamment pour les courbes temporelles présentant un pic, il a été préconisé d'utiliser des mesures "résumées" comme par exemple, pour chaque animal d'expérience, l'aire sous la courbe (area under the curve : AUC) d'une variable en fonction du temps :

$$\text{AUC} = 1/2 \sum_{i=0}^{n-1} (t_{i+1} - t_i) (y_i + y_{i+1})$$

si nous avons $n + 1$ mesures y_i au temps t_i ($i = 0, \dots, n$).

Ces valeurs résumées sont ensuite analysées par les techniques statistiques habituelles (Matthews et coll 1990). Nous avons utilisé cette méthode pour affiner les comparaisons entre les divers inhibiteurs calciques et activateurs potassiques.

RÉSULTATS

9.1. Inhibiteurs calciques

9.1.1 Paramètres hémodynamiques

Tous les médicaments inhibiteurs calciques sont hypotenseurs ; ils ont été injectés à doses équi-hypotensives (tableau IX) déterminées expérimentalement par des posologies progressivement croissantes chez des lapins différents. En général, un maximum de trois lapins a été nécessaire afin d'obtenir une chute de la pression artérielle de 60 %. La chute de la pression artérielle moyenne est identique pour les différents médicaments du groupe (différence non significative entre les médicaments utilisés). La diminution de la pression artérielle ne semble pas le générateur de la diminution de réactivité à l'histamine. En effet le vérapamil ($0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) inhibiteur calcique n'a pas d'action sur les résistances, alors qu'il abaisse la pression artérielle de 54% ; le diazoxide (30 mg.kg^{-1}) activateur potassique engendre une hypotension similaire (- 55 %) mais n'a pas d'action sur les résistances pulmonaires totales. Il en est de même pour le nicorandil (2 mg.kg^{-1}) autre activateur potassique. De plus, l'hypotension artérielle ne semble pas entraîner une diminution significative des résistances thoraco-pulmonaires avant l'épreuve à l'histamine. Dans tous les groupes, ces résistances ont été mesurées avant et 5 minutes après l'injection des inhibiteurs calciques et des activateurs potassiques. Alors que l'hypotension est majeure, aucune différence entre les deux moyennes n'est significative pour tous les médicaments aux différentes posologies utilisées. Soixante minutes après l'aérosol d'histamine, la pression artérielle reste basse pour les dihydropyridines : nimodipine, nicardipine, et nifédipine. Pour les autres groupes, la pression artérielle moyenne n'est pas statistiquement différente des valeurs initiales. Il ne semble pas que les variations de la durée d'action de ces inhibiteurs calciques soient liées à leur demi-vie d'élimination : cette demi-vie est seulement de 1-2h pour la nimodipine, qui reste active à la 60^{ème} minute, alors qu'elle atteint 4-8h pour le vérapamil qui n'est plus actif à la 60^{ème} minute (Advenier et Meyer 1992). Les modifications de la fréquence cardiaque sont sans particularité.

Tableau IX
Inhibiteurs calciques, Paramètres hémodynamiques

	Avant injection de produit	Après	60 min après aérosol d'histamine
Pression artérielle (mmHg)			
Témoins (sérum physiologique)	85,6 ± 4,5	86,0 ± 5,2	78,6 ± 4,5
VERAPAMIL (0,3 mg kg ⁻¹)	83,0 ± 6,8	***38,3 ± 3,3	85,0 ± 7,2
VERAPAMIL (0,5 mg kg ⁻¹)	76,6 ± 8,6	**34,2 ± 6,7	65,3 ± 6,1
RO 40-5967 (1,0 mg kg ⁻¹)	86,6 ± 8,5	*54,3 ± 7,0	80,2 ± 5,9
RO 40-5967 (1,5 mg kg ⁻¹)	89,3 ± 2,5	***45,6 ± 5,4	85,5 ± 4,6
NIMODIPINE (0,2 mg kg ⁻¹)	89,0 ± 4,2	***37,3 ± 1,7	***62,0 ± 4,5
NICARDIPINE (0,1 mg kg ⁻¹)	96,0 ± 4,2	***43,3 ± 2,7	***70,3 ± 4,5
NIFEDIPINE (0,15 mg kg ⁻¹)	85,3 ± 1,4	***34,6 ± 4,8	**71,6 ± 3,4
Fréquence cardiaque (c/min)			
Témoins	288 ± 20	292 ± 17	288 ± 14
VERAPAMIL 0,3	273 ± 8	243 ± 9	265 ± 9
VERAPAMIL 0,5	298 ± 8	226 ± 26	282 ± 14
RO 40-5967 1,0	245 ± 26	233 ± 14	256 ± 12
RO 40-5967 1,5	288 ± 16	258 ± 13	271 ± 25
NIMODIPINE	263 ± 14	***187 ± 17	243 ± 13
NICARDIPINE	300 ± 11	280 ± 9	298 ± 7
NIFEDIPINE	296 ± 24	280 ± 19	288 ± 20

Valeurs moyennes ± ESM ; n = 6 ; ***p < 0,001 par rapport aux valeurs avant l'injection du produit.

9.1.2 pH et gaz du sang

Le pH artériel et les gaz du sang ne sont pas modifiés statistiquement par la ventilation artificielle et les injections intra-veineuses d'inhibiteurs calciques. Dix minutes après la fin de l'inhalation d'histamine, la PaO₂ chute de façon significative dans le groupe contrôle, vérapamil et nifédipine, probablement en rapport avec des troubles de distribution. Dans les groupes RO 40-5967, nicardipine et nimodipine ces perturbations ne sont pas observées. Il est possible que les modifications des rapports ventilation/perfusion soient induites par le bronchospasme à l'histamine. Dans ce cas, le RO 40-5967, la nicardipine et la nimodipine qui réduisent substantiellement le bronchospasme, préviennent ces troubles de distribution et la chute de la PaO₂. Dans le groupe témoin, on note une acidose respiratoire minime 10 minutes après l'aérosol d'histamine.

Tableau X

Inhibiteurs calciques : pH et gaz du sang artériel

	Avant histamine	10 min après histamine	60 min après histamine
<u>Témoins</u>			
pH	7,388 ± 0,027	**7,319 ± 0,067	7,374 ± 0,072
Paco ₂ kPa (mmHg)	3,3 ± 0,2 (24,5)	*3,9 ± 0,4 (29,2)	3,4 ± 0,3 (25,3)
Pao ₂ kPa (mmHg)	10,8 ± 0,8 (81,0)	***5,9 ± 0,3 (44,3)	**7,3 ± 0,5 (54,7)
<u>Vérapamil 0,3</u>			
pH	7,406 ± 0,016	7,345 ± 0,025	7,426 ± 0,028
Paco ₂	3,3 ± 0,2 (24,7)	3,3 ± 0,2 (24,7)	2,9 ± 0,3 (21,7)
Pao ₂	11,1 ± 0,4 (83,3)	***8,3 ± 0,7 (62,6)	**9,1 ± 0,7 (68,3)
<u>Nifédipine 0,15</u>			
pH	7,414 ± 0,020	7,281 ± 0,025	7,318 ± 0,020
Paco ₂	2,8 ± 0,1 (21,0)	3,5 ± 0,1 (26,2)	3,1 ± 0,1 (23,3)
Pao ₂	11,1 ± 0,6 (83,3)	***7,3 ± 0,7 (54,8)	***7,9 ± 0,6 (59,3)
<u>RO 40-5967 1,5</u>			
pH	7,462 ± 0,020	7,428 ± 0,024	7,463 ± 0,024
Paco ₂	3,3 ± 0,1 (24,7)	3,2 ± 0,2 (24,0)	3,1 ± 0,1 (23,3)
Pao ₂	10,3 ± 0,8 (77,2)	9,6 ± 0,9 (72,0)	9,9 ± 0,9 (74,3)
<u>Nicardipine 0,1</u>			
pH	7,400 ± 0,022	7,386 ± 0,046	7,384 ± 0,066
Paco ₂	3,3 ± 0,1 (24,8)	2,8 ± 0,3 (21,0)	**2,4 ± 0,3 (18,0)
Pao ₂	10,6 ± 0,2 (79,5)	9,0 ± 1,2 (67,5)	9,8 ± 0,8 (73,5)
<u>Nimodipine 0,2</u>			
pH	7,395 ± 0,012	***7,291 ± 0,029	***7,250 ± 0,041
Paco ₂	2,5 ± 0,2 (18,7)	2,5 ± 0,1 (18,7)	2,6 ± 0,2 (19,5)
Pao ₂	12,5 ± 0,5 (93,7)	11,0 ± 1,2 (82,5)	11,6 ± 1,5 (87,0)

Valeurs moyennes ± ESM; n = 6; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 par rapport aux valeurs avant l'aérosol d'histamine.

9.1.3 Dose réponse pour vérapamil et RO 40-5967

Avec ce modèle, *in vivo*, il n'était pas possible d'utiliser des posologies médicamenteuses différentes chez le même animal. Après un premier challenge avec un aérosol d'histamine, un second challenge est pratiquement sans effet. Un autre animal doit être utilisé pour une autre posologie. Avant de réaliser l'expérience définitive, nous avons utilisé des posologies progressives afin d'obtenir une diminution de 50 % de la pression artérielle. Il ne s'agit pas d'un critère de puissance vis à vis des bronches mais d'une limitation technique vis à vis de l'utilisation intra-veineuse d'un médicament chez un animal vivant. En fait, cela correspondait à la dose maximale possible sans décès. Il s'agit d'un travail considérable compte tenu des variations interindividuelles de la réactivité bronchique à l'histamine chez le lapin, et nous ne l'avons réalisé qu'avec le vérapamil et le RO 40-5967.

Pour le vérapamil la posologie de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ iv donne des résultats intéressants, mais il s'agit de la DL50. La dose de $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ n'est pas létale mais quasi inactive. La chute de la pression artérielle était la même avec les deux posologies (-57 % avec $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ et -55 % avec $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$). Ainsi, la posologie de $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ a été utilisée pour comparaison avec les autres inhibiteurs calciques (figure 10).

Pour le RO 40-5967, la dose de 1 mg.kg^{-1} iv, n'a pas d'effet sur le bronchospasme. La dose de $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ iv, active sur le bronchospasme, est proche de la dose toxique (2 mg.kg^{-1} iv) pour le lapin. C'est la dose de $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ iv qui a été retenue (figure 11).

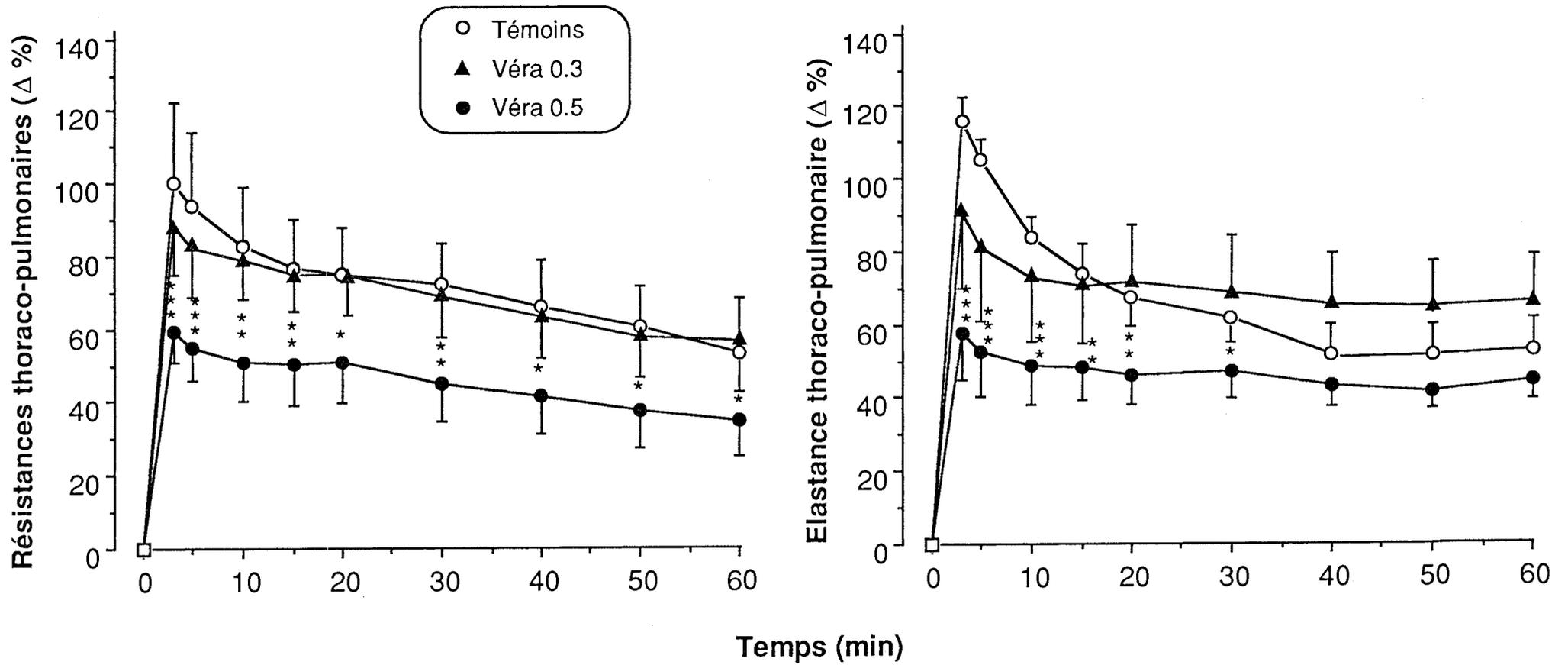


Fig. 10 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de verapamil 0.3 et 0.5 mg kg⁻¹ (n = 6).
 * p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 (entre les valeurs à chaque temps respectif).
 Valeurs moyennes ± SEM

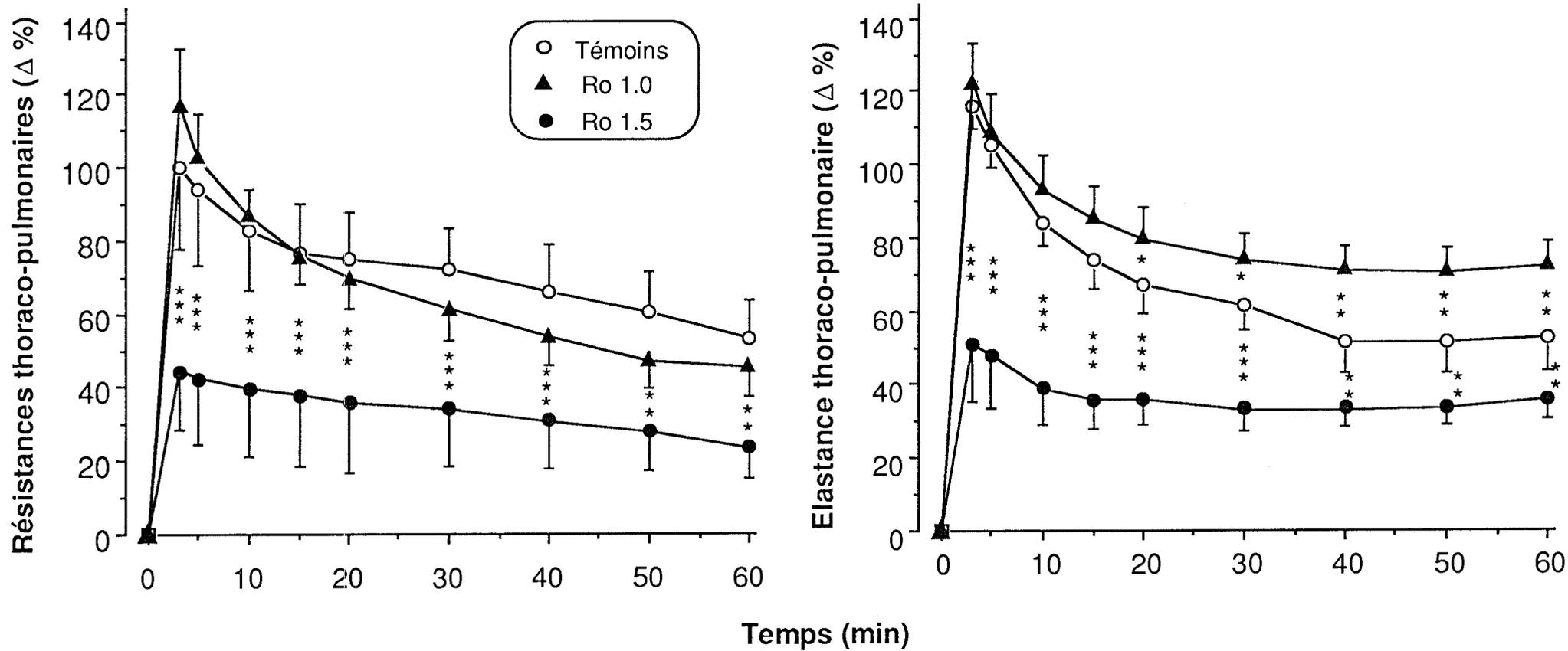


Fig. 11 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de RO 40-5967 1 et 1.5 mg kg⁻¹ (n = 6).
Mêmes conventions que pour la fig. 10.

9.1.4 Résistances et élastance thoraco-pulmonaires. Action et comparaison des différents inhibiteurs calciques par rapport à un groupe-témoin

Pour plus de clarté, les résultats de mécanique ventilatoire sont donnés en variation de pourcentage des valeurs initiales. Ceci est justifié parce que les valeurs initiales sont quasi les mêmes. Nous avons dans les 10 groupes comparatifs de 6 lapins, un groupe témoin (sérum physiologique), 5 groupes recevant un inhibiteur calcique, et 4 groupes un activateur potassique. En ce qui concerne les résistances thoraco-pulmonaires, les valeurs moyennes initiales de chaque groupe sont comprises entre 22,09 et 29,45 cm H₂O l⁻¹s avec une valeur moyenne initiale totale de 26,00 ± 0,66 (SEM) cm H₂O l⁻¹s. En ce qui concerne l'élastance thoraco-pulmonaire, les valeurs moyennes initiales de chaque groupe sont comprises entre 336,35 et 478,52 cm H₂O l⁻¹ avec une valeur moyenne initiale totale de 406,34 ± 14,62 cm H₂O l⁻¹. Ainsi, tous les écarts maximaux avec la valeur moyenne initiale totale sont très inférieurs à 20%, ce qui est tout à fait tolérable pour des valeurs biologiques.

• Résistances thoraco-pulmonaires

La figure 12 montre l'évolution des résistances pulmonaires totales après l'aérosol d'histamine dans les différents groupes. Après la fin de l'aérosol, les résistances pulmonaires totales sont plus basses dans les groupes RO 40-5967, nifédipine, nicardipine et nimodipine par rapport au groupe contrôle. Il existe donc un effet préventif de ces médicaments sur la bronchoconstriction à l'histamine. Le meilleur résultat est observé avec la nimodipine. En revanche, après l'aérosol d'histamine, on observe le même profil des résistances dans les groupes vérapamil et témoin. Ces résultats sont confirmés par le calcul des aires sous la courbe (AUC) des résistances thoracopulmonaires pour les différentes observations avec les cinq inhibiteurs calciques

utilisés : seuls le RO 40-5967, la nicardipine et la nimodipine ont une AUC moyenne significativement différente des témoins :

AUC RESISTANCES Δ % (n = 6)

Témoins (sérum physiologique)	69,78 \pm 12,12	
Vérapamil (0,3 mg.kg ⁻¹)	66,93 \pm 10,85	NS
Nifédipine (0,15 mg.kg ⁻¹)	44,98 \pm 6,68	NS
RO 40-5967 (1,5 mg.kg ⁻¹)	32,65 \pm 14,44	*
Nicardipine (0,1 mg.kg ⁻¹)	28,42 \pm 5,74	**
Nimodipine (0,2 mg.kg ⁻¹)	23,03 \pm 6,68	**

• Elastance thoraco-pulmonaire

La figure 13 objective l'évolution de l'élastance pulmonaire totale après l'aérosol d'histamine. A la fin de l'aérosol, les valeurs les plus basses sont obtenues avec les groupes RO 40-5967, nimodipine, nicardipine et nifédipine. Le meilleur effet est observé avec la nimodipine. Les deux autres dihydropyridines : nifédipine à la dose de 0,15 mg.kg⁻¹ et nicardipine (0,1 mg.kg⁻¹) ont également des activités satisfaisantes. Ces résultats sont confirmés par le calcul des aires sous la courbe des élastances thoraco-pulmonaires dans les différents groupes. Seuls les groupes nicardipine et nimodipine diffèrent significativement du groupe témoin.

AUC ELASTANCE Δ % (n = 6)

Vérapamil	67,9 \pm 14,65	NS
Témoins	63,97 \pm 6,68	
Nifédipine	56,06 \pm 14,24	NS
RO 40-5967	35,2 \pm 6,23	NS
Nicardipine	32,19 \pm 13,43	*
Nimodipine	28,81 \pm 3,05	*

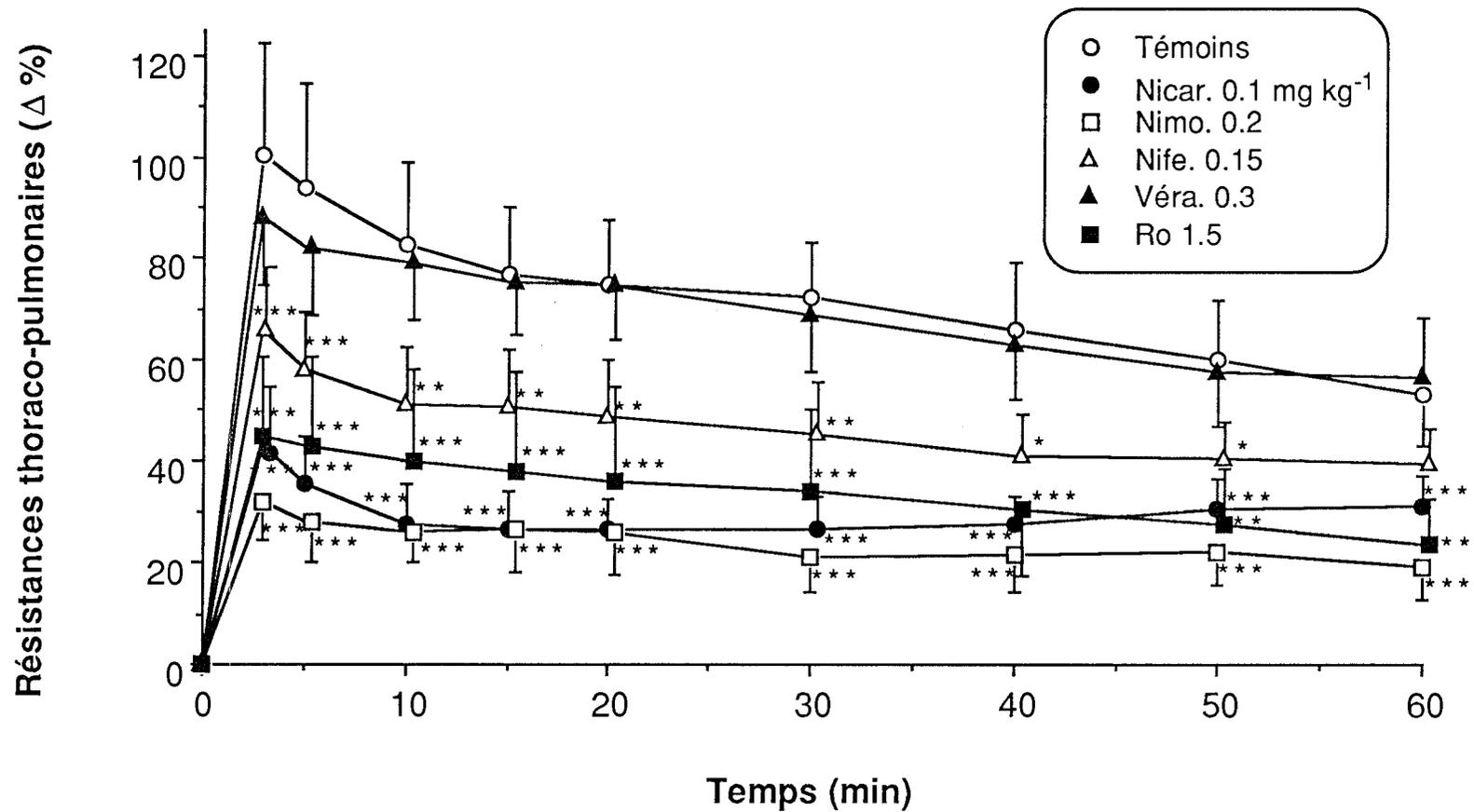


Fig. 12 - Variations des résistances thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après une injection iv de nicardipine 0.1 mg kg⁻¹, nimodipine 0.2 mg kg⁻¹, nifédipine 0.15 mg kg⁻¹, vérapamil 0.3 mg kg⁻¹ et RO 40-5967 1.5 mg kg⁻¹ (doses maximales utilisables chez le lapin).Mêmes conventions que pour la figure 10.

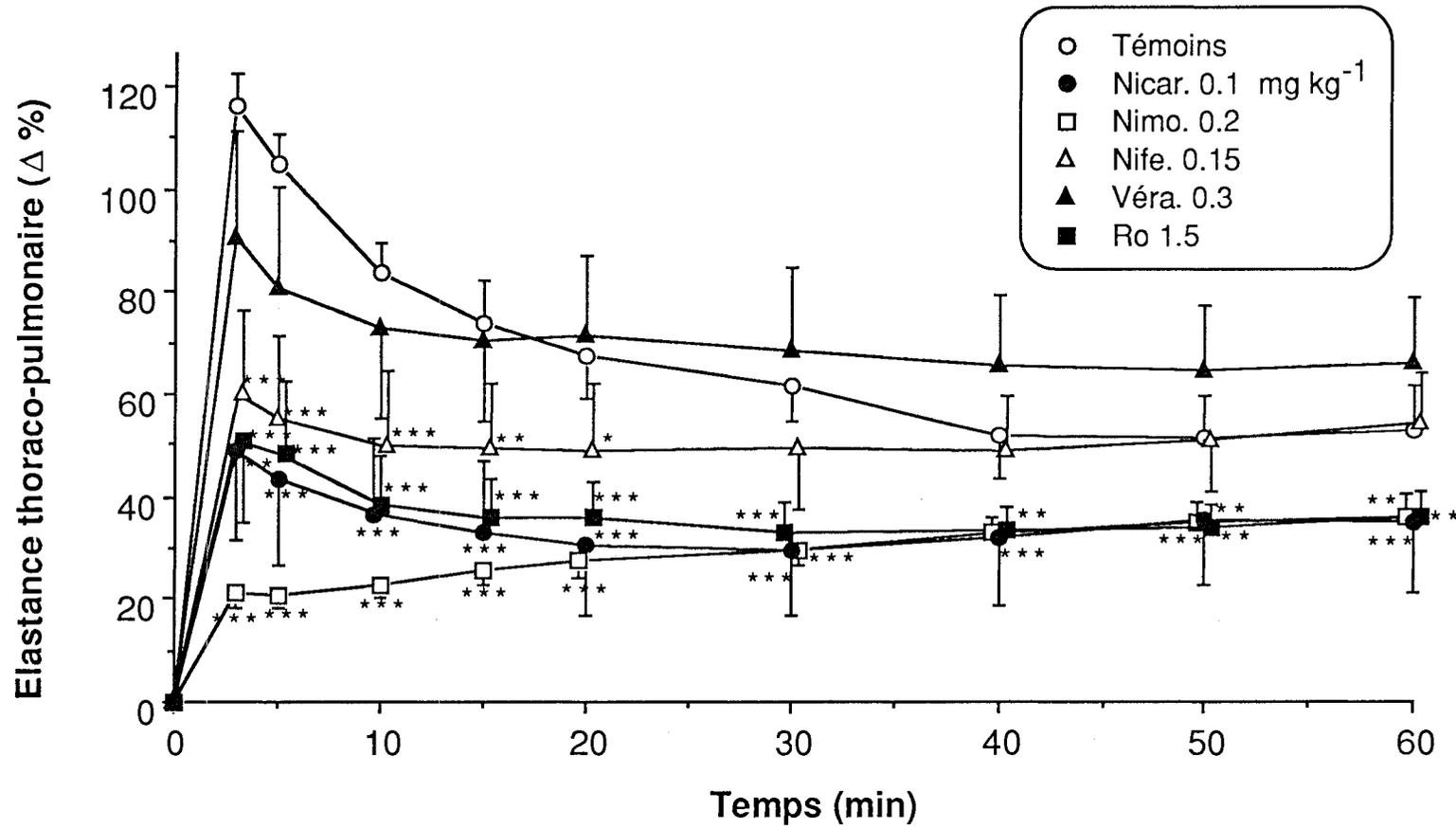


Fig. 13 - Variations de l'élastance thoraco-pulmonaire à l'aérosol d'histamine après une injection iv de nicardipine, nimodipine, nifédipine, vérapamil et Ro 40-5967 aux doses maximales utilisables chez le lapin. Mêmes conventions que pour la figure 10.

9.2 Activateurs potassiques

9.2.1 Paramètres hémodynamiques

La chute de la pression artérielle moyenne est similaire pour les posologies d'activateurs potassiques utilisés (tableau XI). Dans tous les groupes (sauf chez les témoins) la pression artérielle moyenne reste abaissée 60 minutes après l'aérosol d'histamine. Les demi-vies d'élimination des produits testés sont en général longues (environ 24h), excepté pour le nicorandil. Les modifications de la fréquence cardiaque sont sans particularité.

Tableau XI
 Activateurs potassiques. Paramètres hémodynamiques

	Avant injection du produit	Après	60 min après d'aérosol d'histamine
Pression artérielle (mmHg)			
Témoins (sérum physiologique)	85,6 ± 4,5	86,0 ± 5,2	78,6 ± 4,5
NICORANDIL (2 mg kg ⁻¹)	95,3 ± 2,8	***37,6 ± 2,5	***73,0 ± 9,0
CROMAKALIM (0,5 mg kg ⁻¹)	89,6 ± 2,0	***36,0 ± 5,0	***54,3 ± 6,0
LEVCROMAKALIM (0,5 mg kg ⁻¹)	87,0 ± 2,7	***33,3 ± 3,5	***39,3 ± 2,8
DIAZOXIDE (30 mg kg ⁻¹)	95,0 ± 3,7	***43,0 ± 6,6	***50,8 ± 3,7
Fréquence cardiaque (c/min)			
Témoins	288 ± 20	292 ± 17	288 ± 14
NICORANDIL	332 ± 18	327 ± 17	**280 ± 15
CROMAKALIM	295 ± 11	290 ± 29	305 ± 8
LEVCROMAKALIM	300 ± 12	322 ± 16	303 ± 9
DIAZOXIDE	273 ± 21	306 ± 18	288 ± 17

Valeurs moyennes ± ESM ; n = 6 ; ***p < 0,001 par rapport aux valeurs avant l'injection du produit.

9.2.2 pH et gaz du sang artériel

Dix minutes après la fin de l'aérosol d'histamine, la PaO₂ chute de façon significative dans le groupe témoin et les groupes d'activateurs potassiques étudiés (tableau XII), vraisemblablement en rapport avec des modifications des rapports ventilation/perfusion. La légère baisse du pH pendant l'expérience révèle une acidose métabolique.

Tableau XII

Activateurs potassiques : pH et gaz du sang artériel

	Avant histamine	10 min après histamine	60 min après histamine
<u>Témoins</u>			
pH	7.388 ± 0.027	**7.319 ± 0.067	7.374 ± 0.072
Paco ₂ kPa (mmHg)	3.3 ± 0.2 (24.5)	*3.9 ± 0.4 (29.2)	3.4 ± 0.3 (25.3)
Pao ₂ kPa (mmHg)	10.8 ± 0.8 (81.0)	***5.9 ± 0.3 (44.3)	**7.3 ± 0.5 (54.7)
<u>Nicorandil 2</u>			
pH	7.391 ± 0.029	7.369 ± 0.031	7.287 ± 0.055
Paco ₂	3.7 ± 0.3 (27.7)	3.6 ± 0.4 (27.0)	3.1 ± 0.2 (23.3)
Pao ₂	10.1 ± 0.4 (75.8)	**5.1 ± 0.9 (38.2)	*7.4 ± 0.6 (55.5)
<u>Cromakalim 0,5</u>			
pH	7.376 ± 0.023	7.344 ± 0.040	**7.325 ± 0.039
Paco ₂	2.9 ± 0.3 (21.8)	3.2 ± 0.3 (24.0)	2.9 ± 0.2 (21.7)
Pao ₂	11.8 ± 0.9 (88.5)	**7.6 ± 0.8 (57.0)	9.8 ± 0.9 (73.5)
<u>Levcromakalim 0,5</u>			
pH	7,383 ± 0,028	**7,327 ± 0,028	***7,303 ± 0,033
Paco ₂	2,9 ± 0,1 (21,8)	2,9 ± 0,2 (21,8)	2,6 ± 0,1 (19,5)
Pao ₂	11,0 ± 0,8 (82,5)	**7,4 ± 0,9 (55,5)	10,0 ± 0,7 (75,0)
<u>Diazoxide 30</u>			
pH	7,421 ± 0,023	*7,304 ± 0,032	*7,251 ± 0,068
Paco ₂	3,3 ± 0,2 (24,5)	4,0 ± 0,4 (30,0)	3,7 ± 0,5 (27,8)
Pao ₂	10,7 ± 0,3 (80,3)	***5,6 ± 0,4 (42,0)	**7,4 ± 0,8 (55,5)

Valeurs moyennes ± ESM ; n = 6 ; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 par rapport aux valeurs avant l'aérosol.

9.2.3 Résistances et élastance thoraco-pulmonaires. Action et comparaison des différents activateurs potassiques par rapport à un groupe-témoin

• Résistances thoraco-pulmonaires

A la fin de l'aérosol d'histamine, les résistances thoraco-pulmonaires sont les plus basses avec le levcromakalim (+ 68 %, $p < 0,001$) et le cromakalim (+ 57 %, $p < 0,001$) par rapport au groupe contrôle (+ 100 %), ce qui tend à montrer un effet préventif de ces médicaments sur la bronchoconstriction à l'histamine (figure 14). Le meilleur effet est observé avec le cromakalim ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$). Le calcul des aires sous la courbe (AUC) pour les résistances thoraco-pulmonaires montre que seule l'AUC moyenne pour le cromakalim est significativement différente ($p < 0,05$) des valeurs témoins :

AUC RESISTANCES Δ % (n = 6)

Témoins (sérum physiologique)	$69,78 \pm 12,12$	
Diazoxide (30 mg.kg^{-1})	$64,92 \pm 6,15$	NS
Nicorandil (2 mg.kg^{-1})	$51,09 \pm 7,91$	NS
Levcromakalim ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$)	$46,28 \pm 7,95$	NS
Cromakalim ($0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$)	$41,37 \pm 11,34$	*

• Élastance thoraco-pulmonaire

L'augmentation la moins importante de l'élastance est observée avec le nicorandil, le cromakalim et le levcromakalim. La différence est significative par rapport au groupe témoin (figure 15). Cependant, les calculs des aires sous la courbe pour l'élastance

thoraco-pulmonaire observée avec les quatre différents activateurs potassiques ne différent pas statistiquement des valeurs moyennes des témoins :

AUC ELASTANCE Δ % (n = 6)		
Diazoxide	72,82 \pm 6,66	NS
Témoins	63,97 \pm 6,68	
Nicorandil	43,69 \pm 10,75	NS
Levcromakalim	42,00 \pm 12,13	NS
Cromakalim	40,99 \pm 13,71	NS

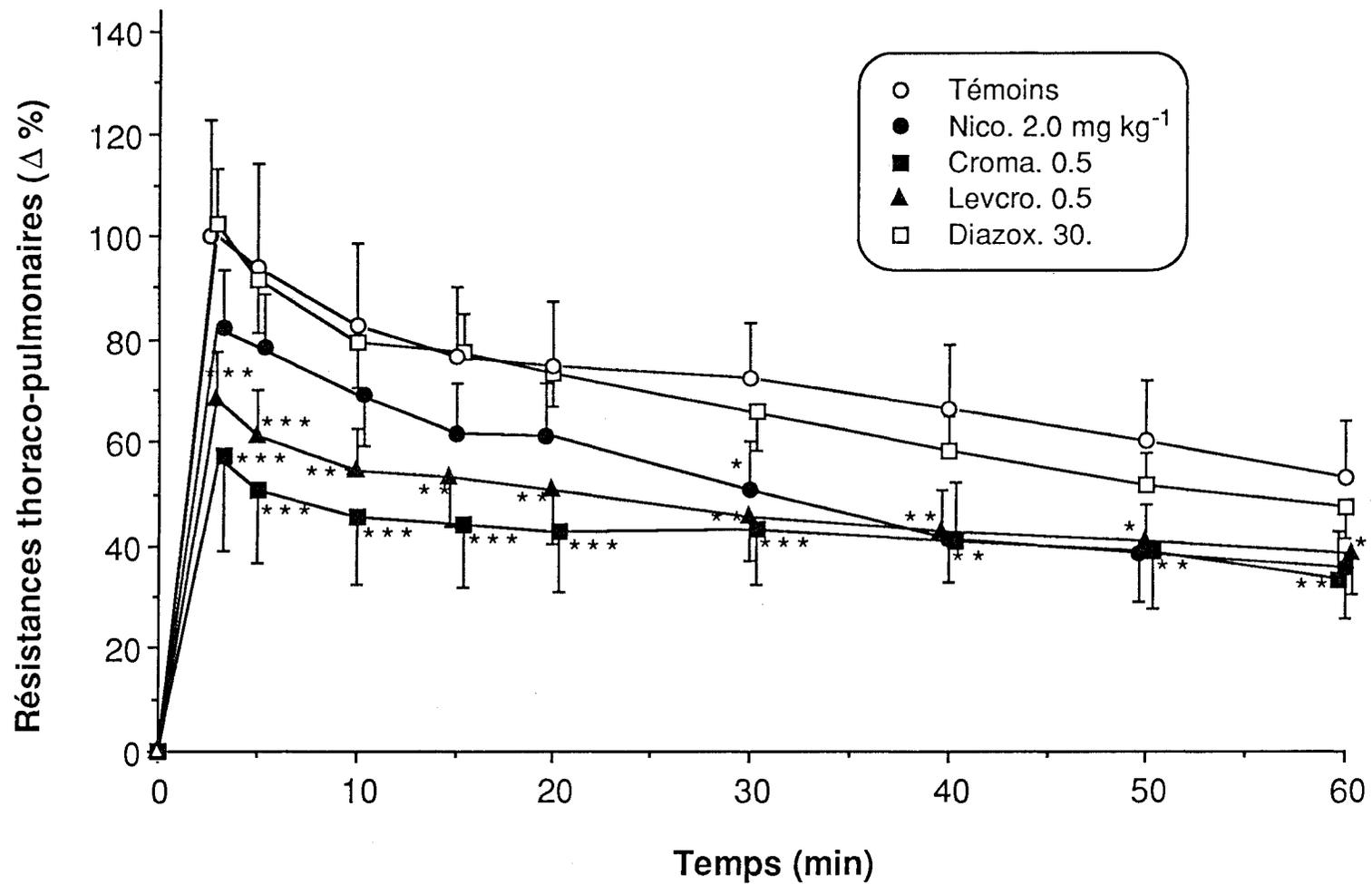


Fig. 14 - Variations des résistances thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après une injection iv de nicorandil 2 mg kg⁻¹, cromakalim 0.5 mg kg⁻¹, levcromakalim 0.5 mg kg⁻¹, et diazoxide 30 mg kg⁻¹ (doses maximales utilisables chez le lapin). Mêmes conventions que pour la figure 10.

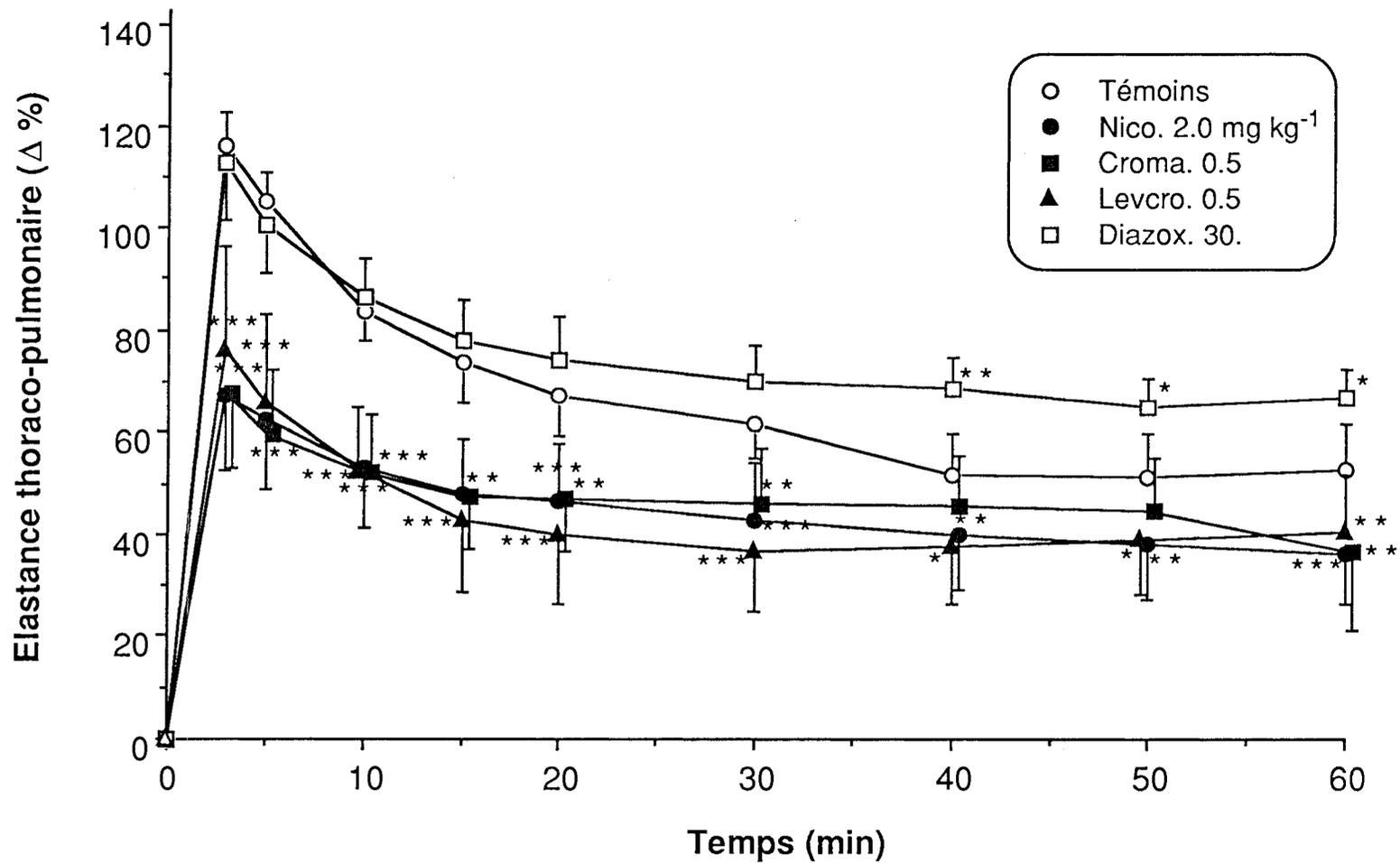


Fig. 15 - Variations de l'élastance thoraco-pulmonaire à l'aérosol d'histamine après une injection iv de nicorandil, cromakalim, levcromakalim et diazoxide (doses maximales utilisables chez le lapin).
Mêmes conventions que pour la figure 10.

9.2.4 Comparaison des inhibiteurs calciques avec les activateurs potassiques

Pour effectuer cette comparaison, nous avons choisi les drogues donnant les meilleurs résultats : la nicardipine ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) et la nimodipine ($0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) pour les inhibiteurs calciques et le nicorandil (2 mg.kg^{-1}), le cromakalim ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) et le levromakalim ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) pour les activateurs potassiques.

Les inhibiteurs calciques, nicardipine et nimodipine offrent une meilleure protection vis à vis du bronchospasme que les activateurs potassiques (figures 16 et 17). A la fin de l'aérosol d'histamine le meilleur résultat (c'est-à-dire la meilleure inhibition du bronchospasme) est celui obtenu avec la dihydropyridine nimodipine ($\Delta Rrs : + 30\%$) alors que le meilleur résultat obtenu avec les activateurs potassiques est de ($\Delta Rrs : + 57\%$) avec le cromakalim. Au même moment, la nicardipine, une autre dihydropyridine entraînait une augmentation ΔRrs de $+ 43 \%$; les activateurs potassiques levromakalim et nicorandil avaient de moindres performances puisque respectivement avec $\Delta Rrs +68 \%$ et $+82 \%$.

Le calcul des aires sous la courbe dont les valeurs ont été déjà données précédemment montrent que seul le groupe cromakalim est statistiquement différent ($p < 0,05$) du groupe témoin pour les résistances thoraco-pulmonaires, chez les activateurs potassiques. Chez les inhibiteurs calciques les valeurs AUC de la nicardipine et la nimodipine sont très différentes ($p < 0,01$) des valeurs témoins en ce qui concerne les résistances thoraco-pulmonaires. En ce qui concerne l'élastance thoraco-pulmonaire seules les valeurs AUC de la nicardipine et de la nimodipine différent ($p < 0,05$) des valeurs témoins.

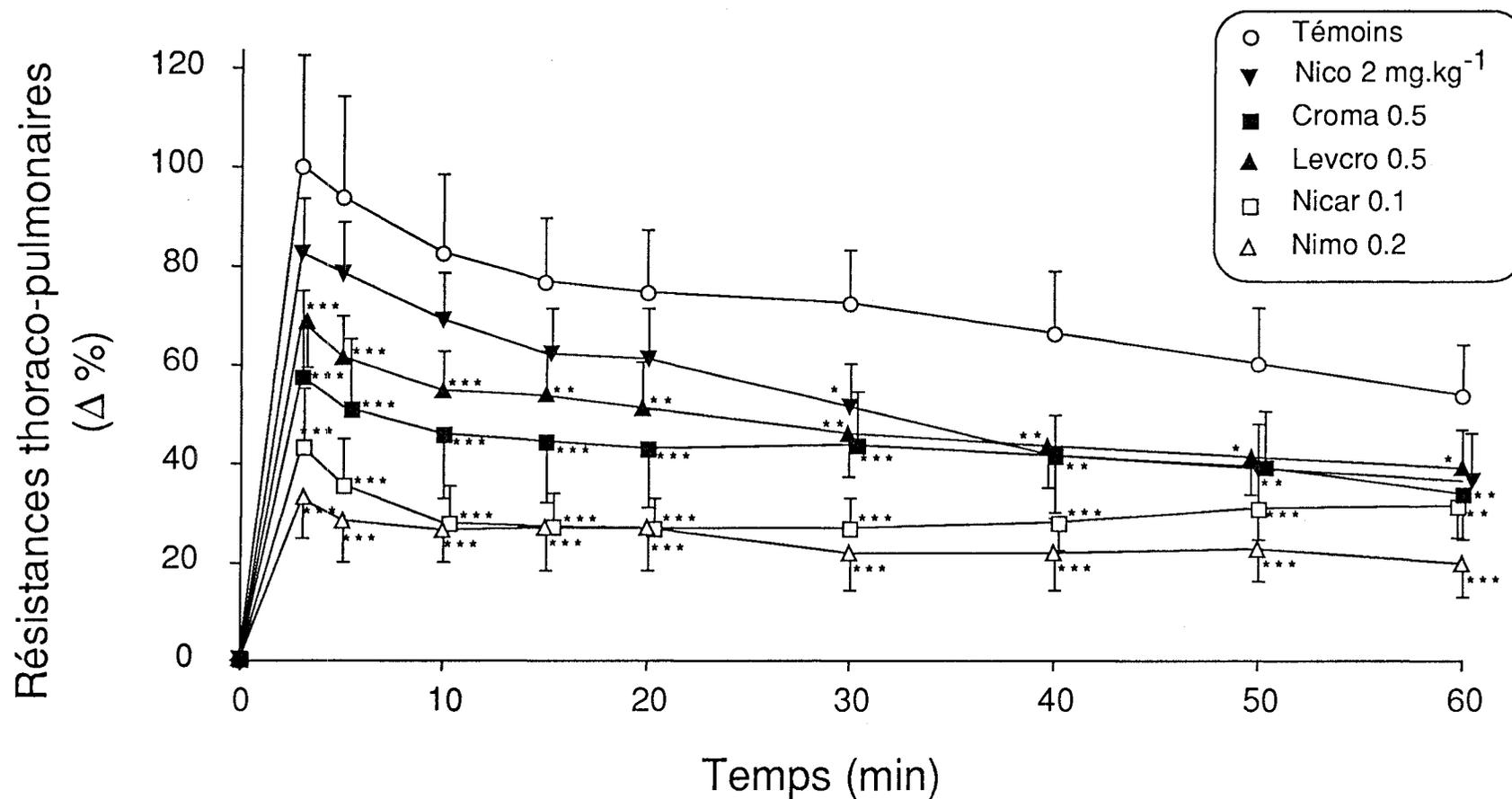


Fig. 16 - Comparaison des variations des résistances thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après une injection iv de nicardipine 0.1 mg kg⁻¹, de nimodipine 0.2 mg kg⁻¹ (inhibiteurs calciques) et de nicorandil 2 mg kg⁻¹, de cromakalim 0.5 mg kg⁻¹ et de levcromakalim 0.5 mg kg⁻¹ (activateurs potassiques). Mêmes conventions que pour la figure 10.

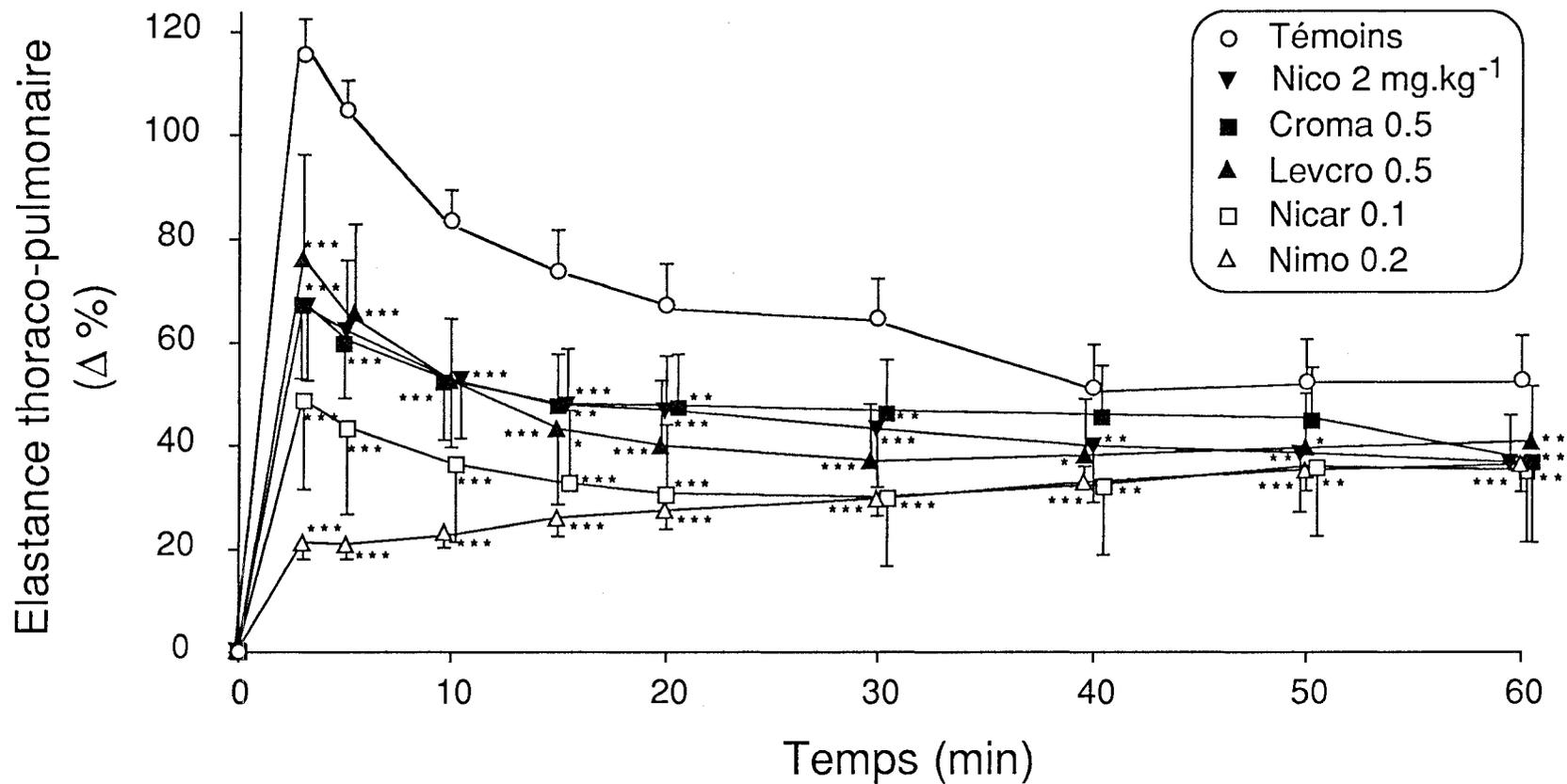


Fig. 17 - Comparaison des variations de l'élastance thoraco-pulmonaire à l'aérosol d'histamine après une injection iv de nicardipine, de nimodipine (inhibiteurs calciques) et de nicorandil, de cromakalim et de levromakalim (activateurs potassiques) aux doses maximales chez le lapin. Mêmes conventions que pour la figure 10.

9.3 Mécanismes d'action associés

Outre les modifications des canaux calciques et potassiques, le monoxyde d'azote (NO) et les radicaux libres sont-ils impliqués dans les modifications du bronchospasme à l'histamine, observées avec les inhibiteurs calciques et les activateurs potassiques ?

Chez des cobayes anesthésiés et ventilés artificiellement le NO inhalé diminue les résistances pulmonaires, les variations de résistance et de compliance pulmonaire dynamique après administration iv de méthacholine (Dupuy et coll 1992). Ces observations ont été confirmées chez le lapin (Högman et coll 1993a) mais dans cette espèce la compliance du système respiratoire chute de la même manière après méthacholine avec ou sans NO. Chez le chien, le NO inverse complètement la bronchoconstriction induite par l'histamine de façon dose-dépendante, mais seulement inverse partiellement la bronchoconstriction à la méthacholine (Brown et coll 1994). Chez l'homme, cependant, l'effet bronchodilatateur du NO est moins important (Högman et coll 1993b, Sanna et coll 1994). Par ailleurs, l'inoculation intratrachéale du virus parainfluenza de type 3 à des cobayes augmente la réactivité bronchique des voies aériennes à l'histamine. Le précurseur du NO, la L-arginine, ou le donneur de NO : S-nitroso-N-acétyl-pénicillamine (SNAP) injectés dans la lumière du tube trachéal des animaux infectés préviennent l'hyperréactivité induite par l'histamine. La production de NO est diminuée dans la trachée des animaux infectés et l'incubation des tissus avec de la L-arginine ramène la production de NO aux valeurs témoins (Folkerts et coll 1994). En rapport avec ceci, Nijkamp et coll (1993) ont donné des inhibiteurs de la synthèse du NO (ISNO) par aérosol, N^G-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) ou N^G-mono méthyl-L-arginine (L-NMMA) chez des cobayes anesthésiés ; ceci entraînait une augmentation des résistances pulmonaires après histamine. Cet effet est inhibé par un aérosol de L-arginine. *In vitro*, la perfusion de la lumière de la trachée par ISNO augmentait son tonus basal. Donc, le NO pourrait jouer un rôle dans la régulation du tonus des muscle des voies aériennes et dans la réponse à l'histamine. Nous avons donc étudié les effets du L-NAME et des générateurs de NO sur le bronchospasme à

l'histamine et leurs implications dans les phénomènes observés avec les inhibiteurs calciques et les activateurs potassiques.

Si le rôle du NO dans le bronchospasme est largement suspecté, le rôle éventuel des radicaux libres oxygénés est moins connu. Katsumata et coll (1990) chez le chat anesthésié ont aérosolisé xanthine puis xanthine-oxydase afin de générer enzymatiquement des radicaux libres oxygénés. La résistance pulmonaire augmente instantanément de 15 à 30 cm H₂O/l/s (p<0,01). Cette augmentation est significativement diminuée par administration préalable de superoxyde dismutase ou de catalase. Après xanthine, xanthine-oxydase, les voies aériennes hyperréagissent à l'acétylcholine après 30 et 60 minutes (p<0,05) mais non après 120 minutes. Ces données laissent penser que les radicaux libres oxygénés pourraient induire une bronchoconstriction et une hyperréactivité bronchique. Les mêmes résultats ont été obtenus chez le mouton (Lansing et coll 1991). Les études chez le mouton indiquent que l'hyperréactivité bronchique induite par le couple xanthine, xanthine-oxydase résulte de la génération secondaire de médiateurs lipidiques par ces radicaux (Lansing et coll 1991).

In vitro, la génération d'anion superoxyde engendre la contraction biphasique de la trachée isolée de cobaye (Nishida et coll 1985). Le leucotriène LTD₄ active les espèces oxygène actives et augmente l'hyperréactivité des voies aériennes chez le cobaye (Weiss et Bellino 1986). H₂O₂ entraîne la contraction des bronches intra-pulmonaires de rat (Szarek et Schmidt 1990). Tous ces phénomènes génèrent des médiateurs lipidiques (Hemler et lands 1980, Sporn et coll 1988) et sont en accord avec ce qui est observé *in vivo*.

De plus, *in vivo* les radicaux oxygénés contribuent à l'hyperréactivité bronchique induite par un antigène chez la brebis éveillée (Lansing et coll 1993).

Il semble donc bien établi de nos jours que les radicaux libres oxygénés contribuent à la bronchoconstriction et à l'hyperréactivité bronchique (Stevens et coll 1995).

Nous avons voulu vérifier ces phénomènes dans notre modèle de bronchospasme à l'histamine chez le lapin.

9.3.1 Inhibition de la NO synthétase par le L-NAME

9.3.1.1 Méthodes

Les expériences sont conduites comme précédemment avec le même protocole. Après les mesures de contrôle, le L-NAME est injecté par voie intra-veineuse pendant 2 minutes, 5 minutes avant l'aérosol d'histamine :

- 6 lapins ont reçu 10 mg.kg⁻¹ de L-NAME iv,
- 6 lapins ont reçu 15 mg.kg⁻¹ de L-NAME iv,
- 6 lapins ont reçu 2 ml de sérum physiologique (témoins).

La quantité de L-NAME injectée a été choisie en fonction des données de la littérature.

Les concentrations de L-NAME et de son métabolite N^G-nitro-L-arginine (L-NNA) ont été mesurées dans le plasma artériel au cours de 4 expériences, à 15 mg.kg⁻¹ et 4 expériences à 10 mg.kg⁻¹. La mesure a été faite par HPLC avec la technique décrite par Schwarzacher et Raberger (1992).

Méthode de dosage de L-NAME et L-NNA

Les taux de L-NAME et de L-NNA sont mesurés par HPLC selon la technique de S. Schwarzacher et G. Raberger (Schwarzacher et Raberger 1992) en utilisant une colonne nucléosil 5SA (250 x 4 mm), une phase mobile de NaH₂PO₄ 100 mM avec 10 % de méthanol pH 2,3 à 1 ml/min et une détection UV à 268 nm. 200 µl de plasma sont déprotéinisés avec 20 µl d'acide perchlorique 4,4 M. Après centrifugation 50 µl de surnageant dilué 1/10 sont injectés sur la colonne. Les pics de L-NNA et L-NAME sortent respectivement à 5,4 min et 12 min de l'injection. Une gamme étalon est réalisée en ajoutant des quantités connues (de 0,25 à 20 µg/ml) de L-NAME et L-NNA à du plasma pur.

9.3.1.2 Résultats

9.3.1.2.1 Dosage du L-NAME et de L-NNA dans le plasma

La concentration du L-NAME disparaît assez rapidement dans le plasma artériel ; elle est d'ailleurs quasi semblable après une injection de 10 mg.kg⁻¹ ou 15 mg.kg⁻¹. Au contraire, le métabolite actif L-NNA reste remarquablement constant. Sa concentration est plus élevée dans le plasma artériel après la dose de L-NAME de 15 mg.kg⁻¹ (figure 18).

9.3.1.2.2 Paramètres hémodynamiques (tableau XIII)

Les variations de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque sont sans particularité ; l'augmentation de la pression artérielle après injection de L-NAME n'est pas significative.

9.3.1.2.3 pH et gaz du sang artériel (tableau XIV)

Soixante minutes après l'aérosol d'histamine, le pH artériel est plus acide dans le groupe L-NAME que dans le groupe témoin. La différence significative de la PaO₂ entre témoins et groupe L-NAME au cours de la respiration spontanée avant histamine est probablement due à des différences dans la profondeur de l'anesthésie.

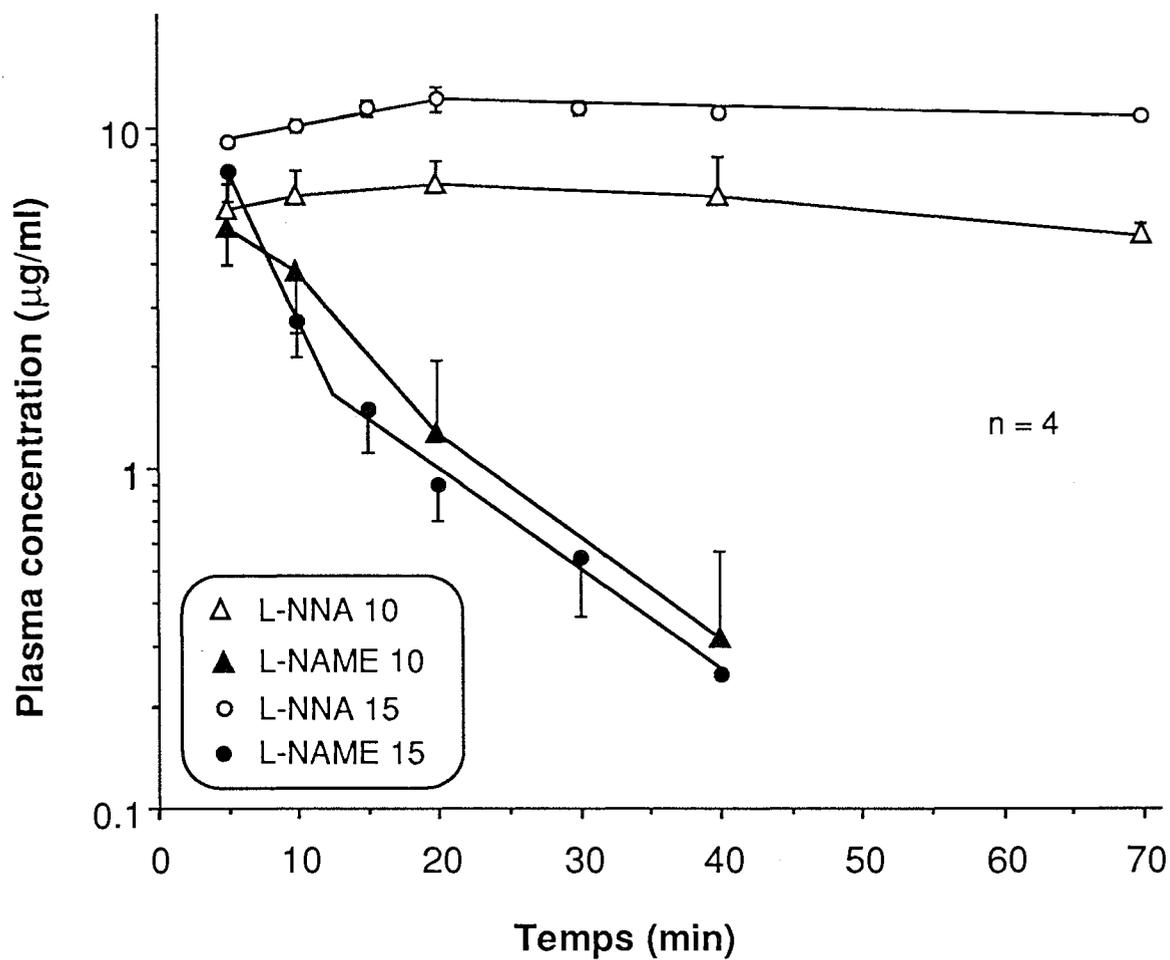


Fig. 18 - Concentrations plasmatiques artérielles de L-NAME et de son métabolite actif L-NNA après injection iv de 10 mg kg^{-1} et de 15 mg kg^{-1}

Tableau XIII

Inhibiteur de la NO synthétase (L-NAME) : Paramètres hémodynamiques

	Avant injection de produit	Après	60 minutes après aérosol d'histamine
Pression artérielle (mmHg)			
Témoins (sérum physiologique)	97,3 ± 6,4	94,0 ± 5,7	*74,3 ± 8,6
L-NAME (10 mg.kg ⁻¹)	100,6 ± 4,5	108,3 ± 5,7	**74,0 ± 8,6
L-NAME (15 mg.kg ⁻¹)	85,3 ± 5,4	92,3 ± 3,3	84,3 ± 5,2
Fréquence cardiaque (c/min)			
Témoins	320 ± 17	297 ± 22	305 ± 7
L-NAME 10	328 ± 13	290 ± 22	284 ± 13
L-NAME 15	297 ± 14	275 ± 15	275 ± 11

Valeurs moyennes ± ESM ; n = 6 ; *p < 0,05, ** p < 0,01 par rapport aux valeurs avant l'injection du produit.

Tableau XIV

Inhibiteur de la NO synthétase (L-NAME) : pH et gaz du sang artériel

	avant histamine	10 min après histamine	60 min après histamine
Témoins n = 6			
pH	7,427 ± 0,011	7,419 ± 0,034	**7,523 ± 0,027
Paco ₂ kPa (mmHg)	3,5 ± 0,2 (26,3)	3,3 ± 0,2 (24,8)	**2,4 ± 0,1 (18,0)
Pao ₂ kPa (mmHg)	9,6 ± 0,5 (72,0)	**6,9 ± 0,6 (51,8)	9,8 ± 0,6 (73,5)
L-NAME (10 et 15 mg kg ⁻¹) n = 12			
pH	7,396 ± 0,022	7,354 ± 0,030	7,293 ± 0,043
Paco ₂	3,4 ± 0,1 (25,5)	2,9 ± 0,2 (21,8)	2,8 ± 0,1 (21,0)
Pao ₂	11,0 ± 0,3 (82,5)	**6,9 ± 0,3 (51,8)	9,8 ± 0,3 (73,5)

Valeurs moyennes ± ESM ; *p < 0,06, **p < 0,01 par rapport aux valeurs avant l'aérosol d'histamine.

9.3.1.2.4 Résistances et élastance thoraco-pulmonaires

L'évolution des résistances et de l'élastance pulmonaire totales en comparaison à un groupe témoin est représentée sur la figure 19 (L-NAME 10 mg.kg⁻¹) et 20 (L-NAME 15 mg.kg⁻¹). Les différences avec le groupe témoin sont significatives seulement avec le groupe L-NAME 15. Les résistances mais surtout l'élastance thoraco-pulmonaire sont très augmentées par rapport aux valeurs témoins.

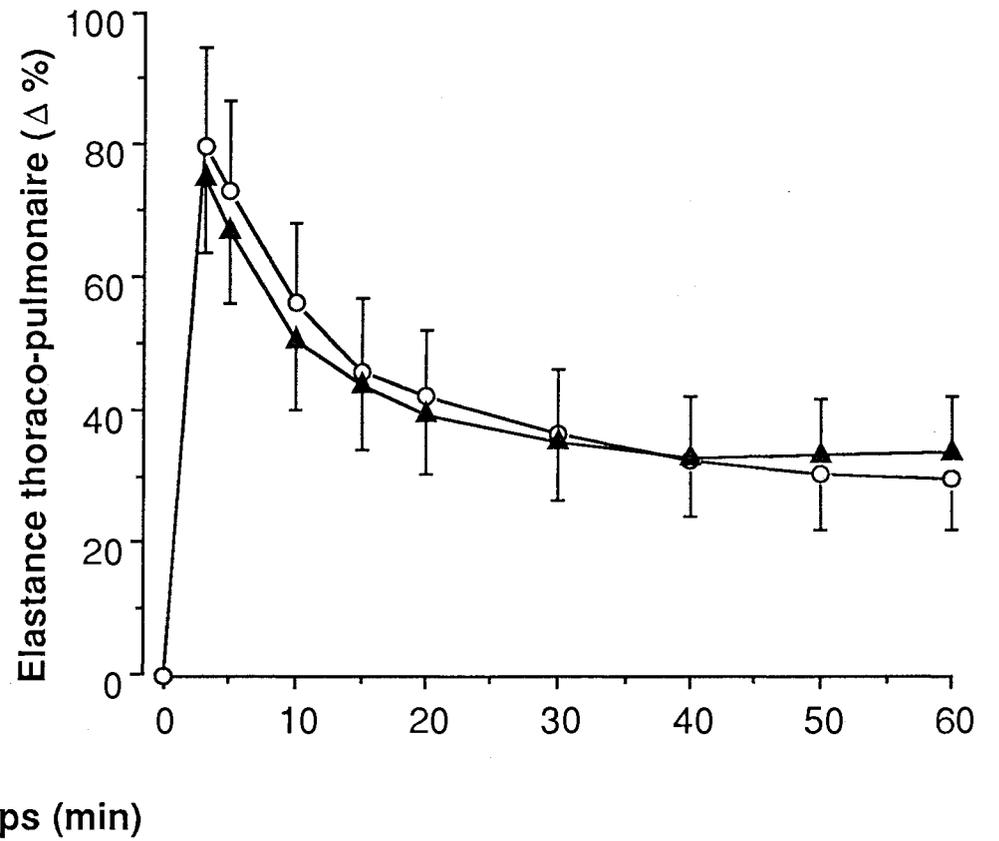
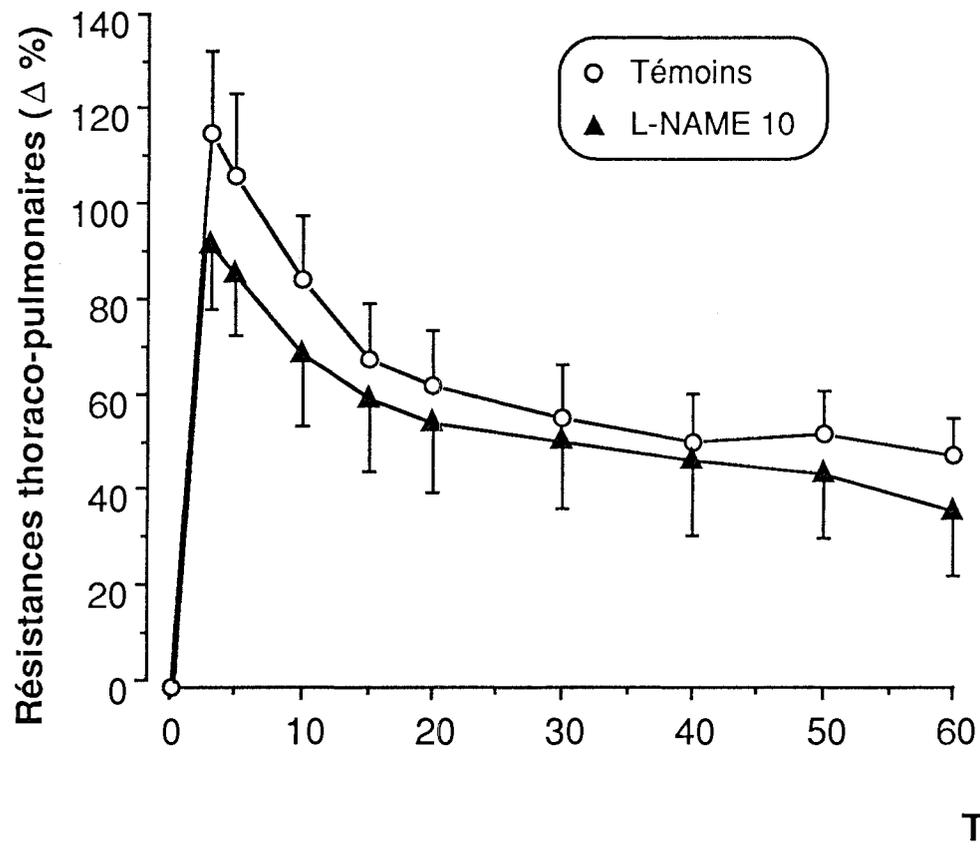
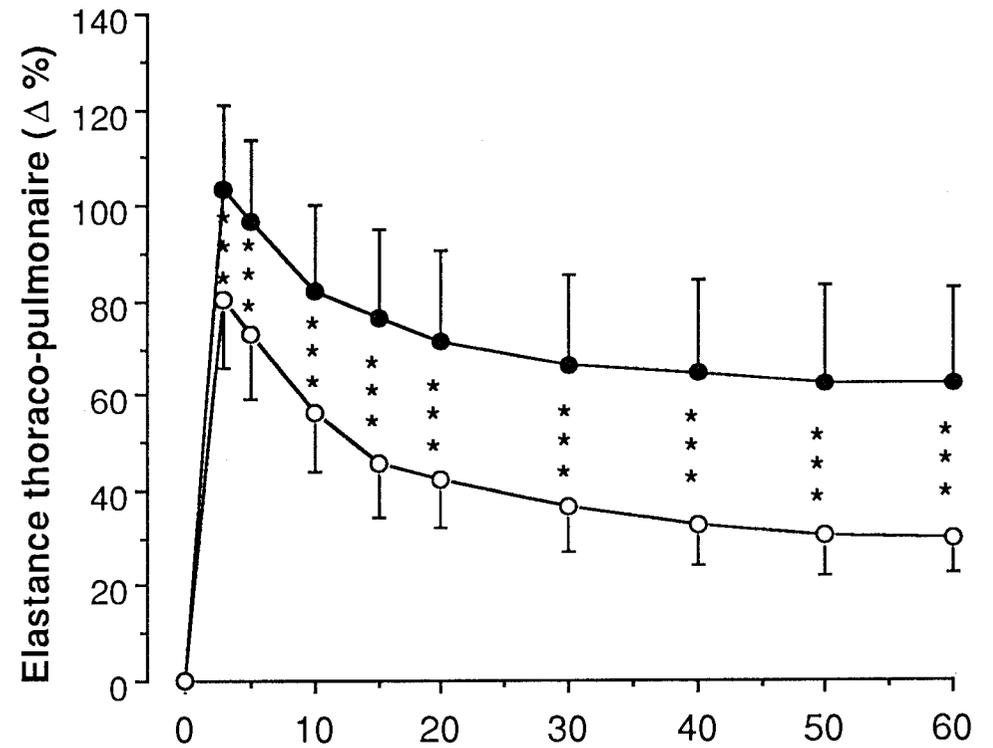
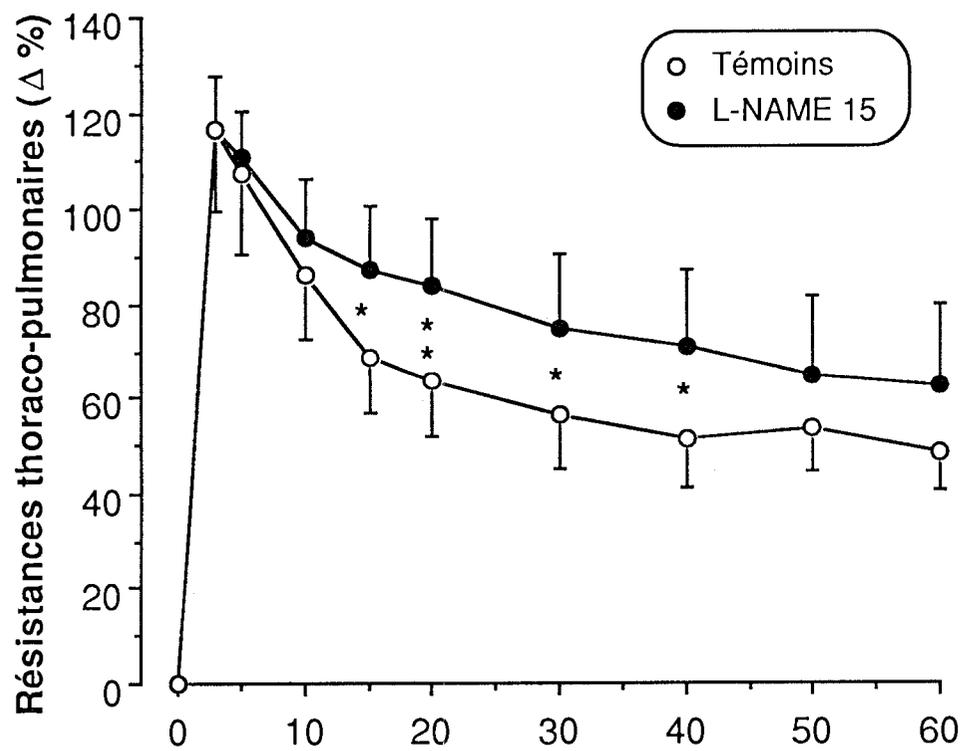


Fig. 19 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de L-NAME 10 mg kg⁻¹



Temps (min)

Fig. 20 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de L-NAME 15 mg kg⁻¹
Mêmes conventions que pour la figure 10.

9.3.2 Correction de l'action du L-NAME par la L-arginine

9.3.2.1 Méthodes

Les expériences sont conduites selon le même protocole. Les animaux (n=6) reçoivent une injection intraveineuse de 15 mg.kg⁻¹ de L-NAME. Cette injection est suivie immédiatement par une perfusion continue d'une solution de L-arginine dans du sérum physiologique (300 mg.kg⁻¹.h⁻¹). L'aérosol d'histamine a lieu comme d'habitude 5 minutes après la fin de l'injection de L-NAME.

9.3.2.2 Résultats

Résistances et élastance thoraco-pulmonaires (figure 21)

L'injection de L-arginine (précurseur de NO) après injection de L-NAME empêche significativement l'augmentation des résistances (Δ Rrs : + 83 %) après l'aérosol d'histamine. L'action est un peu moins marquée sur l'élastance, qui augmente significativement moins par rapport aux valeurs témoins qu'après L-NAME 15 mg.kg⁻¹. Cependant, il persiste une augmentation de l'élastance thoraco-pulmonaire.

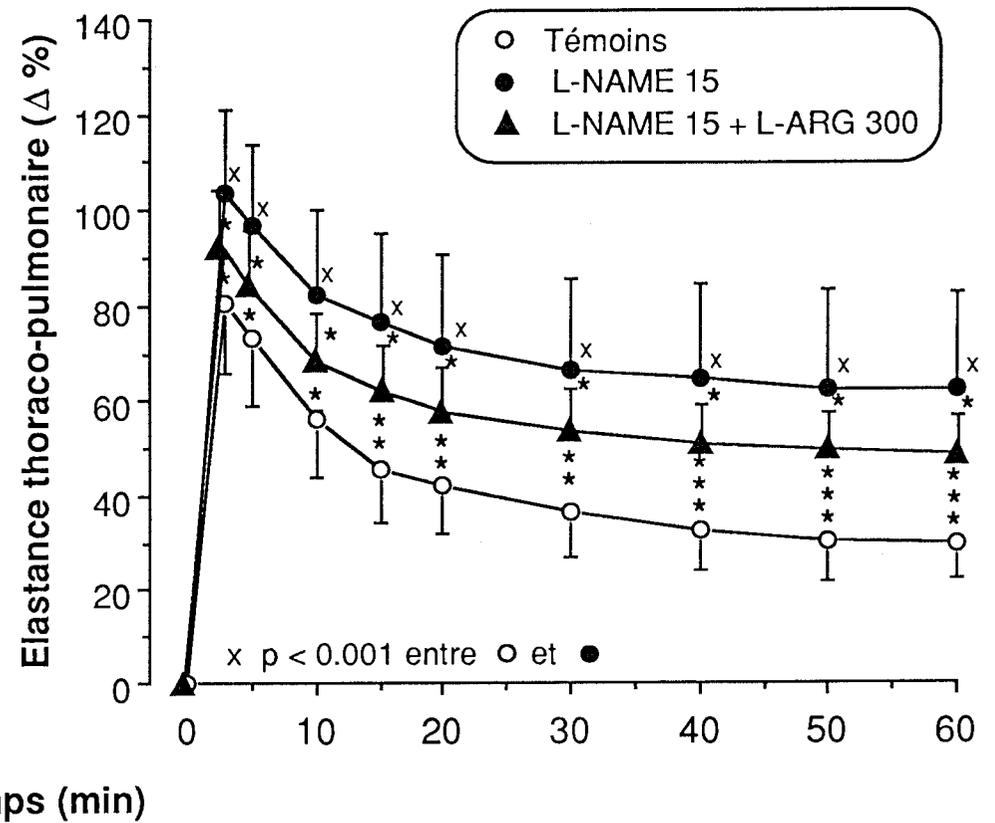
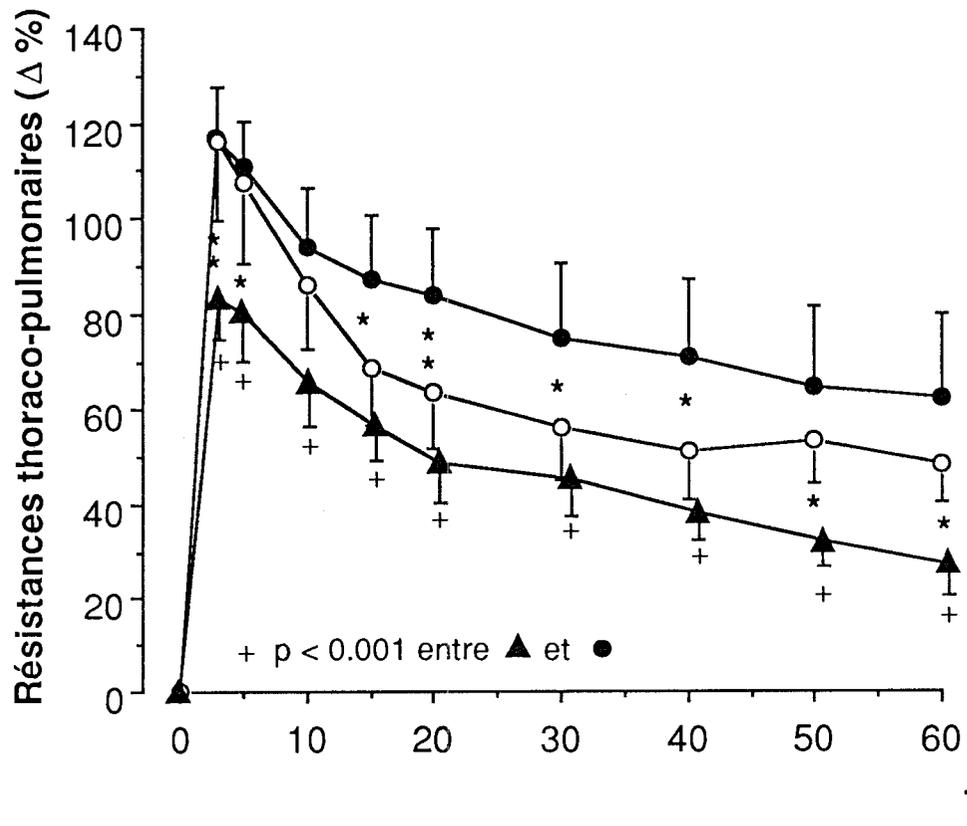


Fig. 21 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de L-NAME 15 mg kg⁻¹ suivie ou non par une perfusion iv de L-arginine (300 mg kg⁻¹ h⁻¹).
Mêmes conventions générales que pour la figure 10.

9.3.3 Générateurs de NO : paramètres hémodynamiques

Il est bien connu que les nitrates induisent une relaxation bronchique par libération de NO. Les vasodilatateurs tels que le glycéryltrinitrate et le nitroprussiate de sodium entraînent la relaxation du muscle lisse des voies aériennes en activant la guanylate cyclase ce qui produit une augmentation des niveaux de GMPc cyclique (Gruetter et coll 1989). Nous avons comparé l'action sur le bronchospasme histaminique de la L-arginine précurseur du NO, et de divers donneurs de NO : S-nitroso-N-acétyl-pénicillamine (SNAP) et SIN-1 métabolite actif de la molsidomine, un autre ester organique nitraté.

9.3.3.1 Méthodes

Les expériences sont conduites comme précédemment avec un protocole identique. Cependant les drogues (et le sérum physiologique pour les témoins) sont données en perfusion iv pendant toute la durée de l'expérience, cette perfusion commence 5 minutes avant l'aérosol d'histamine et se termine 60 minutes après la fin de l'aérosol.

- 6 lapins ont reçu une perfusion de sérum physiologique,
- 6 lapins ont reçu une perfusion de L-arginine (300 mg.kg⁻¹.h⁻¹),
- 6 lapins ont reçu une perfusion de SNAP (1 mg.kg⁻¹.h⁻¹),
- 6 lapins ont reçu une perfusion de SIN-1 (10 mg.kg⁻¹.h⁻¹).

9.3.3.2 Résultats

9.3.3.2.1 Paramètres hémodynamiques (tableau XV)

La pression artérielle n'est pas modifiée chez les témoins et dans le groupe L-arginine 5 minutes après le début de la perfusion. On note une diminution de la pression artérielle dans le groupe SIN-1 et SNAP cinq minutes après le début de la perfusion du

produit et dans les 4 groupes soixante minutes après l'aérosol d'histamine. La fréquence cardiaque n'est pas modifiée statistiquement par l'injection intra-veineuse de générateurs de NO.

9.3.3.2.2 pH et gaz du sang artériel (tableau XVI)

Le pH et les gaz du sang artériel ne sont pas modifiés statistiquement par la ventilation artificielle et les injections intra-veineuses de générateurs de NO. Dix minutes après l'inhalation d'histamine la PaO₂ chute de façon significative dans les 4 groupes vraisemblablement en rapport avec des troubles de la distribution. Soixante minutes après l'aérosol d'histamine, on note une alcalose respiratoire plus marquée dans les groupes témoin et L-arginine.

Tableau XV

Générateurs de NO : Paramètres hémodynamiques

	Avant début de l'injection du produit	5 min après le produit	60 minutes après aérosol d'histamine
Pression artérielle (mmHg)			
Témoins (sérum physiologique)	97,3 ± 6,4	94,0 ± 5,7	*74,3 ± 8,6
SIN-1 (10 mg kg ⁻¹ h ⁻¹)	88,6 ± 3,4	*67,3 ± 14,4	***41,6 ± 4,4
SNAP (1 mg kg ⁻¹ h ⁻¹)	94,8 ± 2,3	**67,0 ± 4,3	**67,5 ± 9,9
L-Arginine (300 mg kg ⁻¹ h ⁻¹)	92,7 ± 4,6	95,0 ± 6,9	*82,3 ± 4,4
Fréquence cardiaque (c/min)			
Témoins	320 ± 17	297 ± 22	305 ± 7
SIN-1	318 ± 9	330 ± 4	306 ± 8
SNAP	327 ± 9	327 ± 10	*291 ± 11
L-Arginine	320 ± 11	315 ± 15	310 ± 13

Valeurs moyennes ± ESM ; n = 6 ; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 par rapport aux valeurs avant l'injection du produit.

Tableau XVI

Générateurs de NO : pH et gaz du sang artériel

	Avant histamine	10 minutes après histamine	60 minutes après histamine
Témoins			
pH	7,427 ± 0,011	7,419 ± 0,034	**7,523 ± 0,027
Paco ₂ kPa (mmHg)	3,5 ± 0,2 (26,3)	3,3 ± 0,2 (24,8)	**2,4 ± 0,1 (18,0)
Pao ₂ kPa (mmHg)	9,6 ± 0,5 (72,0)	**6,9 ± 0,6 (51,8)	9,8 ± 0,6 (73,5)
SIN-1 (10 mg kg⁻¹h⁻¹)			
pH	7,406 ± 0,034	7,338 ± 0,043	7,355 ± 0,040
Paco ₂	3,4 ± 0,1 (25,5)	3,5 ± 0,3 (26,3)	**2,4 ± 0,3 (18,0)
Pao ₂	11,6 ± 0,4 (87,0)	**7,5 ± 0,6 (56,3)	10,4 ± 0,5 (78,0)
SNAP (1 mg/kg-1h-1)			
pH	7,410 ± 0,020	7,378 ± 0,048	7,458 ± 0,069
Paco ₂	3,3 ± 0,1 (24,8)	3,2 ± 0,2 (24,0)	**2,5 ± 0,2 (18,7)
Pao ₂	11,1 ± 0,9 (83,3)	**6,3 ± 0,8 (47,3)	9,4 ± 0,6 (70,5)
L-arginine (300 mg kg⁻¹h⁻¹)			
pH	7,438 ± 0,013	7,486 ± 0,069	*7,519 ± 0,073
Paco ₂	3,3 ± 0,2 (24,7)	2,9 ± 0,4 (21,8)	**2,4 ± 0,2 (18,0)
Pao ₂	10,5 ± 0,8 (78,7)	***5,8 ± 0,7 (43,5)	8,9 ± 0,6 (66,8)

Valeurs moyennes ± ESM ; n = 6 ; *p < 0,05, **p < 0,01 par rapport aux valeurs avant l'aérosol d'histamine.

9.3.3.2.3 Résistances et élastance thoraco-pulmonaires

Il existe une diminution significative des résistances thoraco-pulmonaires après administration des 3 générateurs de NO (L-arginine, SNAP, SIN-1) dès la fin de l'aérosol d'histamine, diminution qui reste effective pendant les 60 minutes de ventilation qui suivent (figures 22, 23 et 24). Le meilleur résultat est obtenu avec la L-arginine ($\Delta Rrs : + 70 \%$), le témoin étant à $+ 120 \%$. En revanche, aucune modification significative n'est observée pour l'élastance avec les trois groupes. On peut même observer une courbe (pour le groupe SIN-1) strictement superposable à celle du groupe-témoin. Si on admet que les résistances pulmonaires totales représentent les voies aériennes centrales, ces résultats suggèrent que le NO a un effet sur la réponse des voies aériennes centrales mais ne joue pas de rôle au niveau des voies aériennes périphériques et/ou au niveau du parenchyme pulmonaire. Cela va à l'encontre des résultats obtenus avec le L-NAME.

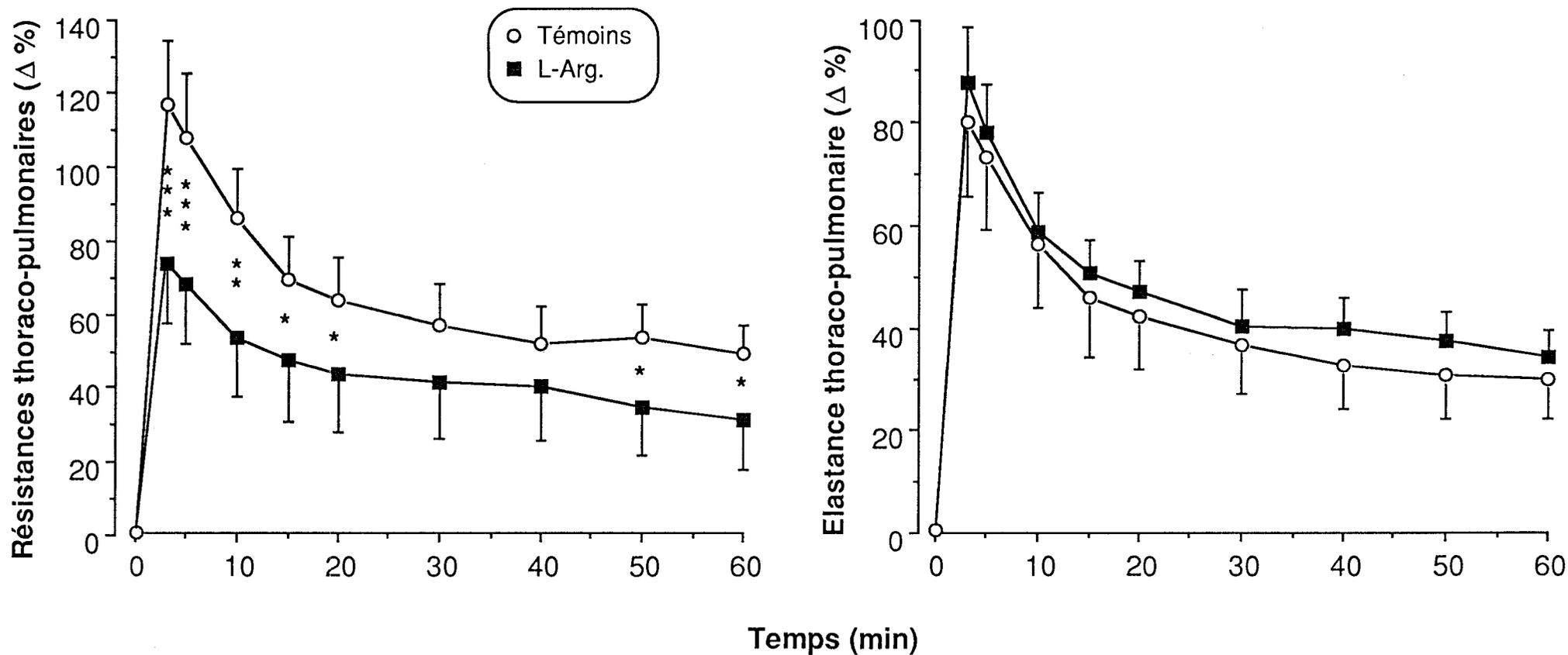


Fig. 22 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine avec perfusion iv de L-arginine $300 \text{ mg kg}^{-1}\text{h}^{-1}$, commencée 5 min avant et poursuivie 60 min après l'aérosol. Mêmes conventions générales que pour la figure 10.

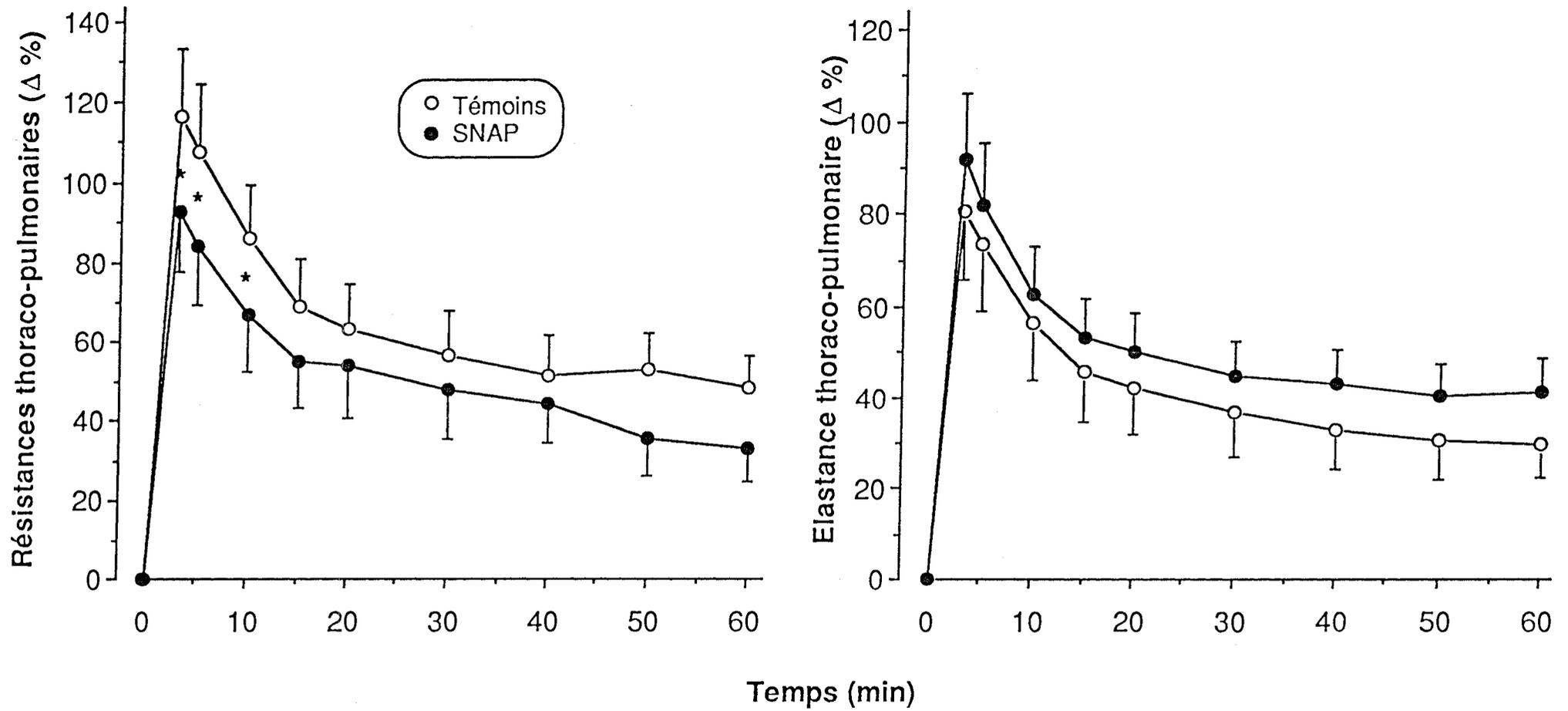


Fig. 23 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine avec perfusion iv de S-nitroso-N-acetylpenicillamine ($1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), commencée 5 min avant et poursuivie 60 min après l'aérosol.

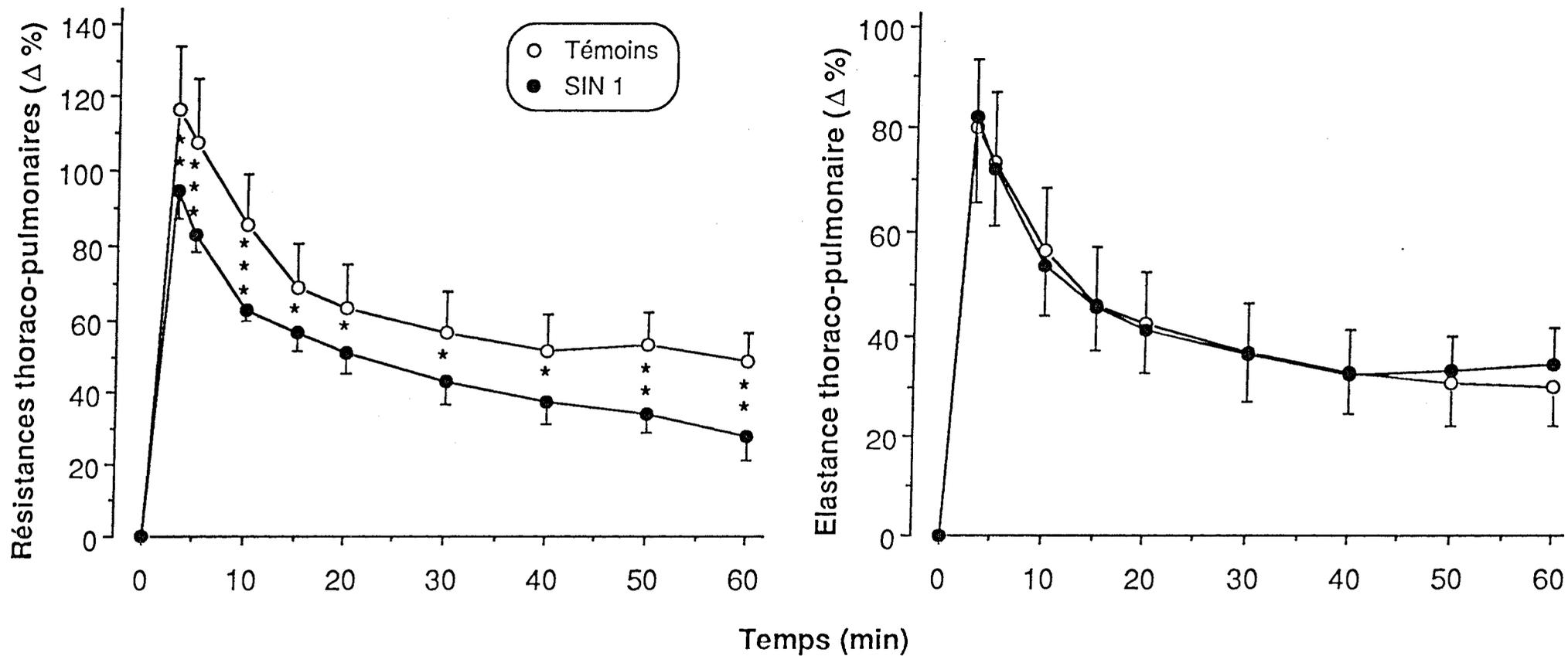


Fig. 24 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine avec perfusion iv de SIN-1 ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) un métabolite actif de la molsidomine.

9.3.4 Inhibition de la NO-synthétase par L-NAME. Action d'un inhibiteur calcique et d'un activateur potassique

Nous avons pensé que des médicaments comme les inhibiteurs calciques ou les activateurs potassiques pouvaient réduire le bronchospasme à l'histamine par l'intermédiaire d'une importante libération de NO. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons inhibé la NO-synthétase avec du L-NAME avant l'utilisation d'un inhibiteur calcique (nicardipine) et d'un activateur potassique (cromakalim).

9.3.4.1 Méthodes

Les expériences sont conduites comme précédemment avec un protocole identique. Cependant, après les prises témoins il existe une injection iv supplémentaire de L-NAME (15 mg.kg⁻¹) pendant 2 minutes. 5 minutes après la fin de l'injection de L-NAME débute l'injection de nicardipine (0,1 mg.kg⁻¹) ou de cromakalim (0,5 mg.kg⁻¹) pendant 2 minutes. 5 minutes après la fin de cette dernière injection survient l'aérosol d'histamine.

9.3.4.2 Résultats

9.3.4.2.1 Paramètres hémodynamiques (tableau XVII)

La pression artérielle et la fréquence cardiaque ne sont pas modifiées statistiquement par les injections intra-veineuses de L-NAME. En revanche, il existe une chute significative de la pression artérielle après injection de l'inhibiteur calcique ou de l'activateur potassique. Cette diminution persiste 60 minutes après l'aérosol d'histamine. La fréquence cardiaque diminue légèrement après nicardipine. Il n'y a pas de modification de la fréquence cardiaque avec le cromakalim.

Tableau XVII

Inhibition de la NO synthétase par L-NAME : action d'un inhibiteur calcique (nicardipine)
et d'un activateur potassique (cromakalim)
Paramètres hémodynamiques

	Avant L-NAME	après	après inhibiteur calcique ou activateur potassique	60 min après aérosol d'histamine
Pression artérielle (mmHg)				
L-NAME 15 mg kg ⁻¹ + nicardipine 0,1 mg kg ⁻¹	94,8 ± 4,3	101,1 ± 3,8	***45,5 ± 4,0	***46,0 ± 7,4
L-NAME 15 mg kg ⁻¹ + cromakalim 0,5 mg kg ⁻¹	95,6 ± 3,1	102,5 ± 2,1	***33,3 ± 5,4	***59,0 ± 4,1
Fréquence cardiaque (c/min)				
L-NAME 15 mg kg ⁻¹ + nicardipine 0,1 mg kg ⁻¹	343,3 ± 17,3	301,7 ± 18,7	*258,3 ± 24,7	264,0 ± 33,7
L-NAME 15 mg kg ⁻¹ + cromakalim 0,5 mg kg ⁻¹	328,3 ± 8,7	306,6 ± 7,6	308,3 ± 14,5	321,6 ± 7,9

Valeurs moyennes ± ESM ; n = 6 ; *p < 0,05, ***p < 0,001 par rapport aux valeurs avant l'injection de L-NAME. Valeurs témoins : voir tableau XIII.

9.3.4.2.2 pH et gaz du sang artériel (tableau XVIII)

Le pH et les gaz du sang artériel ne sont pas modifiés statistiquement par la ventilation artificielle et les injections intra-veineuses de L-NAME + nicardipine ou L-NAME + cromakalim. Dix minutes après l'aérosol d'histamine, le PaO₂ chute dans les deux groupes vraisemblablement en rapport avec des anomalies des rapports ventilation/perfusion. Il y a apparition d'une acidose métabolique dans le groupe L-NAME + nicardipine qui se majore 60 minutes après l'aérosol.

Tableau XVIII

Inhibition de la NO synthétase par L-NAME : action d'un inhibiteur calcique (nicardipine) et d'un activateur potassique (cromakalim). pH et gaz du sang artériel

	avant histamine	10 minutes après histamine	60 minutes après histamine
L-NAME 15 mg kg ⁻¹ + nicardipine 0,1 mg kg ⁻¹			
pH	7,472 ± 0,011	***7,270 ± 0,039	***7,181 ± 0,039
Paco ₂ kPa (mmHg)	3,3 ± 0,1 (24,7)	3,5 ± 0,2 (26,2)	***2,0 ± 0,2 (15,0)
Pao ₂ kPa (mmHg)	10,3 ± 0,9 (77,3)	**6,4 ± 0,6 (48,0)	10,4 ± 0,8 (78,0)
L-NAME 15 mg kg ⁻¹ + cromakalim 0,5 mg kg ⁻¹			
pH	7,447 ± 0,031	7,436 ± 0,032	7,460 ± 0,028
Paco ₂	3,5 ± 0,2 (26,2)	*2,8 ± 0,1 (21,0)	***2,0 ± 0,1 (15,0)
Pao ₂	10,5 ± 0,7 (78,8)	**7,8 ± 0,5 (58,5)	11,2 ± 0,3 (84,0)

Valeurs moyennes ± ESM ; n = 6 ; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 par rapport aux valeurs avant aérosol d'histamine. Valeurs témoins : voir tableau VI.

9.3.4.2.3 Résistances et élastance thoraco-pulmonaires

Le L-NAME ne change pas de façon importante le comportement des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires après nicardipine ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$). On note cependant un retour plus marqué et plus rapide aux valeurs basales (figure 25).

En revanche, le L-NAME supprime totalement l'action du cromakalim ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) sur les résistances thoraco-pulmonaires qui apparaissent plus élevées par rapport à celles des témoins (figure 26) et sont assez comparables aux résistances dans le groupe L-NAME (15 mg.kg^{-1}) (figure 20). L'élastance thoraco-pulmonaire est significativement plus basse et retourne plus rapidement aux valeurs basales en présence de cromakalim plus L-NAME.

9.3.4.2.4 Commentaires

Les inhibiteurs calciques bloquent l'entrée du calcium dans la cellule uniquement par les canaux VOC (Black et Barnes 1990). Ils sont inefficaces vis à vis de la libération de calcium par les stocks intra-cellulaires qui semble être le mécanisme dominant de la contraction de la fibre musculaire lisse des voies aériennes chez l'homme. Chez le lapin, les canaux VOC jouent un rôle prédominant au niveau des grosses bronches. Le L-NAME ne change pas de façon marquée le comportement des résistances après traitement à la nicardipine. En revanche, le L-NAME supprime totalement l'action du cromakalim sur le bronchospasme à l'histamine. En effet, la courbe des résistances thoraco-pulmonaires (L-NAME-cromakalim) est superposable à la courbe L-NAME seule. Enfin, le L-NAME ne supprime pas l'action du cromakalim et de la nicardipine sur les petites voies aériennes ou les canaux VOC mais également d'autres phénomènes doivent intervenir.

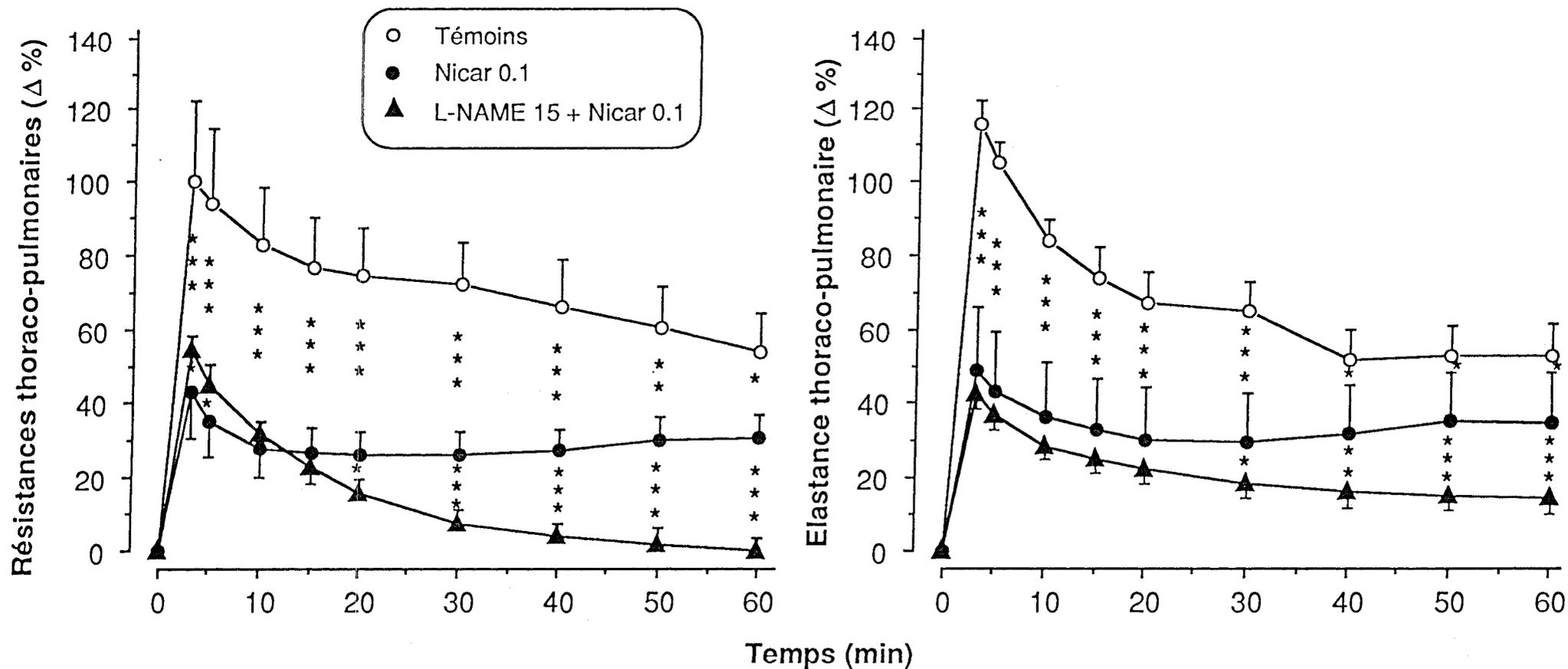


Fig. 25 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après une injection intraveineuse de nicardipine ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) avec ou sans injection iv préalable de L-NAME (15 mg kg^{-1}). Mêmes conventions que pour la figure 10.

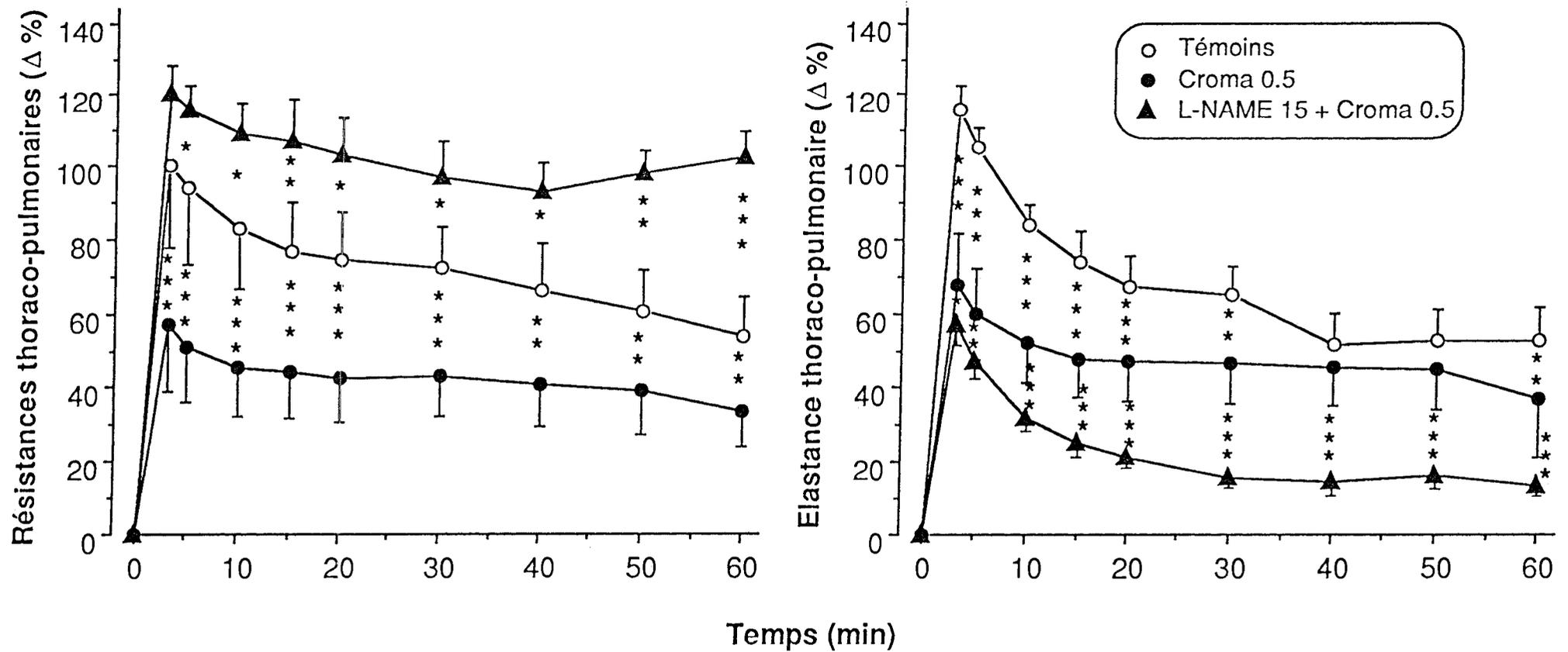


Fig. 26 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après une injection intraveineuse de cromakalim ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$), avec ou sans injection iv préalable de L-NAME (15 mg kg^{-1}).
Mêmes conventions que pour la figure 10.

9.3.5 Rôle des radicaux libres

Dans certaines expériences nous avons recueilli les poumons à la fin de l'expérience pour le dosage des radicaux libres par chimiluminescence.

9.3.5.1 Méthodes

Une première série a été constituée de 9 groupes de 6 lapins.

- témoins avec histamine, témoins sans histamine.
- diazoxide (30 mg.kg⁻¹), nicorandil (2 mg.kg⁻¹), cromakalim (0,5 mg.kg⁻¹), levcromakalim (0,5 mg.kg⁻¹).
- nifédipine (0,15 mg.kg⁻¹), nimodipine (0,2 mg.kg⁻¹) et nicardipine (0,1 mg.kg⁻¹).

Chez ces animaux les radicaux libres oxygénés sont mesurés sur homogénats de poumons prélevés à la fin de l'expérience.

Une deuxième série d'animaux ayant reçu du L-NAME a été étudiée à la fin de l'expérience. 4 groupes de six lapins dont 6 témoins ayant reçu du sérum physiologique iv, 6 lapins ayant reçu iv L-NAME 10 mg.kg⁻¹, 6 lapins ayant reçu L-NAME 15 mg.kg⁻¹ et 6 lapins après injection iv de L-NAME 15 mg.kg⁻¹ ont reçu une perfusion de L-arginine (300 mg.kg⁻¹.h⁻¹) avant, pendant et jusqu'à 60 minutes après l'aérosol d'histamine.

Une dernière série d'animaux (n = 6) a été réalisée en injectant 5 minutes avant l'épreuve à l'histamine 15000 u kg⁻¹ de superoxyde dismutase (Sigma).

9.3.5.2 Mesure des radicaux libres

Une portion du poumon est broyé (1 : 4 W/V) dans une solution tampon qui contient 0,25 M sucrose, 0,05 M HEPES, 1 mM EDTA pH 7,6 à l'aide d'un Polytron®

(Kinematica, Lucerne, Suisse) puis au Potter de Thomas avec un piston en teflon. L'homogénat est centrifugé à 10000 g pendant 12 minutes à 4°C puis le surnageant de nouveau centrifugé à 105000 g pendant une heure. Le culot de microsomes est placé dans 2 ml de solution tampon de phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4, qui contient 20 % de glycérol, 0,1 mM EDTA et ensuite est congelé à -80°C. Les mesures par chimiluminescence sont réalisées pendant 10 minutes à 37°C à l'aide d'un luminomètre 1250 LKB (LKB, Wallac, Turku, Finlande). Pour ce dosage, à 100 μ l de suspension microsomiale (concentration protéique de 2 mg.ml⁻¹) sont ajoutés 1 ml de tampon de réaction (15 mM NaN₃ et 0,66 M Tris, pH 7,4), 20 μ l de 5 mM lucigénine et 100 μ l d'une solution de NADPH (2,5 μ g/ml tampon Tris). La concentration protéique de chaque échantillon est déterminée par la technique de Lowry (Lowry et coll 1951). Les radicaux libres sont exprimés en millivolts (mV).

9.3.5.3 Résultats

9.3.5.3.1 Radicaux libres pulmonaires après inhibiteurs calciques et activateurs potassiques (figure 27)

Les variations de la production des radicaux libres oxygénés (RLO) exprimées comme le débit maximal d'énergie dans la fraction microsomale du poumon semble en corrélation avec le pourcentage d'augmentation des résistances thoraco-pulmonaires 3 minutes après la fin de l'aérosol d'histamine (Δ Rrs 3 min). Lorsque les valeurs pour la nicardipine et pour le témoin sans histamine sont exclues une forte relation négative est observée entre les moyennes de Δ Rrs 3 min et les valeurs moyennes de RLO exprimées en mV (figure 27). Cependant les valeurs particulières des radicaux libres pour les observations individuelles sont en moins bonne corrélation avec Δ Rrs 3 min : $r = -0,538$ ($p < 0,01$). L'absence de relation radicaux libres et Δ Rrs 3 min avec la nicardipine ($z = 0,051$) est peut-être liée aux activités anti-oxydantes de certains inhibiteurs calciques (Mak et Weglicki 1990, Ondrias et coll 1994)

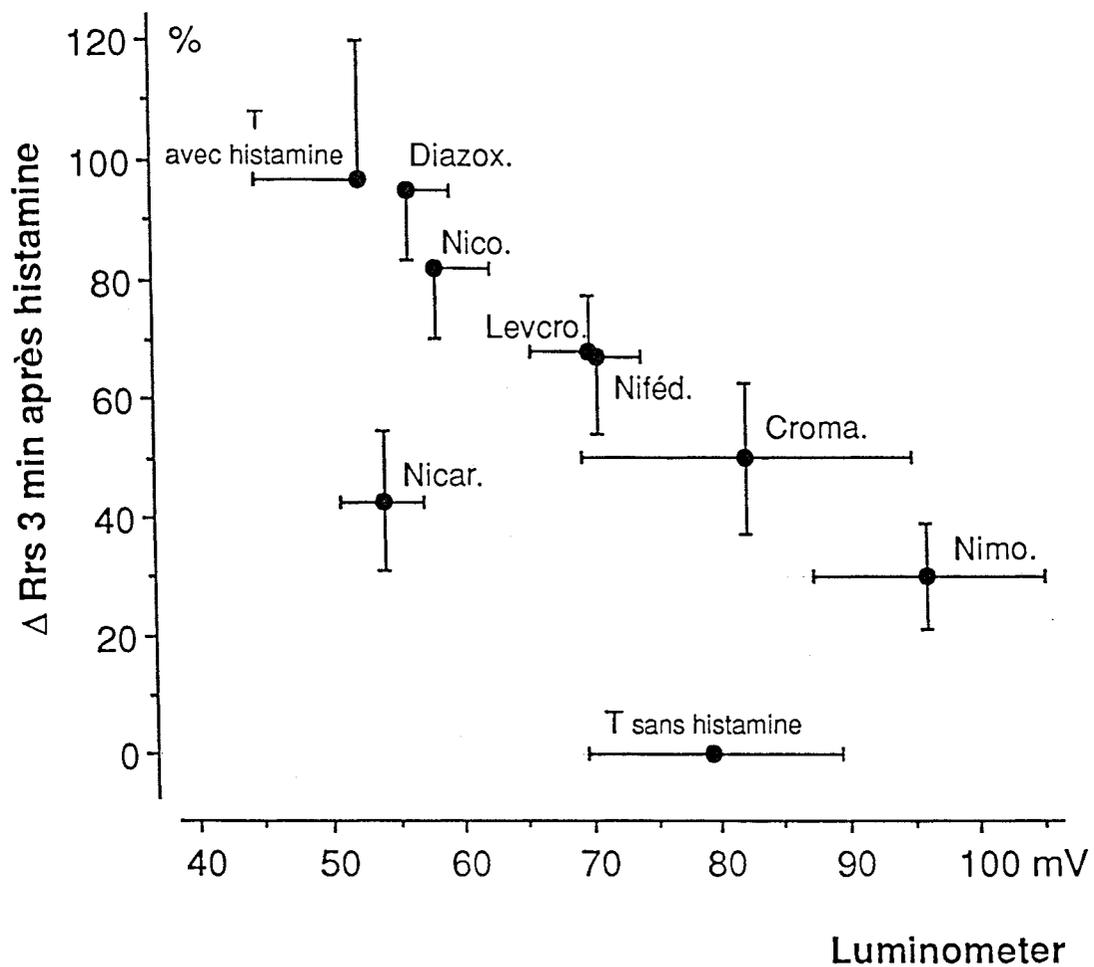


Fig. 27 - Relations entre la production de radicaux libres oxygénés dans les poumons (mV luminomètre) et l'augmentation des résistances thoraco-pulmonaires 3 minutes après aérosol d'histamine (ΔRrs) chez des animaux traités par injection iv d'inhibiteurs calciques (nifédipine, nimodipine, nicardipine) et d'activateurs potassiques (nicorandil, cromakalim, levromakalim et diazoxide) $n = 6$. T = témoins.

9.3.5.3.2 Radicaux libres pulmonaires après L-NAME

(tableau XIX)

Les valeurs des radicaux libres pulmonaires sont augmentées significativement ($p < 0,05$) après le traitement intra-veineux par L-NAME (15 mg.kg^{-1}). La dose plus faible 10 mg.kg^{-1} et l'adjonction d'une perfusion de L-arginine sont sans effets.

9.3.5.3.3 Action de la superoxyde dismutase sur le bronchospasme à l'histamine (figure 28)

La superoxyde dismutase diminue considérablement ($p < 0,001$) l'augmentation des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires induites par un aérosol d'histamine.

Tableau XIX

Radicaux libres oxygénés (exprimés en mV) mesurés au luminomètre dans des poumons après épreuve à l'histamine (n = 6)

Témoins	88.62 ± 9.35
	*
L-NAME 15 mg kg ⁻¹	133.61 ± 17.99
L-NAME 10 mg kg ⁻¹	104.66 ± 8.95
L-NAME 15 mg kg ⁻¹ + L-arginine 300 mg kg ⁻¹ h ⁻¹	93.99 ± 11.64

*p < 0.05

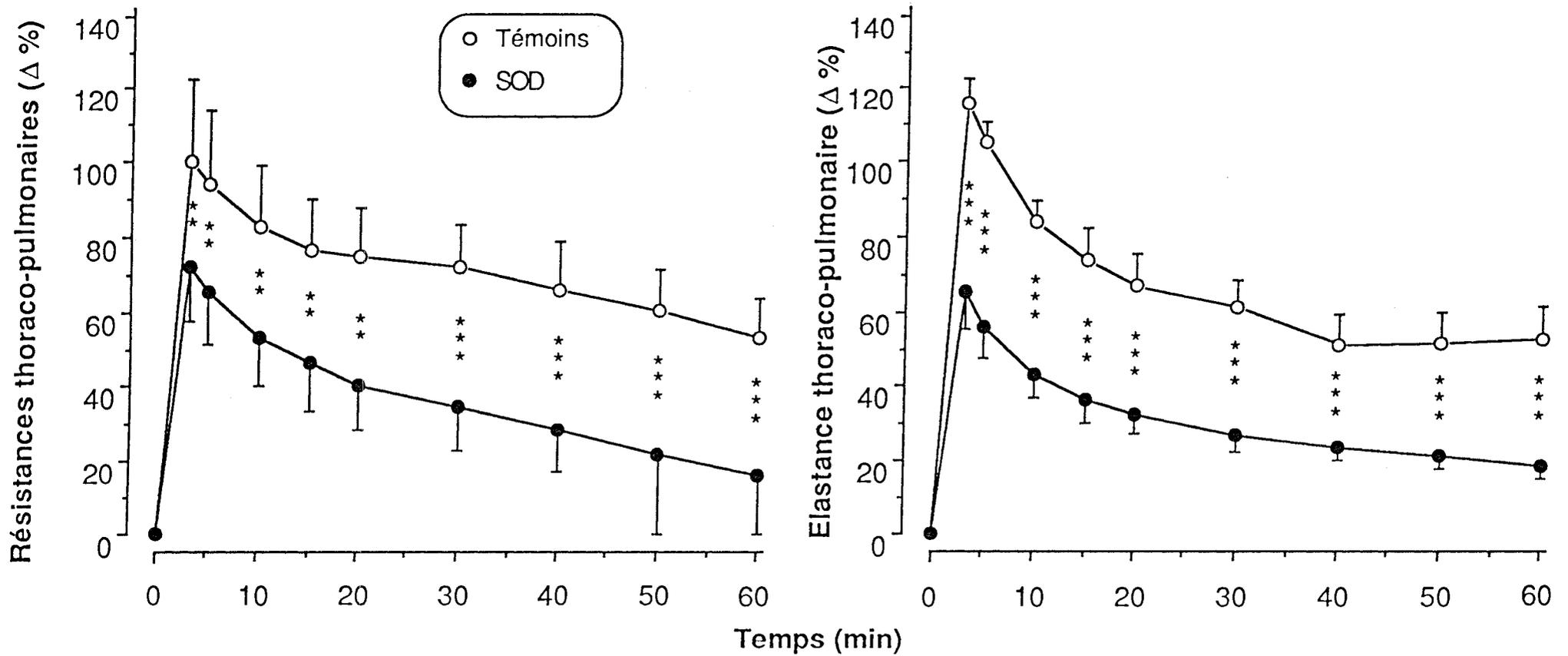


Fig. 28 - Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après une injection intraveineuse de superoxyde dismutase ($15\ 000\ \text{u.kg}^{-1}$).
Mêmes conventions que pour la figure 10.

DISCUSSION

Dans ce travail, nous n'avons étudié qu'une partie des mécanismes de relaxation du muscle lisse des voies aériennes. Nous n'avons abordé ni la voie de l'AMP cyclique (AMPc) la plus importante certainement avec le récepteur β_2 adrénergique ni les dérivés xanthiques qui inhibent la phosphodiesterase avec pour conséquence l'augmentation de l'AMPc.

Nous nous sommes surtout intéressés au rôle du calcium dans la relaxation du muscle lisse des voies aériennes. En effet, puisque la relation entre l'augmentation du calcium intracellulaire (Ca^{2+}_i) et la contraction de la cellule est bien établie, le contraire est généralement supposé : la relaxation du muscle lisse est précédée par une chute du calcium intracellulaire.

Au moins trois mécanismes de retrait du calcium sont capables de diminuer le Ca^{2+}_i dans le muscle lisse des voies aériennes. 1) L'ATPase calcium-magnésium, 2) l'échange sodium-calcium et 3) la prise de calcium par le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries (Knox et Tattersfield, 1995).

A côté de l'AMPc, il est devenu évident que le GMP cyclique (GMPc) produit par la guanylate cyclase soluble est un second messenger relaxant le muscle lisse des voies aériennes. Cette guanylate cyclase soluble est activée par le monoxyde d'azote (NO) et le groupe nitrate des vaso/bronchodilatateurs. C'est également une guanylate cyclase qui assure les effets bronchodilatateurs du peptide atrial natriurétique.

Quoi qu'il en soit, l'activation des canaux potassiques activés par le calcium (canaux maxi- K^+) et la captation du calcium par les organites internes de la cellule semblent les plus importants mécanismes pour la relaxation du muscle lisse des voies aériennes.

Nous avons donc étudié les drogues actives sur le transport de l'ion calcium à travers la membrane cellulaire.

Tout d'abord les **inhibiteurs calciques** : les antagonistes des canaux calciques dépendants du voltage comme le vérapamil, la nicardipine, la nifédipine inhibent la réponse contractile aux agents dépolarisants et à divers spasmogènes comme l'histamine. Nous avons comparé les effets de ces drogues *in vivo* à la dose maximale tolérable en

fonction de leur action cardio-vasculaire. On sait qu'*in vitro* les effets de ces drogues sont généralement modestes sur les muscles lisses des voies aériennes, même à fortes concentrations. Cela est peut-être lié au fait que la contraction initiale du muscle lisse des voies aériennes est due à la libération de calcium à partir des stocks internes, plutôt que par l'influx de calcium. Nous avons également montré que le blocage du système NO-GMP cyclique par le L-NAME n'entraîne pas d'importantes modifications dans la réduction du bronchospasme à l'histamine par la nicardipine.

Nous avons ensuite étudié les **activateurs potassiques** : au niveau des voies aériennes les deux sortes de canaux potassiques intéressant la relaxation du muscle lisse des voies aériennes sont les canaux potassiques activés par le calcium (canaux maxi-K⁺) et les canaux potassiques régulés par l'ATP.

Les canaux **maxi-K⁺** ont une large conductance et sont activés par le calcium et inhibés par la charybdotoxine. Dans la trachée de lapin, ces canaux sont activés par une protéine kinase dépendant de l'AMPC. Ils se rencontrent dans le muscle lisse des voies de plusieurs espèces y compris l'homme. Ces canaux pourraient avoir un rôle dans la relaxation du muscle lisse des voies aériennes avec médiation par AMPC et GMPc.

Les **canaux potassiques sensibles à l'ATP** s'ouvrent en réponse à la réduction de l'ATP et sous l'effet des activateurs potassiques (nicorandil, cromakalim) et sont bloqués par les sulfonylurées (glibenclamide). Les activateurs potassiques sont très efficaces pour réduire le tonus spontané du muscle lisse des voies aériennes humaines mais sont moins efficaces pour inverser une contraction par l'intermédiaire d'un récepteur.

Les mécanismes expliquant la relaxation des muscles lisses des voies aériennes par les activateurs potassiques sont encore incertains. Ils incluent vraisemblablement :

- 1) une hyperpolarisation de la membrane avec réduction de l'influx du calcium par les canaux calciques dépendants du voltage ;
- 2) une activation de la Na⁺/K⁺ ATPase entraînant une diminution du Na⁺ intracellulaire et par voie de conséquence un efflux de Ca²⁺ par échange Na⁺/Ca²⁺ ;

3) une possible régulation de la libération du calcium intra-cellulaire (Knox et Tattersfield 1995) ;

4) l'effet du L-NAME, un inhibiteur de la NO synthétase, empêchant l'action relaxante sur le bronchospasme des activateurs potassiques laisserait supposer une action par l'intermédiaire du monoxyde d'azote (alors que les inhibiteurs calciques agissent vraisemblablement sans le relais du NO).

Nous avons étudié divers activateurs potassiques et comparé leurs effets sur le bronchospasme expérimental à l'histamine à la dose maximale tolérable en fonction de leur action cardio-vasculaire. Nous avons pu constater qu'à la dose maximale tolérable *in vivo* chez le lapin, les activateurs potassiques sont moins puissants sur le bronchospasme à l'histamine que les inhibiteurs calciques dihydropyridines.

Ce travail a été réalisé avec un modèle expérimental simple. Les animaux sont curarisés et ventilés artificiellement afin d'éliminer les variations des résistances pulmonaires totales issues des variations du flux respiratoire. La bonne standardisation du poids des lapins a permis le réglage constant du volume courant, de la fréquence respiratoire et la ventilation toujours adéquate a ainsi maintenu un pH et une P_{aCO_2} normaux.

L'utilisation des inhibiteurs calciques et des activateurs potassiques par voie veineuse, entraîne une forte hypotension systémique que nous avons acceptée jusqu'à la valeur de 60% inférieure à la norme. Cette hypotension aiguë est probablement à l'origine d'une importante décharge de catécholamines endogènes qui se fixant sur les récepteurs β_2 bronchiques peuvent entraîner une certaine relaxation bronchique. Mais ce phénomène doit être relativisé car tous les inhibiteurs calciques et les activateurs potassiques utilisés qui entraînent la même hypotension sont loin d'avoir la même activité sur le tonus bronchique. Ainsi le vérapamil, le nicorandil et le diazoxide sont sans action. De plus, l'induction et la poursuite de l'anesthésie au thiopental entraînent une diminution de la concentration plasmatique de noradrénaline alors que l'adrénaline ne varie pas (Joyce et coll 1983). D'un autre côté, l'anesthésie au thiopental peut entraîner un bronchospasme par libération d'histamine avec une certaine fréquence (Hirschman et coll 1985). Ces

facteurs de confusion pourraient relativiser la portée de nos résultats, mais ils semblent dans la réalité, particulièrement modérés.

La P_{aO_2} chute significativement après administration de l'aérosol d'histamine, dans les groupes avec bronchospasme peu influencé (groupe contrôle et groupe activateur potassique) vraisemblablement en rapport avec des altérations des rapports ventilation/perfusion. La légère chute du pH pendant l'expérience révèle une acidose métabolique. Dans le groupe contrôle, une légère acidose respiratoire était présente dix minutes après la fin de l'aérosol d'histamine.

Les mesures de mécanique ventilatoire n'ont pas été précédées par des manoeuvres d'hyperinsufflation pulmonaire, comme cela est usuellement réalisé dans de telles études afin de standardiser les volumes pulmonaires (Romero et Ludwig 1991). Nous ne l'avons pas réalisé pour deux raisons ; d'une part nous ne voulions pas interférer avec la mécanique ventilatoire à partir du moment où les médicaments étaient administrés et jusque 60 minutes après la fin de l'aérosol et d'autre part l'hyperinsufflation modifie le tonus bronchomoteur (Nadel et Barnes 1961). Un désavantage à ce choix fut que l'élastance thoraco-pulmonaire avait tendance à augmenter progressivement chez les animaux non soumis à l'histamine (figure 29). Cette dérive, non observée pour les résistances thoraco-pulmonaires, reflète probablement les variations temporelles pulmonaires de la tension de surface et/ou l'apparition de micro-atélectasies. Les mesures des résistances et de l'élastance pulmonaires totales sont effectuées toutes les minutes par régression linéaire multiple à partir des mesures de pression d'insufflation et de débit (Romero et Ludwig 1991, Bates et coll 1989). Les valeurs des résistances et de l'élastance par conséquent reflètent l'ensemble du système respiratoire. Comme l'histamine ne modifie vraisemblablement pas les propriétés mécaniques de la paroi thoracique, les variations observées de la mécanique ventilatoire correspondent à une diminution du calibre des voies aériennes et à l'apparition de micro-atélectasies.

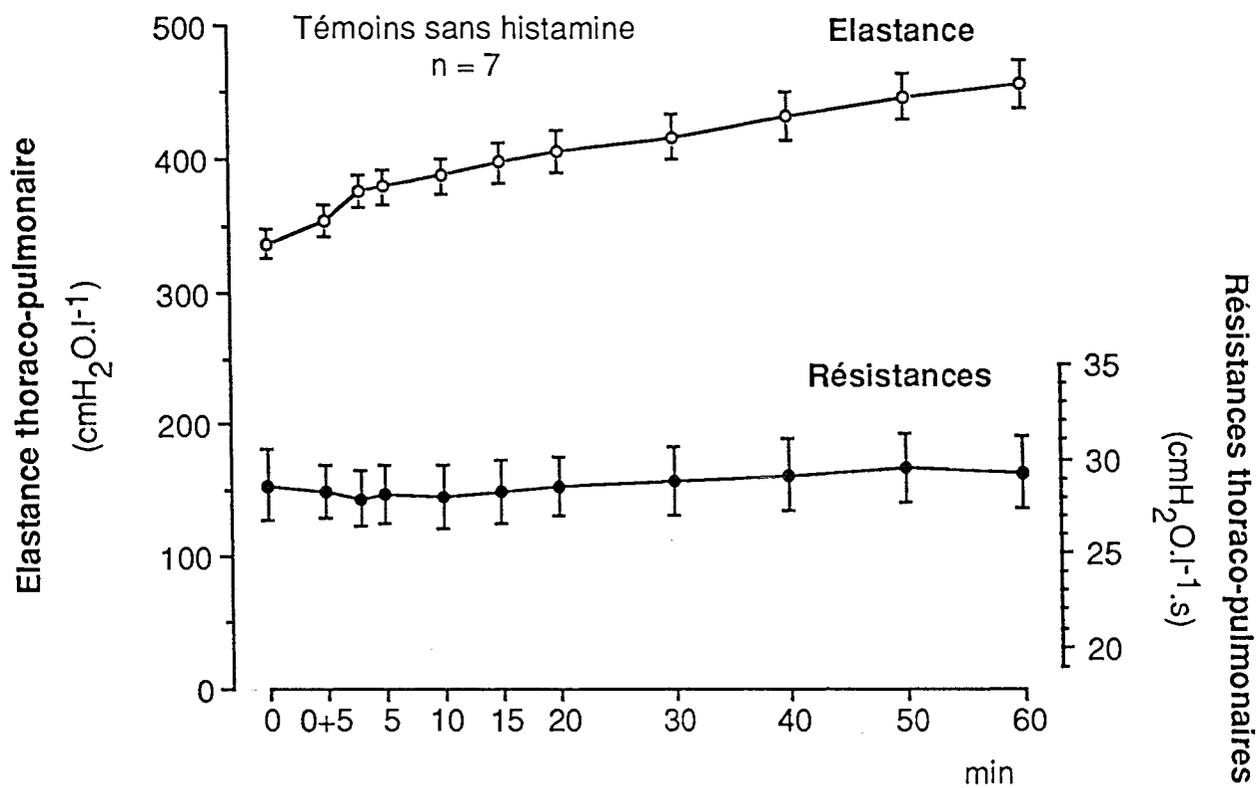


Fig. 29 - Témoins sans histamine chez des lapins, anesthésiés, curarisés et ventilés artificiellement. L'élastance thoraco-pulmonaire augmente pendant les 60 minutes d'observation, alors que les résistances thoracopulmonaires restent constantes. Entre les temps 0 et 0 + 5 : injection de 2 ml de sérum physiologique iv.

Elles peuvent également rendre compte des variations des propriétés visco-élastiques du tissu pulmonaire : plusieurs études ont montré que l'injection d'histamine peut augmenter considérablement la résistance et l'élastance du tissu pulmonaire (Romero et Ludwig 1991, Bates et Peslin 1993, Lutchen et coll 1994). L'effet de l'histamine a également été démontré sur une languette de parenchyme pulmonaire (Fredberg et coll 1993). Dans des conditions similaires, et en supposant un ratio résistance/élastance du tissu pulmonaire inchangé, Dewachter et coll (1992) ont estimé que le tissu pulmonaire pouvait être entièrement responsable de l'augmentation résiduelle des résistances 60 minutes après la fin de l'aérosol. Le modèle similaire de variation des résistances et de l'élastance après aérosol d'histamine, étudié ici, suggère aussi que le tissu contribue pour une part substantielle à la réponse.

Les effets des radicaux libres dans le système bronchique ont été étudiés antérieurement (Katsumata et coll 1990, Lansing et coll 1993). Quoi qu'il en soit, un rapport négatif entre la réponse bronchique et les radicaux libres (figure 27) n'a pas été observé, à notre connaissance, à ce jour. Comme les mesures de radicaux libres ont été réalisées dans du poumon entier, il semble que ce phénomène soit lié principalement au parenchyme pulmonaire. L'implication des bronches est possible, bien que moins importante. Ainsi, l'augmentation des radicaux libres dans le tissu pulmonaire n'est pas un phénomène général dû à l'inhalation d'histamine. Il n'y a pas d'augmentation après traitement par la nicardipine ou dans le groupe-témoin avec aérosol d'histamine. Cependant dans le groupe-témoin sans aérosol d'histamine, les radicaux libres sont relativement augmentés. L'augmentation des radicaux libres avec certains médicaments qui atténuent le bronchospasme à l'histamine semble paradoxale. En revanche, après injection de 15000 U.kg⁻¹ de superoxyde dismutase (piégeur de radicaux libres), le bronchospasme est atténué de 30 % (figure 28).

L'augmentation des radicaux libres dans le tissu pulmonaire est-elle liée à l'importance de l'activité anti-bronchospastique de ces médicaments, est-ce une réaction contre cette activité ? Ceci pourrait être suggéré par le rapport étroit entre les variations des résistances pulmonaires totales et les radicaux libres du poumon pour les groupes

nicorandil, levromakalim, cromakalim et nimodipine (figure 28). Le manque de relation entre radicaux libres et résistances pulmonaires totales avec la nicardipine est peut être lié à l'activité anti-oxydante puissante de cet inhibiteur calcique (Mak et Weglicki 1990, Ondrias et coll 1994).

Les résultats de mécanique ventilatoire suggèrent que les variations des résistances pulmonaires totales après histamine représentent les altérations du calibre des voies aériennes et des propriétés visco-élastiques du tissu pulmonaire. Les inhibiteurs calciques nimodipine et nicardipine sont plus efficaces vis à vis du bronchospasme que les activateurs potassiques testés.

Chez l'homme en revanche, les activateurs des canaux potassiques semblent plus efficaces que les inhibiteurs calciques dans le traitement de l'asthme, dans la mesure où ils inhibent la libération de calcium par les stocks intra-cellulaires : mécanisme dominant par lequel des spasmogènes entraînent la contraction de la fibre musculaire lisse des voies aériennes mais un autre élément qu'il faut prendre en considération est la stimulation de la forme constitutive de la NO-synthétase par une augmentation intra-cellulaire de calcium des cellules épithéliales après stimulation du récepteur (figure 1). En effet, l'émission de NO stimule la guanylate cyclase qui mène à la production de GMPc dans la fibre musculaire lisse. Le GMPc entraîne une diminution de la concentration intra-cellulaire de calcium par divers mécanismes (Ahlner et coll 1991). Ceci résulte en une relaxation ou une suppression de la contraction (figure 1). Dans cette étude, les résultats suggèrent que l'oxyde nitrique a un effet modéré sur la réponse des grosses bronches à l'histamine mais joue un rôle dans la réponse des voies aériennes périphériques et/ou du parenchyme pulmonaire, avec une importante augmentation de l'élastance. Cet effet du NO a été suggéré dans les travaux précédents. Chez des cobayes anesthésiés, ventilés artificiellement et immunisés vis à vis de l'ovalbumine, une épreuve avec un aérosol d'ovalbumine provoque une augmentation de la pression d'insufflation. Le L-NAME, inhibiteur de la synthèse du NO endogène, accroît la réponse, mais cette potentialisation est prévenue par du NO dans l'air inhalé (Persson et Gustafsson 1993). L'aérosol de L-NAME augmente les résistances pulmonaires du cobaye après injection intra-veineuse

d'histamine, effet inhibé par un aérosol de L-arginine (Nijkamp et coll 1993). Il a été suggéré que le NO se comportait comme un neurotransmetteur endogène du NANCi chez l'homme (Belvisi et coll 1992). En contraste avec notre étude, Högman et coll (1993a) n'ont pas observé d'effet du NO sur la compliance du lapin. Dans leur étude, la pression élastique était mesurée à la fin d'une occlusion des voies aériennes d'une durée de 2 secondes, si bien que leur compliance était probablement légèrement influencée par la distribution des gaz et correspond plus à l'élasticité du tissu pulmonaire qu'à notre élastance dynamique. En combinant leurs résultats et les nôtres, on se rend compte que le NO influence la réponse à l'histamine des voies aériennes périphériques et centrales mais pas de l'élasticité du tissu pulmonaire. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus *in vitro* par Gruetter et coll (1989) qui montrait que le glycéryl trinitrate et le nitroprussiate de sodium relachaient les voies aériennes bovines précontractées par du carbachol, mais sont moins efficaces pour les petites voies aériennes.

Le rôle du NO dans le bronchospasme semble largement démontré mais le rôle éventuel des radicaux libres est moins connu. Nous avons observé une augmentation dose-dépendante des radicaux libres dans le parenchyme pulmonaire du lapin traité par L-NAME. On sait que les radicaux libres contribuent au bronchospasme et à l'hyperréactivité bronchique (Katsumata et coll 1990).

CONCLUSION

Ces résultats suggèrent que les augmentations observées des résistances pulmonaires totales correspondent à des modifications du calibre des voies aériennes et des propriétés visco-élastiques du tissu pulmonaire. La nicardipine et la nimodipine semblent avoir l'action la plus marquée sur la réactivité des voies aériennes. Certains inhibiteurs calciques, rapidement écartés dans le passé, pourraient avoir des applications dans les traitements à long terme plus particulièrement chez des patients hypertendus. En outre, de nouveaux activateurs des canaux potassiques (Ishizawa et coll 1994) qui ont une activité sélective vis à vis des voies aériennes de cobaye, pourraient être testés dans l'asthme. Enfin, le rôle du monoxyde d'azote dans la modulation du bronchospasme à l'histamine a été démontré par blocage de la NO-Synthétase (L-NAME). Le NO a un effet discret sur les voies aériennes centrales et joue surtout un rôle dans la réponse à l'histamine des voies aériennes distales ou du parenchyme pulmonaire. Ainsi, l'épithélium pulmonaire et le muscle lisse pourraient sécréter du NO *in situ* (Barnes 1993a). Il semble, de plus, très probable, que l'activateur potassique cromakalim soit actif également par le truchement du monoxyde d'azote. Il est possible enfin que les manifestations du bronchospasme soient également liées à l'augmentation des radicaux libres du parenchyme pulmonaire.

La pharmacologie du muscle lisse des voies aériennes est complexe en raison de ses multiples facettes : récepteurs, canaux ioniques et mécanismes complexes impliqués dans les réponses contractiles et relaxantes. Il y a donc de nombreux sites potentiels pour que des agents pharmacologiques puissent produire la relaxation du muscle lisse des voies aériennes.

A ce jour, les inhibiteurs calciques ou les activateurs potassiques se sont révélés des agents thérapeutiques médiocres au niveau des bronches. Une plus grande spécificité de ces médicaments pour le muscle lisse des voies aériennes s'avère nécessaire. Ceci se réalisera peut-être dans un avenir proche.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

ABRAHAM WM, WANNER A, STEVENSON JS, CHAPMAN GA. The effect of an orally active leukotriene D4/E4 antagonist, LY 171883, on antigen-induced airway responses in allergic sheeps. *Prostaglandins*, 1986 ; **31** : 457-467.

ADELMAN JP, SHEN KZ, KAVANAUGH M, LAGRUTTA A, BOND CT, NORTH RA. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron*, 1992 ; **9** : 209-216.

ADELSTEIN RS, EISENBERG E. Regulation and kinetics of the actin-myosin ATP interaction. *Ann Rev Biochem*, 1980 ; **49** : 921-956.

ADVENIER C, CERRINA J, DUROUX P, FLOCH A, RENIER A. Effects of five different organic calcium antagonists on guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol*, 1984 ; **82** : 727-733.

ADVENIER C, MEYER P. *Pharmacologie cardio-vasculaire et respiratoire*, 1992, Hermann Paris, 1 vol 458p.

AHLNER J, ANDERSSON RGG, TORFGARD K, AXELSSON K. Organic nitrate esters : clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol Rev*, 1991 ; **43** : 351-412.

AHMED T, KIM CS, DANTA I. Inhibition of antigen-induced bronchoconstriction by a new calcium antagonist, gallopamil : comparison with cromalym sodium. *J Allergy Clin Immunol*, 1988 ; **81** : 852-858.

AKASAKA K, KONNO K, ONO Y, MUE S, ABE C, KUNAGAI M, ISE T. Electromyographic study of bronchial smooth muscle in bronchial asthma. *Tokoku J Exp Med*, 1975 ; **117** : 55-59.

ALLEN SL, BOYLE JP, CONTIJO J, FOSTER RW, MORGAN GP, SMALL RC. Electrical and mechanical effects of BRL 34915 in guinea pig isolated trachealis. *Br J Pharmacol*, 1986 ; **89** : 395-405.

ANDERSSON KE, ANDERSSON PO, FOVAEUS M, HEDLUND H, MALMGREN A, SJÖGREN C. Effects of pinacidil on bladder muscle. *Drugs*, 1988 ; **36** (suppl 7) : 41-49.

ANDERSSON RG, GRUNDSTROM N. The excitatory non cholinergic non adrenergic nervous system of the guinea-pig airways. *Eur J Respir Dis*, 1983 ; **131** : 141-157.

ANGERSBACH D, NICHOLSON CD. Enhancement of muscle blood cell flux and pO₂ by cromakalim (BRL 34915) and other compounds enhancing membrane K⁺ conductance, but not by Ca²⁺ antagonists or hydralazine, in an animal model of occlusive arterial disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1988 ; **337** : 431-436.

ASHCROFT FM, RORSMAN P. ATP-sensitive K⁺ channels : A link between β-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem Soc Trans*, 1990 ; **18** : 109-111.

ASSREUY J, CUNHA FQ, LIEW FY, MONCADA S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 1993 ; **108** : 833-837.

BAI TR. Beta 2 adrenergic receptors in asthma : a current perspective. *Lung*, 1992 ; **170** : 125-141.

BAIRD A, HAMILTON T, RICHARDS D, TASHER T, WILLIAMS AJ. Cromakalim, a potassium channel activator, inhibits histamine induced bronchoconstriction in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 1988 ; **25** : 114.

BARNES PJ, WILSON NM, BROWN MJ. A calcium antagonist nifedipine modifies exercise-induced asthma. *Thorax*, 1981 ; 36 726-730.

BARNES PJ. Neural control of human airways in health and disease. *Am Rev Respir Dis*, 1986 ; **134** : 1289-1314.

BARNES PJ. Airway receptors. In : Drug therapy for asthma. Eds J W Jenne and S Murphy M Dekker Inc New York, USA. 1987 ; pp 67-95.

BARNES PJ. A new approach to the treatment of asthma. *N Engl J Med*, 1989 ; **321** : 1517-1527.

BARNES PJ. Neural control of airway function : new perspectives. *Molec Aspects Med*, 1990 ; **11** : 351-423.

BARNES PJ. Biochemistry of asthma. *Trends Biochem Sci*, 1991a ; **16** : 365-369.

BARNES PJ, BARANIUK JN, BELVISI MG. Neuropeptides in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis*, 1991b ; **144** : 1391-1399.

BARNES PJ. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev*, 1992 ; **72** : 699-729.

BARNES PJ. Nitric oxide and airways. *Eur Respir J*, 1993a ; **6** : 163-165.

BARNES PJ, BELVISI MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*, 1993b ; **48** : 1034-1043.

BARON CB, CUNNINGHAM M, STRAUSS JF, COBURN RF. Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidyl inositol metabolism. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1984 ; **81** : 6899-6903.

BATES JHT, SHARDONOFKY F, STEWART DE. The low-frequency dependence of respiratory system resistance and elastance in normal dogs. *Respir Physiol*, 1989 ; **78** : 369-382.

BATES JHT, PESLIN R. Acute pulmonary response to intravenous histamine at fixed lung volume in dogs. *J Appl Physiol*, 1993 ; **75** : 405-411.

BEAN BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. *J Gen Physiol*, 1985 ; **86** : 1-31.

BEASLEY R, ROCHE WR., ROBERTS JA., HOLGATE ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis*, 1989 ; **17** : 806-817.

BELVISI MG, STRETTON CD, YACOB M, BARNES PJ. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol*, 1992 ; **210** : 221-222.

BENHAM CD, TSIEN R.W. A novel receptor-operated Ca^{2+} permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature*, 1987 ; **328** : 275-278.

BENTLEY AM, MAESTRELLI P, SAETTA M, FABBRI LM, ROBINSON DS, BRADLEY BL, JEFFERY PK, DURHAM SR, KAY AB. Activated T-lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1992 ; **89** : 821-829.

BLACK JL, MARTHAN R, ARMOUR CL, JOHNSON PRA. Sensitization alters contractile responses and calcium influx in human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol*, 1989 ; **84** : 440-447.

BLACK JL, BARNES PJ. Potassium channels and airway function : new therapeutic prospects. *Thorax*, 1990a ; **45** : 213-218.

BLACK JL, ARMOUR CL, JOHNSON PRA, ALOUAN LA, BARNES PJ. The action of a potassium channel activator, BRL 38227 (lemakalim), on human airway smooth muscle. *Am Rev Resp Dis*, 1990b ; **142** : 1384-1389.

BOLTON TB. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev*, 1979 ; **59** : 606-718.

BORSON DB, GRUENER T. Glucocorticoids induce neutral endopeptidase in transformed human tracheal cells. *Am J Physiol*, 1991 ; **260** : L83-L89.

BOSSE E, REGULLA S, BIEL M, RUTH P, MEYER HE, FLOCKERZI V, HOFMANN F. The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS lett*, 1990 ; **267** : 153-156.

BOUSHEY HA, HOLTZMAN MJ, SHELLER JR, NADEL JA. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*, 1980 ; **121** : 389-413.

BOUSQUET J, CHANEZ P, LACOSTE JY, BARNEON G, GHAVANIAN N, ENANDER I, VENGE P, AHLSTEDT S, SIMONY-LAFONTAINE J, GODARD P, MICHEL FB. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*, 1990 ; **323** : 1033-1039.

BOUSQUET J, CHANEZ P, LACOSTE JY, ENANDER I, VENGE P, PETERSON C, AHLSTEDT S, MICHEL FB, GODARD P. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1991 ; **88** : 649-660.

BRADLEY B, AZZAWI M, JACOBSON M, ASSOEFI B, COLLINS JV, IRANI AM, SCHWARTZ LB, DURHAM SR, JEFFERY PK, KAY AB. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*, 1991 ; **88** : 661-674.

BRAY KM, NEWGREEN DT, SMALL RC, SOUTHERTON JS, TAYLOR SG, WEIR SW, WESTON AH. Evidence that the mechanism of the inhibitory action of pinacidil in rat and guinea-pig smooth muscle differs from that of glyceryl trinitrate. *Br J Pharmacol*, 1987 ; **91** : 421-429.

BRAY KM, QUAST U. A specific binding site for K⁺ channel openers in rat aorta. *J Biol Chem*, 1992 ; **267** : 11689-11692.

BREDT DS, HWANG PM, GLATT CE, LOWENSTEIN C, REED RR, SNYDER HH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P₄₅₀ reductase. *Nature*, 1991 ; **351** : 714-718.

BRITISH THORACIC SOCIETY : Guidelines for management of asthma in adults : chronic persistent asthma. *Brit Med J*, 1990 ; **301** : 651 -653.

BROWN RH, ZERHOUNI EA, HIRSHMAN CA. Reversal of bronchoconstriction by inhaled nitric oxide. Histamine versus methacholine. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994 ; **150** : 233-237.

BRUGMAN TM, DARNELL ML, HIRSHMAN CA. Nifedipine aerosol attenuates airway constriction in dogs with hyperreactive airways. *Am Rev Respir Dis*, 1983 ; **127** : 14-17.

BULT H, BOECKXSTAENS GE, PELCKMANS PA, JORDAENS FH, VAN MAERCKE YM, HERMAN AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non cholinergic neurotransmitter. *Nature*, 1990 ; **345** : 346-347.

CAMPBELL AM, CHANEZ P, VIGNOLA AM, BOUSQUET J, COURET I, MICHEL FB, GODARD P. Functional characteristics of bronchial epithelium obtained by brushing from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis*, 1993 ; **147** : 529-534.

CARBONE E, LUX HD. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J*, 1984 ; **46** : 413-418.

CATTERALL WA, STRIESSING J. Receptor sites for Ca²⁺ channel antagonists. *Trends Pharmacol Sci*, 1992 ; **13** : 256-262.

CERRINA J, DENJEAN A, ALEXANDRE G, LOCKHART A, DUROUX. Inhibition of exercise-induced asthma by a calcium antagonist, nifedipine. *Am Rev Respir Dis*, 1981 ; **123** : 156-160.

CERRINA J, ADVENIER C, RENIER A, FLOCH A, DUROUX P. Effects of diltiazem and other Ca²⁺ antagonists on guinea-pig tracheal muscle. *Eur J Pharmacol*, 1983 ; **94** : 241-249.

CHALON S, SOUCHET T, LHOSTE F. Canaux potassiques. In : *Pharmacologie cardiovasculaire et respiratoire*, 1992, Hermann Paris, pp 85-103.

CHANGEUX JP, DEVILLERS-THIERY A, CHEMOULLI P. Acetylcholine receptor : an allosteric protein. *Science*, 1984 ; **225** : 1335-1345.

CHAPMAN ID, KRISTERSSON A, MATHELIN G, SCHAEUBLIN E, MAZZONI L, BOUBEKEUR K, MURPHY N, MORLEY J. Effects of a potassium channel opener (SDZ PCO 400) on guinea-pig and human pulmonary airways. *Br J Pharmacol*, 1992 ; **106** : 423-429.

CHILVERS ER, CHALISS RAJ, BARNES PJ, NAHORSKI SR. Mass change of inositol (1,4,5) triphosphate in trachealis muscle following agonist stimulation. *Eur J Pharmacol* , 1989 ; **164** : 587-590.

CLOZEL JP, OSTERRIEDER W, KLEINBLOESEM CH, WELKER HA, SCHLÄPPI B, TUDOR R, HEFTI F, SCHMITT R, EGGERS H. RO 40-5967 : a new nondihydropyridine calcium antagonist. *Cardiovascular drug reviews*, 1991 ; **1** : 4-17.

COBURN RF. The airway smooth muscle cell. *FedProc*, 1977 ; **36** : 2692-2697.

COBURN RF, BRON CB. Coupling mechanisms in airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1990 ; **258** : L119-L133.

COGNARD C, ROMEY G, GALIZZI JP, FOSSET M, LAZDUNSKI M Dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels in mammalian skeletal muscle cells in culture : electrophysiological properties and interactions with Ca^{2+} channel activator (Bay K 8644) and inhibitor (PN 200-110). *Proc Natl Acad Sci*, 1986 ; **83** : 1518-1522.

COOK NS. The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci*, 1988 ; **9** : 21-25.

CORRIS PA, NARIMAN S, GIBSON GJ. Nifedipine in the prevention of asthma induced by exercise and histamine. *Am Rev Respir Dis*, 1983 ; **128** : 991-992.

CRIDDLE DN, GREENWOOD IA, WESTON AH. Levromakalim-induced modulation of membrane potassium currents, intracellular calcium and mechanical activity in rat mesenteric artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1994 ; **349** : 422-430.

D'BROT J, ABRAHAM WM, AHMED T. Effect of calcium antagonist gallopamil on antigen-induced early and late bronchoconstrictor response in allergic sheeps. *Am Rev Respir Dis*, 1989 ; **139** : 915-920.

DE MONCHY JGR, KAUFFMAN HF, VENGE P, KOETER GH, JANSEN HM, SLUITER HJ, DE VRIES K Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis*, 1985 ; **131** : 373-376.

DEWACHTER P, SAUNIER CG, DUVIVIER C, PESLIN R, LAXENAIRE MC. Changes in inspired gas composition and experimental bronchospasm in the rabbit. *Respir Physiol*, 1992 ; **90** : 261-269.

DUMAS M, DUMAS JP, ADVENIER C, GIUDICELLI JF. Effects of three K⁺ channel openers on airways and pulmonary circulation in the isolated guinea-pig lung. *Eur J Pharmacol*, 1993 ; **239** : 141-147.

DUPUY PM, SHORE SA, DRAZEN JM, FROSTELL C, HILL WA, ZAPOL WM. Bronchodilatator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *J Clin Invest*, 1992 ; **90** : 421-428.

ECKERT R, CHAD JE. Inactivation of Ca channels. *Prog Biophys Mol Biol*, 1984 ; **44** : 215-267.

EDWARDS G, WESTON AH. The effect of potassium channel modulating drugs on isolated smooth muscle. In : Szekeres L, Papp JG eds Handbook of Experimental Pharmacology, vol 111, Pharmacology of smooth muscle. Heidelberg : Springer Verlag, 1994 ; 469-531

EDWARDS G, WESTON AH. Pharmacology of the potassium channel openers. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1995 ; **9** : 185-193.

EHRlich BE, WATRAs J. Inositol 1,4,5 triphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature*, 1988 ; **336** : 583-586.

ESCANDE D, CAVERO I. K⁺ channel openers and "natural" cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci*, 1992 ; **13** : 269-271.

FANTA CH, VENUGO PALAN CS, LACOUTURE PG, DRAZEN JM. Inhibition of bronchoconstriction in the guinea pig by a calcium channel blocker, nifedipine. *Am Rev Respir Dis*, 1982 ; **125** : 61-66.

FOLKERTS G, VAN DER LINDE HJ, NIJKAMP FP. Nitric oxide deficiency and virus induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Eur Resp J*, 1994 ; **7** : suppl 18, 157s.

FOX AP, NOWYCKY MC, TSIEN R.W. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons. *J Physiol*, (Lond), 1987 a ; **394** : 149-172.

FOX A.P, NOWYCKY MC, TSIEN R.W. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurons. *J Physiol*, (Lond), 1987 b ; **394** : 173-200.

FREDBERG JJ, BUNK D, INGENITO E, SHORE SA. Tissue resistance and the contractile state of lung parenchyma. *J Appl Physiol*, 1993 ; **74** : 1387-1397.

FRIEDEL HA, BROGDEN RN. Pinacidil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of hypertension. *Drugs*, 1990 ; **39** : 929-6967.

FRIEDMAN ME, SUAREZ-KURTZ G, KACZOROWSKI GJ, KATZ GM, REUBEN JP. Two calcium currents in a smooth muscle cell line. *Am J Physiol*, 1986 ; **250** : H699-H703

FRYDMAN AM, CHAPELLE P, DIEKMANN H, BRUNO R, THEBAULT JJ, BOUTHIER J, CAPLAIN H, UNGETHUEM W, GAILLARD C, LELIBOUX A, RENARD A et GAILLOT J. Pharmacokinetics of nicorandil. *Am J Cardiol*, 1989 ; **63** : 25J-33J.

FURUKAWA K, ITOH T, KAJIWARA M, KITAMURA K, SUZUKI H, ITO Y, KURIYAMA H. Vasodilating actions of 2-nicotinamidoethyl nitrate on porcine and guinea-pig coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981 ; **218** : 248-259.

GABELLA G. Innervation of airway smooth muscle : fine structure. *Annu Rev Physiol*, 1987 ; **49** : 583-594.

GANDOLFO G, GOTTESMANN C, BIDARD JN, LAZDUNSKI M. K⁺ channel openers prevent epilepsy induced by the bee venom peptide MCD. *Eur J Pharmacol*, 1989a, **159** : 329-330.

GANDOLFO G, ROMETTINO S, GOTTESMANN C, VAN LUIJTELAAR G, COENEN A, BIDARD JN, LASDUNSKI M. K⁺ channel openers decrease seizure in genetically epileptic rats. *Eur J Pharmacol*, 1989b ; **167** : 181-183.

GIBSON PG, GIRGIS-GABARDO A, MORRIS MM, MATTOLI S, KAY JM, DOLOVICH J, DENBURG J, HARGREAVE FE. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax*, 1989 ; **44** : 693-699.

GIBSON PG, ALLEN CJ, YANG JP, WONG BJO, DOLOVICH J, DENBURG J, HARGREAVE FE. Intraepithelial mast cells in allergic and non allergic asthma : assessment using bronchial brushings. *Am Rev Respir Dis*, 1993 ; **148** : 80-86.

GLOSSMANN H, FERRY DR, LUBBECKE F, MEWES R, HOFMANN F. Calcium channels : direct identification with radioligand binding studies. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1985a ; **7** (suppl 6) : S20-S30.

GLOSSMANN H, FERRY DR, GOLL A et al. Calcium channels : introduction into their molecular pharmacology. In : Fleckenstein A., van Breemen C., Gross R., Hoffmeister A. eds. Cardiovascular effects of dihydropyridine -Type calcium antagonists and agonists. Berlin, Heidelberg, New York : Springer - Verlag, 1985b, pp : 113-139.

GODFRAIND T, GOVONI S. Recent advantages in the pharmacology of Ca²⁺ and K⁺ channels. *TIPS*, 1995 ; **16** : 1-4.

GORDON JR, BURD PR, GALLI SR. Mast cells as source of multifunctional cytokines. *Immunol. Today*, 1990 ; **11** : 458-464.

GRANDORDY BM, CUSS FM, SAMPSON AS, PALMER JB, BARNES PJ Phosphatidyl inositol response to cholinergic agonists in airway smooth muscle : relationship to contraction and muscarinic receptor occupancy. *J Pharmacol exp ther*, 1986 ; **238** : 271-279.

GROSS G, PIEPER G, FARBER NE, WARLTIER D, HARDMAN H. Effects of nicorandil on coronary circulation and myocardial ischemia. *Amer J Cardiol*, 1989 ; **63** : 11J-17J.

GROVER GJ, NEWBURGER J, SLEPH PG, DZWONCZYK S, TAYLOR SC, AHMED SZ, ATWAL KS. Cardioprotective effects of the potassium channel opener cromakalim : stereoselectivity and effects on myocardial adenine nucleotides. *J Pharmacol Exp Therap*, 1991 ; **257** : 156-162.

GRUETTER CA, CHILDERS CE, BOSSERMAN MK, LEMKE SM, BALL JG, VALENTOVIC MA. Comparison of relaxation induced by glyceryl trinitrate, isorbide dinitrate and sodium nitroprussiate in bovine airways. *Am Rev Respir Dis*, 1989 ; **139** : 1192-1197.

GUSTAFSSON LE, LEONE AM, PERSSON MG, WIKLUND NP, MONCADE S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits guinea-pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991 ; **18** : 852-857.

HAGIWARA S, TAKAHASHI K. Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *J Gen Physiol*, 1967 ; **50** : 583-601.

HAGIWARA S, BYERLY L. Calcium channel. *Ann Rev Neurosci*, 1981 ; **4** : 69-125.

HAMID Q, SPRINGALL DR, RIVEROS-MORENO V, CHANEZ P, HOWARTH P, REDINGTON A, BOUSQUET J, GODARD P, HOLGATE S, POLAK JM. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* , 1993 ; **342** : 1510-1513.

HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN E, SIGWORTH FJ. Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch*, 1981 ; **391** : 85-100.

HAMILTON TC, WEIR SW, WESTON AH. Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on rat portal vein. *Br J Pharmacol*, 1985 ; **86** : 443 P.

HAMILTON TC, WEIR SW, WESTON AH. Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br J Pharmacol*, 1986 ; **88** : 103-111.

HAMILTON SL, YATANI A, BRUSH K, SCHWARTZ A, BROWN AM. A comparison between the binding and electrophysiological effects of dihydropyridines on cardiac membranes. *Mol Pharmacol*, 1987 ; **31** : 221-231.

HAMILTON TC, WESTON AH. Cromakalim, nicorandil and pinacidil : novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen Pharmacol*, 1989 ; **20** : 1-9.

HEMLER ME, LANDS WEM. Evidence for a peroxide-initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis. *J Biol Chem*, 1980 ; **255** : 6253-6261.

HENDELES L, HARMAN E. Editorial. Should we abandon the notion that calcium channel blockers are potentially useful for asthma ? *J Allergy Clin Immunol*, 1987 ; **79** : 853-855.

HESS P, TSIEN RW. Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature*, 1984 ; **309** : 453-456.

HILLE B. Calcium channels. In : *Ionic channels of excitable membranes*, 1984b, Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, pp 76-98.

HIRAOKA M, FAN Z. Activation of ATP-sensitive outward K⁺ current by nicorandil (2-nicotinamidoethyl nitrate) in isolated ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989 ; **250** : 278 -285.

HIRSCHMAN CA, EDELSTEIN RA, EBERTZ JM, HANIFIN JM. Thiobarbiturate-induced histamine release in human skin mast cells. *Anesthesiology*, 1985 ; **63** : 353-356.

HIRST GDS, EDWARDS FR. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev*, 1989 ; **69** : 546-604.

HÖGMAN M, FROSTELL C, ARNBERG H, HEDENSTIERNA G. Inhalation of nitric oxide modulates methacholine-induced bronchoconstriction in the rabbit. *Eur Resp J*, 1993a ; **6** : 177-180.

HÖGMAN M, FROSTELL CG, HEDENSTRÖM H, HEDENSTIERNA G. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am Rev Respir Dis*, 1993b ; **148** : 1474-1478.

HOLZMANN S. Cyclic GMP as possible mediator of coronary arterial relaxation by nicorandil. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1983 ; **5** : 364-370.

IBBOTSON T, EDWARDS G, NOACK T, WESTON AH. Effects of P1060 and aprikalim on whole-cell currents in rat portal vein ; inhibition by glibenclamide and phentolamine. *Br J Pharmacol*, 1993 ; **108** : 991-998.

ICHINOSE M, BARNES PJ. A potassium channel activator modulates both excitatory non-cholinergic and cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *J Pharmacol Exp Therap*, 1990 ; **252** : 1207-1212.

ISHIZAWA T, KOGA H, SATO H, MAKINO T, TAKA N, TAKAHASHI T, SATO T, NABATA H. Substituent effects of benzopyran-4-(N-Cyano)-carboxamide potassium channel openers for selectivity to guinea-pig trachealis. *Biorg and Med Chem Letters*, 1994 ; **4** : 1995-1998.

IVERSEN LL. The Ferrier Lecture, 1983. Amino acids and peptides : fast and slow chemical signals in the nervous system ? *Proc R Soc Lond*, 1984 ; **B 221** : 245-260.

JANIS RA, TRIGGLE DJ. 1,4 Dihydropyridine Ca²⁺ channel activators : a comparison of binding characteristics with pharmacology. *Drug Dev Res*, 1984 ; **4** : 257-274.

JEFFERY PK., WARDLAW AJ., MELSON FC., COLLINS JV., KAY AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructure, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*, 1989 ; **140** : 1745-1753.

JOHNSON AR, ASTHON J, SCHULZ WW, ERDOS EG. Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells. *Am Rev Respir Dis*, 1985 ; **132** : 564-568.

JOYCE JT, ROIZEN MF, EGER EI_{II}. Effect of thiopental induction on sympathetic activity. *Anesthesiology*, 1983 ; **59** : 19-22.

KATES RE. Calcium antagonists : pharmacokinetics properties. *Drugs*, 1983 ; **25** : 113-124.

KANNAN MS, JAGER LP, DANIEL EE, GARFIELD RE. Effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium chloride on the electrical activity and cable properties of canine tracheal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 1983 ; **227** : 706-715.

KATSUMATA U, MIURA M, ICHINOSE M, KIMURA K, TAKAHASHI T, INOUE H, TAKISHIMA T. Oxygen radicals produce airway constriction and hyperresponsiveness in anesthetized cats. *Am Rev Respir Dis*, 1990 ; **141** : 1158-1161.

KIDNEY JC, FULLER RW, WORDSELL YM, LAUENDER EA, CHUNG KF, BARNES PJ. Effect on an oral potassium channel activator, BRL 38227, on airway function and responsiveness in asthmatic patients : comparison with oral salbutamol. *Thorax*, 1993 ; **48** : 130 -133.

KIM YY, HOLGATE S, CHURCH MK. Inhibition of histamine release from dispersed human lung and tonsillar mast cells by nicardipine and nifedipine. *Brit J Clin Pharmacol*, 1985 ; **19** : 631-638.

KIRBY JG, HARGREAVE FE, GLEICH GJ., O'BYRNE PM. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and no asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis*, 1987 ; **136** : 379-383.

KISHII KI, MORIMOTO T, NAKAJIMA N, YAMAZAKI K, TSUJITANI M, TAKAYANAGI I. Effects of LP-805, a novel vasorelaxant agent, a potassium channel opener, on rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol*, 1992 ; **23** : 347-353.

KNEUSSL M P., RICHARDSON J B. Alpha-adrenergic receptors in human and canine tracheal and bronchial smooth muscle. *J Appl Physiol*, 1978 ; **45** : 307-311.

KNOX AJ, TATTERSFIELD AE. Airway smooth muscle relaxation. *Thorax*, 1995 ; **50** : 894-901.

KOBZIK L, BREDT DS, LOWENSTEIN CJ, DRAZEN J, GASTON B, SUGARBAKER D, STAMLER JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung : Immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993 ; **9** : 371-377.

KOTLIKOFF MI. Potassium currents in canine airway smooth muscle cells. *Am J Pharmacol*, 1990 ; **259** : L984-L995.

LAITINEN LA, LAITINEN A, HAAHTELA T. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1983 ; **147** : 697-704.

LANGLEY MS, SORKIN EM. Nimodipine : a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in cerebrovascular disease. *Drugs*, 1989 ; **37** : 669-699.

LANSING MW, MANSOUR E, AHMED A, CORTES A, GARCIA L, LAUREDO IT, WANNER A, ABRAHAM WM. Lipid mediators contribute to oxygen-radical-induced airway responses in sheep. *Am Rev Respir Dis*, 1991 ; **144** : 1291-1296.

LANSING MW, AHMED A, CORTES A, SIELCZAK MW, WANNER A, ABRAHAM WM. Oxygen radicals contribute to antigen-induced airway hyperresponsiveness in conscious sheep. *Am Rev Respir Dis*, 1993 ; **147** : 321-326.

LAURENT F, MICHEL A, BONNET PA, CHAPAT JP, BOUCARD M. Evaluation of the relaxant effects of SCA40, a novel charybdotoxin-sensitive potassium channel opener, in guinea-pig isolated trachealis. *Br J Pharmacol*, 1993 ; **108** : 622-626.

LEE VY, HUGHES JM, SEALE JP, TEMPLE DM. Verapamil inhibits mediator release from human lung in vitro. *Thorax*, 1983 ; **38** : 386-387.

LEFF AR. Endogenous regulation of bronchomotor tone. *Am Rev Respir Dis*, 1988 ; **137** : 1198-1216.

LINDEMAN KS, FREED AN. Lemakalim attenuates hypocapnia- and dry air-induced bronchoconstriction in canine peripheral airways. *J Appl Physiol*, 1993 ; **75** :86-92.

LOCKHART A. Données actuelles sur l'hyperréactivité bronchique non spécifique. *Rev Mal Respir*, 1989 ; **6** : 501-506.

LOCKHART A, DINH-XUAN AT, REGNARD J, CABANES L, MATRAN R. Effect of airway blood flow on airflow. *Am Rev Respir Dis*, 1992 ; **146** : S19-S23.

LOCKHART A, MALO JL, RACINEUX JL. Hyperréactivité bronchique en 1994, une quinquagénaire allègre. *Rev. Mal Resp*, 1994 ; **11** : 217-222.

LOIRAND G, PACAUD P, MIRONNEAU C, MIRONNEAU J. Evidence for two distinct calcium channels in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pfluegers Arch*, 1986 ; **407** : 566-568.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951 ; **193** : 265-275.

LUDWIG MS, ROBATTO PD, BROWMAN, BATES JHT, ROMERO PV. Histamine-induced constriction of canine peripheral lung : an airway on tissue response. *J Appl Physiol*, 1991 ; **71** : 287-293.

LUTCHEN KR, SUKI B, ZHANG Q, PETAK F, DAROCZY B, HANTOS Z. Airway and tissue mechanics during physiological breathing and bronchoconstriction in dogs. *J Appl Physiol*, 1994 ; **77** : 373-385.

MC KAY KO, BLACK JL, ARMOUR CL. The mechanism of action of endothelin in human drug. *Br J Pharmacol*, 1991 ; **102** : 422-428.

MAK IT, WEGLIKI WB. Comparative antioxidant activities of propranolol, nifedipine, verapamil and diltiazem against sarcolemmal membrane lipid peroxidation. *Circ Res*, 1990 ; **66** : 1449-1452.

MARTHAN R, SAVINEAU JP, MIRONNEAU J. Acetylcholine-induced contraction in human isolated bronchial smooth muscle : role of an intracellular calcium store. *Respir Physiol*, 1987a ; **67** : 127-135.

MARTHAN R, ARMOUR CL, JOHNSON PRA., BLACK JL. The calcium channel agonist Bay K 8644 enhances the responsiveness of human airway muscle to KCl and histamine but not to carbachol. *Am Rev Respir Dis*, 1987b ; **135** : 185-189.

MARTHAN R, ARMOUR CL, JOHNSON PRA, BLACK JL. Extracellular calcium and human isolated airway muscle : inophore A23187 induced contraction. *Respir Physiol*, 1988a ; **71** : 157-168.

MARTHAN R, MARTIN C, AMEED T, MIRONNEAU J. Calcium channel currents in isolated smooth muscle cells from human bronchus. *J appl physiol*, 1989a, **66** : 1706-1714.

MARTHAN R. Mécanismes cellulaires de la contraction du muscle lisse bronchique. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 1992a, 100, A27-A40.

MARTHAN R. Hyperréactivité bronchique : physiopathologie cellulaire. *Rean Urg*, 1992b, 1, (5), 736-750.

MASSEY KL, HILL M, HARMAN E, RUTLEDGE DR, AHRENS R, HENDELES L. Dose response of inhaled gallopamil (D600), a calcium channel blocker in attenuating airway reactivity to metacholine and exercise. *J Allergy Clin Immunol*, 1988 ; **81** : 912-915

MATTHEWS JNS, ALTMANN DG, CAMPBELL MJ, ROYSTON P. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J*, 1990 ; **300** : 230-235.

MELLEMKJAER S, NIELSEN-KUDSK F. Dynamic effects and pharmacokinetics of lemakalim in the isolated guinea-pig heart. *Pharmacol Toxicol*, 1993 ; **73** , 96-102.

MICHOUD MC, JEANNERET-GROSJEAN A, COHEN A, AMYOT R. Reflex decrease in histamine-induced bronchoconstriction after laryngeal stimulation in asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis*, 1988 ; **138** : 1548-1552.

MILLER RJ. Pharmacology of calcium channels. In : *Receptor Biochemistry and Methodology*, Venter JC and Triggle DJ Ed, 1987, A.R. Liss New York ; **9** : 161-246.

MINETTE PA, BARNES PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways : function and clinical significance. *Am Rev Respir Dis*, 1990 ; **141** : S162-S165.

MOLIMARD M, ADVENIER C. Nouveautés et perspectives dans les médicaments de l'asthme. *Rev Mal Resp*, 1993 ; **10** : 509-517.

MONCADA S. The L-arginine : nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand*, 1992 ; **145** : 201-227.

MORENO RH, HOGG JC, PARE PD. Mechanics of airway narrowing. *Am Rev Respir Dis*, 1986 ; **133** : 1171-1180.

MURDOCH D, BRODGEN RN. Sustained release nifedipine formulations. An appraisal of their current uses and prospective roles in the treatment of hypertension, ischaemic heart disease and peripheral vascular disorders. *Drugs*, 1991 ; **41** : 737-779.

MURPHY KMM, GOULD RJ, LARGENT BL, SNYDER SH. A unitary mechanism of calcium antagonist drug action. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1983 ; **80** : 860-864.

MURRAY RK, BENNETT CK, FLUHARTY SJ, KOTLIKOFF MI. Mechanism of phorbol ester inhibition of histamine-induced IP3 formation in cultured airway smooth muscle. *Am J Physiol*, 1989 ; **257** : L209-L216.

MURRAY RK, KOTLIKOFF MI. Receptor-activated calcium influx in human airways smooth muscle cells. *J Physiol*, 1991 ; **435** : 123-144.

MUSSER JH. Leukotriene D4 receptor antagonists. A new approach to antiasthma drug therapy. *Drug News perspect*, 1989 ; **2** : 202-213.

NADEL JA, TIERNEY DF. Effect of a previous deep inspiration on airway resistance in man. *J Appl Physiol*, 1961 ; **16** : 717-719.

NADEL JA, BARNES PJ. Autonomic regulation of the airways. *Ann Rev Med*, 1984 ; **35** : 451-467.

NARGEOT J. Expression fonctionnelle de canaux calciques dans les modèles de reconstitution. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 1992 ; **100** : A25-A26.

NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE. Expert Panel Report : Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda, National Heart Lung and Blood Institute, 1991.

NIJKAMP FP, VAN DER LINDE HJ, FOLKERTS G. Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea pig *in vivo* and *in vitro*. Role of epithelium. *Am Rev Respir Dis*, 1993 ; **148** : 727-734.

NIJKAMP FP, FOLKERTS G. Nitric oxide and bronchial reactivity. *Clin exp allergy*, 1994 ; **24** : 905-914.

NISHIDA Y, SUZUKI S, MIYAMOTO T. Basic contraction of isolated guinea pig tracheal chains by superoxide radical. *Inflammation*, 1985 ; **9** : 333-337

NOWYCKY MC, FOX A.P, TSIEN RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 1985 ; **316** : 440-443.

OLESEN SP, WÄTJEN F, HAYES AG. A novel benzimidazole, NSOO4, activates large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels in aortic smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 1993 ; **110** : 25P.

ONDRIAS K, MISIK V, STASKO A, GERGEL D, HROMADOVA M. Comparaison of antioxidant properties of nifedipine and illuminated nifedipine with nitroso spin traps in low density lipoproteins and phosphatidylcholine liposomes. *Bioch Biophys Acta*, 1994 ; **1211** : 114-119.

OTIS AB. A perspective of respiratory mechanics. *J Appl Physiol : Respirat. Environ. Exercise physiol*, 1983 ; **54** : 1183-1187.

OWEN S, STONE P, CHURCH S, LAVENDER E, WILLIAMS A, WOODCOCK A. A randomised double blind placebo controlled crossover study of a potassium channel activator in morning dipping (abstract). *Thorax*, 1989 ; **44** : 852P.

PAVLOVIC D, FOURNIER M, AUBIER M, PARIENTE R. Epithelial versus serosal stimulation of tracheal muscle : role of epithelium. *J Appl Physiol*, 1989 ; **67** : 2522-2526.

PERLMAN BB, FREEDMAN LR. Experimental endocarditis staphylococcal infection of the aortic valve following plasma of polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J Biol Med*, 1971 ; **44** : 206- 213.

PERSSON MG, GUSTAFSSON LE. Allergen induced airway obstruction in guinea-pigs is associated with changes in nitric oxide levels in exhaled air. *Acta Physiol Scand*, 1993a ;149 : 461-466.

PIEPER GM, GROSS GS. EMD 52692 (bimakalim), a new potassium channel opener, attenuates luminol-enhanced chemiluminescence and superoxide anion radical formation by zynosan-activated polymorphonuclear leukocytes. *Immunopharmacol*, 1992 ; **23** : 191-197.

POTTER EK. Neuropeptide Y as an autonomic neurotransmitter (review). *Pharmacol Ther*, 1988 ; **37** : 251-273.

POTTER PC. Genetic abnormalities of the human β 2 adrenergic receptor. *Clin Exp Allergy*, 1995 ; **25** : 596-598.

POU S, IOU WS, BREDT DS, SNYDER SH, ROSEN GM. Generation of superoxide by brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1990 ; **24** : 173-176.

QUAST U, COOK NS. *In vitro* and *vivo* comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharm Exp Ther*, 1989 ; **250** : 261-271.

QUAST U. Potassium channel openers : pharmacological and clinical aspects. *Fundam Clin Pharmacol*, 1992 ; **6** : 279-293.

RAFFERTY P, VARLEY JG, EDWARDS JS, HOLGATE ST. Inhibition of exercise-induced asthma by nifedipine : a dose response study. *Br J Clin Pharmacol*, 1987 ; **24** : 479-484.

RASYMAS AK, BOUDOULAS H, MAC KICHAN J. Determination of verapamil enantiomers in serum following racemate administration using HPLC. *J Liquid chromatogr*, 1992 ; **15** : 3013-3029.

REUTER H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs *Nature*, 1983 ; **301** : 569-574.

RICHARDSON J, BELAND J. Nonadrenergic inhibitory nervous system in human airways. *J Appl Physiol*, 1976 ; **41** : 764-771.

RICHARDSON JB. Nerve supply to the lungs. *Am Rev Respir Dis*, 1979 ; **119** : 785-802.

ROBERTSON DRC, WALLER DG, RENWICK AG, GEORGE CF. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics of nifedipine. *Br J Clin Pharmacol*, 1988 ; **25** : 297-305.

ROBINSON DS, BENTLEY AM, HARTNELL A, KAY AB, DURHAM SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma : relation to asthma symptoms, lung function and bronchial responsiveness. *Thorax*, 1993 ; **48** : 26-32.

ROFFEL AF, ELZINGA CRS, ZAAGSMA J. Muscarinic M₃-receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol*, 1990 ; **3** : 1-6.

ROMERO PV, LUDWIG MS. Maximal methacholine-induced constriction in rabbit lung : interactions between airways and tissue ? *J Appl Physiol*, 1991 ; **70** : 1044-1050.

RUDY B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience*, 1988 ; **25** : 729-749.

RUDY B. Diversity and integrity of K⁺ channels. *Neuroscience*, 1988 ; **25** : 729-749.

RUSSI EW, MARCHETTE B, YERGER L, ABRAHAM WM, AHMED T. Modification of allergic bronchoconstriction by a calcium antagonist : mode of action. *Am Rev Respir Dis*, 1983 ; **127** : 675-679.

RUSSI EW, AHMED T. Calcium and calcium antagonists in airway disease. A review. *Chest*, 1984 ; **86** : 475-482.

RUTH P, RÖHRKASTEN A, BIEL M, BOSSE E, REGULLA S, MEYER HE, FLOCKERZI V, HOFFMAN F. Primary structure of the beta-subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*, 1989 ; **245** : 1115-1118.

SALARI H, CHAN-YEUNG M. Arachidonic acid biosynthesis in human bronchial epithelial cells. *Am Rev Respir Dis*, 1989 ; **19** : 635-643.

SANNA A, KURTANSKY A, VERITER C, STANESCU D. Bronchodilator effect of inhaled nitric oxide in healthy men. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994 ; **150** : 1702-1704.

SAUNDERS RN, HANDLEY DA. Platelet-activating factor antagonist. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1987 ; **27** : 237-255.

SCHWARZACHER S, RABERGER G. L-N^G-Nitro-Arginine Methyl ester in the anesthetized rabbit : Venous vasomotion and plasma levels. *J Vasc Res*, 1992 ; **29** : 290-292.

SELLERS JR, PATO MD, ADELSTEIN RS. Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin and platelet myosin. *J Biol Chem*, 1981 ; **257** : 13137-13142.

SO SY, IP M, LAM WK. Calcium channel blockers and asthma. *Lung*, 1986 ; **164** : 1-16.

SOLWAY J, FANTA CH. Differential inhibition of bronchoconstriction by the calcium channel blockers, verapamil and nifedipine. *Am Rev Respir Dis*, 1985 ; **132** : 666-670.

SORKIN EM, CLISSOLD SP, BRODGEN RN. Nifedipine : a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in ischaemic heart disease, hypertension and related cardiovascular disorders. *Drugs*, 1985 ; **30** : 182-274.

SORKIN EM, CLISSOLD SP. Nicardipine : a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of angina pectoris, hypertension and related cardiovascular disorders. *Drugs*, 1987 ; **33** : 296-345

SOUHRADA M, SOUHRADA JF. Reassessment of electrophysiological and contractile characteristics of sensitized airway smooth muscle. *Respir Physiol*, 1981 ; **46** : 17-27.

SPORN PHS, PETERS-GOLDEN M, SIMON RH. Hydrogen-peroxide-induced arachidonic acid metabolism in the rat alveolar macrophage. *Am Rev Respir Dis*, 1988 ; **137** : 49-56.

STEPHENS NL. Airway smooth muscle. *Am Rev Respir Dis*, 1987 ; **135** : 960-975.

STERK PJ, DANIEL EE, ZAMEL N., HARGREAVE FE. Limited bronchoconstriction to methacholine using partial flow-volume curves in non asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis*, 1985 ; **132** : 272-277.

STEVENS WHM, INMAN MD, WATTIE J, O'BYRNE PM. Allergen-induced oxygen radical release from bronchoalveolar lavage cells and airway hyperresponsiveness in dogs. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995 ; **151** : 1526-1531.

SZAREK JL, SCHMIDT NL. Hydrogen peroxide-induced potentiation of contractile responses in isolated rat airways. *Am J Physiol*, 1990 ; **258** : L232-L237.

TAIRA N. Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel activators. *Am J Cardiol*, 1989 ; **63** : 18J-24J.

TIFFENEAU R. Hypersensibilité cholinergo-histaminique pulmonaire de l'asthmatique. Relation avec l'hypersensibilité allergénique pulmonaire. *Acta Allergol*, 1958 ; **5** : 187-221.

TOWART R, SCHRAMM M. Recent advances in the pharmacology of the calcium channel. *Trends Pharmacol Sci*, 1984 ; **5** : 111-113.

TRIGGLE DJ, JANIS RA. Calcium channel ligands. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1987 ; **27** : 347-369.

TSIEN RW. Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol*, 1983 ; **45** : 341-358.

TWORT CHC, VAN BREEMEN C. Human airway smooth muscle in cell culture : control of the intracellular calcium store. *Pulm Pharmacol*, 1989 ; **2** : 45-53.

UHL RR, LEWIS FJ. Digital computer calculation of human pulmonary mechanics using a least square fit technique. *Comput Biomed Res*, 1974 ; **7** : 489-495.

WALKER C, KAEGI MK, BRAUN P, BLASER K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol*, 1991 ; **88** : 935-942.

WARDLAW AJ, DUNNETTE S, GLEICH GJ, COLLINS JV, KAY AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*, 1988 ; **137** : 62-69.

WEISS EB, BELLINO JR. Leukotriene-associated toxic oxygen metabolites induce airway hyperreactivity. *Chest*, 1986 ; **89**(5) : 709-716.

WILKINS RH. Attempts at prevention or treatment of intracranial spasm : an update. *Neurosurgery*, 1986 ; **18** : 808-825.

WILLIAMS AJ, LEE TH, COCHRANE GM, HOPKIRK A, VYSE T, CHIEW F, LAVENDER E, RICHARDS DH, OWEN J, STONE P. Attenuation of nocturnal asthma by cromakalim. *Lancet*, 1990 ; **336** : 334-336.

WILLIAMS DO, BARNES PJ, VICKERS HP, RUDOLF M. Effect of nifedipine on bronchomotor tone and histamine reactivity in asthma. *Br Med J*, 1981 ; 283-348.

WOOLCOCK AJ, SALOME CM, YAN K. The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis*, 1984 ; **130** : 71-75.

YANAGISAWA T, OKADA Y. The structure-activity relationship of KRN 2391 as an N-K hybrid. *Cardiovasc Drug Rev*, 1993 ; **11** : 94-115.

ZHANG HQ, LAI YL. Nicardipine supresses bronchoconstrictor actions of pharmacologic agents in guinea-pigs. *Lung*, 1991 ; **169** : 343-355.

ZÜNKLER BJ, LENZEN S, MAUER K, PANTEN U, TRUBE G. Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitimide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP regulated K⁺ currents in pancreatic β -cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1988 ; **337** : 225-230.

TABLE
DES MATIERES

1	INTRODUCTION.....	15
2	BUT DU TRAVAIL.....	17
3	PHYSIOLOGIE - PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE.....	20
	3.1 Le muscle lisse bronchique : effecteur principal de la réactivité bronchique.....	21
	3.1.1 Contrôle du muscle lisse des voies aériennes par les messages extra- cellulaires.....	22
	3.1.1.1 Les neurotransmetteurs du système nerveux autonome.....	22
	3.1.1.1.1 L'innervation pulmonaire.....	22
	- Fibres nerveuses afférentes.....	22
	•Les récepteurs à l'élongation.....	24
	•Les récepteurs aux irritants.....	24
	•Les fibres C.....	24
	- Fibres nerveuses efférentes.....	24
	•Le système nerveux cholinergique.....	24
	•Le système nerveux adrénergique.....	25
	•Le système nerveux non adrénergique non cholinergique excitateur (NANCe).....	26
	•Le système nerveux non adrénergique non cholinergique inhibiteur (NANCi).....	27
	3.1.1.2 Les médiateurs produits par les cellules inflammatoires.....	29
	3.1.2 Transduction membranaire du message extra-cellulaire.....	31
	3.1.2.1 Couplage électromécanique.....	32
	3.1.2.2 Couplage chimiomécanique.....	33
	- Système des phosphoinositides.....	33
	- Métabolisme des phosphoinositides dans le muscle bronchique.....	34
	3.1.3 Fonctionnement des éléments contractiles.....	35
	3.1.3.1 Phosphorylation de la myosine.....	35

3.2	Hyperréactivité bronchique : définition.....	38
3.2.1	Mécanismes de l'hyperréactivité bronchique.....	40
3.2.1.1	Rôle de l'inflammation des voies aériennes et de l'atopie.....	40
3.2.1.2	Existe-t-il une composante génétique ?.....	42
3.2.1.3	Rôle de l'épithélium.....	43
3.2.1.4	L'oedème bronchique, les facteurs mécaniques et vasculaires	44
3.2.1.5	Rôle des radicaux libres dans le bronchospasme.....	46
4	CANAUX CALCIQUES.....	47
4.1	Structure moléculaire - catégories.....	48
4.1.1	Canaux VOC.....	53
4.1.2	Canaux ROC.....	54
4.2	Les canaux calciques de la fibre musculaire lisse bronchique.....	55
4.3	Pharmacologie des canaux calciques.....	56
4.4	Caractéristiques fonctionnelles des canaux calciques.....	58
4.4.1	Régulation des canaux calciques par les neurotransmetteurs, la protéine kinase C, la protéine G.....	59
4.5	Activation des canaux VOC.....	60
4.6	Inactivation des canaux VOC.....	61
4.7	Canaux calciques ROC.....	63
5	PHARMACOLOGIE DES INHIBITEURS CALCIQUES.....	64
5.1	Rôle du calcium dans les fonctions des voies aériennes.....	65
5.2	Classification chimique des antagonistes du calcium.....	66
5.2.1	Les dihydropyridines.....	66
	• La nifédipine.....	71
5.2.1.1	Dérivés de seconde génération.....	72
	• Nimodipine.....	72
	• Nicardipine.....	72

5.2.2 Les phénylalkylamines.....	73
• Vérapamil.....	73
• Le RO 40-5967.....	74
5.3 Action des antagonistes du calcium.....	74
5.3.1 Action sur le poumon.....	74
5.3.2 Autres effets.....	75
6 CANAUX POTASSIQUES.....	77
6.1 Rappel d'électrophysiologie cellulaire.....	78
6.2 Rôle électrophysiologique.....	79
6.3 Localisation tissulaire.....	79
6.4 Classification.....	80
6.4.1 Canaux potassiques dépendants du voltage.....	80
6.4.2 Canaux potassiques activés par le calcium : canaux maxi-K ⁺	83
6.4.3 Canaux potassiques dépendants d'un récepteur.....	83
6.4.4 Canaux potassiques dépendants de l'ATP.....	84
6.5 Les canaux potassiques de la fibre musculaire lisse.....	84
6.6 Modulation des canaux potassiques de la fibre musculaire lisse : principes généraux.....	85
6.7 Régulation des canaux potassiques.....	86
7 PHARMACOLOGIE DES ACTIVATEURS POTASSIQUES.....	90
7.1 Les ouvreurs des canaux potassiques sensibles à l'ATP.....	91
7.1.1 Les benzopyranes.....	92
7.1.2 Les cyanoguanidines.....	92
7.1.3 Les thioformamides.....	92
7.1.4 Les pyrimidines.....	92
7.1.5 Les benzothiadiazines.....	93
7.2 Les molécules hybrides : combinaison d'ouvreurs dépendants de l'ATP et d'activateurs de la guanylate cyclase.....	93
7.3 Les ouvreurs des canaux potassiques à large conductance activés par le calcium	93

7.4	Le nicorandil.....	94
7.5	Le cromakalim.....	95
7.6	Le levcromakalim.....	95
7.7	Le diazoxide.....	95
7.8	Action sur le poumon.....	96
7.9	Autres effets.....	97
8	METHODOLOGIE.....	98
8.1	Matériel et méthodes.....	99
8.1.1	Inhibiteurs calciques.....	99
8.1.2	Activateurs potassiques.....	99
8.1.3	Groupe-témoin.....	100
8.2	Protocole général d'expérience.....	100
8.3	Aérosol d'histamine.....	103
8.4	Entretien de la relaxation et de l'anesthésie.....	104
8.5	Paramètres mesurés.....	104
8.5.1	Gaz du sang.....	104
8.5.2	Résistances pulmonaires totales et élastance pulmonaire totale.....	104
8.5.3	Pression artérielle et fréquence cardiaque.....	105
8.6	Origine et excipient des médicaments.....	106
8.7	Analyse statistique.....	106
9	RÉSULTATS.....	108
9.1	Inhibiteurs calciques.....	109
9.1.1	Paramètres hémodynamiques.....	109
9.1.2	pH et gaz du sang.....	111
9.1.3	Dose réponse pour vérapamil et RO 40-5967.....	113
9.1.4	Résistance et élastance thoraco-pulmonaires. Action et comparaison des différents inhibiteurs calciques par rapport à un groupe-témoin.....	116
9.2	Activateurs potassiques.....	120
9.2.1	Paramètres hémodynamiques.....	120

9.2.2	pH et gaz du sang artériel.....	122
9.2.3	Résistance et élastance thoraco-pulmonaires. Action et comparaison des différents activateurs potassiques par rapport à un groupe-témoin.....	124
9.2.4	Comparaison des inhibiteurs calciques avec les activateurs potassiques.	128
9.3	Mécanismes d'action associés.....	131
9.3.1	Inhibition de la NO synthétase par le L-NAME.....	133
9.3.1.1	Méthodes.....	133
9.3.1.2	Résultats.....	134
9.3.1.2.1	Dosage du L-NAME et de L-NNA dans le plasma.	134
9.3.1.2.2	Paramètres hémodynamiques.....	134
9.3.1.2.3	pH et gaz du sang.....	134
9.3.1.2.4	Résistances et élastance thoraco-pulmonaires.....	138
9.3.2	Correction de l'action du L-NAME par la L-arginine.....	141
9.3.2.1	Méthodes.....	141
9.3.2.2	Résultats.....	141
9.3.3	Générateurs de NO : paramètres hémodynamiques.....	143
9.3.3.1	Méthodes.....	143
9.3.3.2	Résultats.....	143
9.3.3.2.1	Paramètres hémodynamiques.....	143
9.3.3.2.2	pH et gaz du sang.....	144
9.3.3.2.3	Résistances et élastance thoraco-pulmonaires.....	147
9.3.4	Inhibition de la NO-synthétase par L-NAME. Action d'un inhibiteur calcique et d'un activateur potassique.....	151
9.3.4.1	Méthodes.....	151
9.3.4.2	Résultats.....	151
9.3.4.2.1	Paramètres hémodynamiques.....	151
9.3.4.2.2	pH et gaz du sang artériel.....	153
9.3.4.2.3	Résistances et élastance thoraco-pulmonaires.....	155
9.3.4.2.4	Commentaires.....	155
9.3.5	Rôle des radicaux libres.....	158

9.3.5.1 Méthodes.....	158
9.3.5.2 Mesures des radicaux libres.....	158
9.3.5.3 Résultats.....	159
9.3.5.3.1 Radicaux libres pulmonaires après inhibiteurs calciques et activateurs potassiques.....	159
9.3.5.3.2 Radicaux libres pulmonaires après L-NAME.....	161
9.3.5.3.3 Action de la superoxyde dismutase sur le bronchospasme à l'histamine.....	161
10 DISCUSSION.....	164
11 CONCLUSION.....	173
12 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	175
13 TABLE DES MATIÈRES.....	206

TABLEAUX

Tableau I Principaux messagers extra-cellulaires qui contrôlent la contraction du muscle lisse des voies aériennes par interaction avec des récepteurs spécifiques présents sur la membrane cellulaire musculaire.....	23
Tableau II Canaux calciques VOC.....	52
Tableau III Rôle physiopathologique du calcium dans les fonctions des voies aériennes.....	67
Tableau IV Effets pulmonaires des inhibiteurs calciques <i>in vitro</i>	68
Tableau V Effet pulmonaires des inhibiteurs calciques <i>in vivo</i>	69
Tableau VI Inhibiteurs calciques. Première et deuxième génération.....	70
Tableau VII Caractéristiques des principaux canaux potassiques.....	82
Tableau VIII Principes généraux de la pharmacologie des "ouvreurs" potassiques.....	87
Tableau IX Inhibiteurs calciques. Paramètres hémodynamiques.....	110
Tableau X Inhibiteurs calciques. pH et gaz du sang artériel.....	112
Tableau XI Activateurs potassiques. Paramètres hémodynamiques.....	121
Tableau XII Activateurs potassiques. pH et gaz du sang artériel.....	123
Tableau XIII Inhibiteur de la NO-synthétase (L-NAME) : Paramètres hémodynamiques.....	136
Tableau XIV Inhibiteur de la NO-Synthétase (L-NAME) : pH et gaz du sang artériel.....	137
Tableau XV Générateurs de NO : Paramètres hémodynamiques.....	145

Tableau XVI	
Générateurs de NO : pH et gaz du sang artériel.....	146
Tableau XVII	
Inhibition de la NO-Synthétase par L-NAME : action d'un inhibiteur calcique (nicardipine) et d'un activateur potassique (cromakalim). Paramètres hémodynamiques....	152
Tableau XVIII	
Inhibition de la NO-Synthétase par L-NAME : action d'un inhibiteur calcique (nicardipine) et d'un activateur potassique (cromakalim). pH et gaz du sang artériel.....	154
Tableau XIX	
Radicaux libres oxygénés mesurés au luminomètre dans des poumons après épreuve à l'histamine.....	162

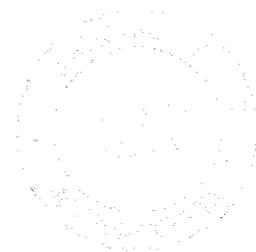
FIGURES

Figure 1 : Hypothèse concernant la balance de la réponse des voies aériennes.....	30
Figure 2 : Phosphorylation de la myosine.....	37
Figure 3 : Courbe dose-réponse du sujet hyperréactif / sujet normal.....	39
Figure 4 : Configuration du canal calcique avec ses cinq sous-unités α_1 , α_2 , β , γ , δ	49
Figure 5 : Structure de la sous-unité α_1 des canaux calcium de type L indiquant leurs principales caractéristiques.....	50
Figure 6 : Gradient ionique transmembranaire et effet de l'ouverture des canaux potassiques.....	81
Figure 7 : Représentation schématique d'une cellule musculaire lisse des voies aériennes et mode d'action des activateurs potassiques.....	88
Figure 8 : Diversité des canaux potassiques.....	89
Figure 9 : Monitoring de l'expérience.....	101
Figure 10 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de vérapamil	114
Figure 11 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de RO 40-5967.....	115
Figure 12 : Variations des résistances thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de nicardipine, nimodipine, nifédipine, vérapamil et RO 40-5967.....	118
Figure 13 : Variations de l'élastance thoraco-pulmonaire à l'aérosol d'histamine après injection iv de nicardipine, nimodipine, nifédipine, vérapamil et RO 40-5967.....	119
Figure 14 : Variations des résistances thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de nicorandil, cromakalim, levcromakalim et diazoxide.....	126

Figure 15 : Variations de l'élastance thoraco-pulmonaire à l'aérosol d'histamine après injection iv de nicorandil, cromakalim levcromakalim.et diazoxide.....	127
Figure 16 : Comparaison des variations des résistances thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de nicardipine, nimodipine, nicorandil, cromakalim et levcromakalim....	129
Figure 17 : Comparaison des variations de l'élastance thoraco-pulmonaire à l'aérosol d'histamine après injection iv de nicardipine, nimodipine, nicorandil, cromakalim et levcromakalim....	130
Figure 18 : Concentrations plasmatiques artérielles de L-NAME et de son métabolite actif L-NNA après injection iv de 10 mg.kg ⁻¹ et de 15 mg.kg ⁻¹	135
Figure 19 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de L-NAME 10 mg.kg ⁻¹	139
Figure 20 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de L-NAME 15 mg.kg ⁻¹	140
Figure 21 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après injection iv de L-NAME 15 mg.kg ⁻¹ suivie ou non par une perfusion iv de L-arginine.....	142
Figure 22 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine avec perfusion iv de L-arginine.....	148
Figure 23 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine avec perfusion iv de S-nitroso-N-acetyl penicillamine.....	149
Figure 24 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine avec perfusion iv de SIN ⁻¹	150
Figure 25 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après une injection iv de nicardipine avec ou sans injection iv préalable de L-NAME.....	156
Figure 26 : Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine après une injection iv de cromakalim avec ou sans injection iv préalable de L-NAME.....	157
Figure 27 : Relation entre la production de radicaux libres oxygénés dans les poumons et l'augmentation des résistances thoraco-pulmonaires 3 minutes après l'aérosol d'histamine chez des animaux traités par injection iv d'inhibiteurs calciques et d'activateurs potassiques.....	160

Figure 28 :
Variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires à l'aérosol d'histamine
après injection iv de superoxyde dismutase..... 163

Figure 29 :
Témoins sans histamine chez des lapins, anesthésiés, curarisés et ventilés artificiellement. 169



Nom, Prénom : DEWACHTER Pascale

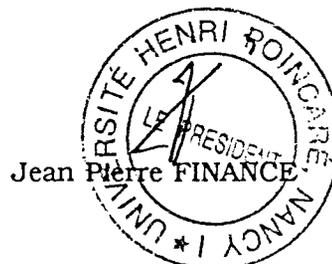
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le - 4 DEC. 1995 ~^o 479

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



RESUME

Le bronchospasme est une complication redoutable en anesthésie et chez les sujets porteurs de bronchopneumopathie chronique. Aucun médicament ne peut prétendre à une prévention absolue du bronchospasme. La première partie de ce travail est consacrée à la revue des connaissances actuelles sur la contraction du muscle lisse bronchique et sur la physiologie et la physiopathologie de l'hyperréactivité bronchique. Un rappel concernant les canaux calciques et potassiques et la pharmacologie des inhibiteurs calciques et des activateurs potassiques vient ensuite. Des études antérieures ont montré que les inhibiteurs calciques et les activateurs potassiques atténuaient la réactivité bronchique à l'histamine. Il était intéressant de comparer leurs effets *in vivo*. Le lapin de 2,5 kg a été choisi. Il est anesthésié, curarisé et ventilé mécaniquement. Les drogues sont injectées préventivement par voie veineuse. Les variations des résistances et de l'élastance thoraco-pulmonaires sont calculées chaque minute par régression linéaire multiple à partir des mesures de pression d'insufflation et de débit, avant et jusqu'à 60 minutes après un aérosol d'histamine. La comparaison des résultats montre que pour la dose maximale possible par voie intraveineuse les inhibiteurs calciques du type dihydropyridine sont plus puissants sur le bronchospasme à l'histamine que les activateurs potassiques. Le rôle du monoxyde d'azote (NO) dans le bronchospasme à l'histamine a été évalué grâce à l'utilisation préventive d'un inhibiteur de la NO synthétase (L-NAME) et de produits générateurs de NO en perfusion veineuse pendant toute la durée de l'expérience. La capacité du tissu pulmonaire à libérer des radicaux libres oxygénés dans ces circonstances a été appréciée avec un luminomètre à partir d'un homogénat de tissu pulmonaire prélevé à la fin des expériences. L'inhibition de la NO synthétase par le L-NAME supprime nettement le pouvoir préventif de l'activateur potassique cromakalim sur le bronchospasme à l'histamine laissant penser que ce composé agit par l'intermédiaire du monoxyde d'azote. Pour que les inhibiteurs calciques ou les activateurs potassiques se révèlent des agents thérapeutiques efficaces sur le bronchospasme, il est important de rechercher une plus grande spécificité de ces drogues sur le muscle lisse bronchique.

MOTS-CLES

Inhibiteurs calciques ; Activateurs potassiques ; Résistances thoraco-pulmonaires ; Elastance thoraco-pulmonaire ; Lapin ; Histamine ; Monoxyde d'azote ; Radicaux libres oxygénés.