

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**  
**IUT A DE LILLE**

**HDR**

**Mémoire présenté pour l'obtention de**  
**L'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES**  
**Dans la section Sciences Naturelles**  
**par**

**Michèle RIVET BASTIDE**

**Le 7 décembre 2005**

**CANAUX IONIQUES ET**  
**PATHOLOGIES CEREBRALES, CARDIAQUES ET**  
**MUSCULAIRES**

**Directeur de l'HDR : Pr. Régis BORDET**

**Jury**

<b>Mme C. Heurteaux</b> Directeur de recherche CNRS, Nice	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr R. Fischmeister</b> Directeur de recherche INSERM, Paris-Sud	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr P. Poulain</b> Chargé de recherche CNRS, Lille II	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme Y. Mounier</b> Professeur des Universités, Lille I	<b>Examineur</b>
<b>Mr R. Bordet</b> Professeur des Universités, Lille II	<b>Directeur</b>

## Table des matières

<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>1</b>
<b>ACTIVITE DE RECHERCHE</b> .....	<b>16</b>
<b>I- CANAUX IONIQUES ET MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE</b> .....	<b>18</b>
I- CALCIUM ET DYSTROPHIE MUSCULAIRE .....	19
II- CANAUX IONIQUES ET CANALOPATHIES .....	23
<i>A- Myopathie du canal sodique</i> .....	23
<i>B- Myopathie du canal chlore</i> .....	25
<b>II- CANAUX IONIQUES ET MUSCLE CARDIAQUE</b> .....	<b>28</b>
I- REGULATION DU COURANT CALCIQUE DE TYPE L SUR LE MYOCYTE ATRIAL HUMAIN .....	29
II- IMPLICATION DES CANAUX IONIQUES DANS LES TROUBLES DU RYTHME D'ORIGINE IATROGENE .....	34
<i>A- Etude des effets de médicaments non cardiotropes sur la repolarisation cardiaque des         tissus auriculaire, ventriculaire et de Purkinje de lapin</i> .....	37
1- Etude du cisapride (stimulant de la motricité digestive) .....	37
2- Etude de la clarithromycine (macrolide) .....	38
3- Etude de la rispéridone (neuroleptique) .....	39
<i>B- Etude des effets de médicaments non cardiotropes sur la repolarisation cardiaque du         tissu atrial humain</i> .....	39
1- Etude de la clarithromycine .....	40
2- Etude de la rispéridone .....	41
<i>C- Modifications de l'électrogénèse cardiaque dans l'insuffisance cardiaque sur un         modèle porcin</i> .....	41
<i>D- Conclusion</i> .....	43
<b>III- CANAUX IONIQUES ET PAROI VASCULAIRE CEREBRALE</b> .....	<b>48</b>
I- PAROI VASCULAIRE ET CONTROLE DU DEBIT SANGUIN CEREBRAL .....	51
<i>A- Contrôle du tonus musculaire par les canaux potassiques</i> .....	52
1- Canaux K <sup>+</sup> calcium-dépendants (K-Ca) .....	53
2- Canaux voltage-dépendants (Kv) .....	55
3- Canaux K <sup>+</sup> ATP-dépendants (K-ATP) .....	56

4- Canaux K <sup>+</sup> à rectification entrante (Kir2.1).....	57
5- Canaux potassiques à deux pores.....	61
<i>B- Contrôle du tonus musculaire par l'endothélium.....</i>	<i>61</i>
1- Les substances vasorelaxantes .....	61
a- Le monoxyde d'azote (NO) .....	61
b- Autres agents relaxants .....	62
2- Les substances vasoconstrictrices .....	63
<i>C- Autorégulation.....</i>	<i>63</i>
II- PAROI VASCULAIRE: CIBLE DE L'ISCHEMIE CEREBRALE .....	63
<i>A- Altération du courant Kir2.1 dans l'ischémie cérébrale.....</i>	<i>64</i>
<i>B- Implication du courant Kir2.1 dans la susceptibilité à l'ischémie cérébrale .....</i>	<i>67</i>
III- STRESS OXYDANT : MECANISME PATHOLOGIQUE DES ALTERATIONS VASCULAIRES ? ....	71
IV- PAROI VASCULAIRE : ROLE DANS LA TOLERANCE A L'ISCHEMIE CEREBRALE.....	82
<b>IV- PERSPECTIVES .....</b>	<b>85</b>
I- PLASTICITE IONIQUE DE LA PAROI VASCULAIRE.....	86
<i>A- Plasticité du courant Kir2.1 et récupération fonctionnelle à court terme .....</i>	<i>86</i>
<i>B- Régulation et modulation de l'expression du courant Kir2.1 .....</i>	<i>92</i>
<i>C- Implication du courant Kv dans la pathologie ischémique.....</i>	<i>93</i>
II- FACTEURS DE RISQUE ET PAROI VASCULAIRE .....	93
III- PLASTICITE IONIQUE NEURO-GLIALE .....	94
<b>REFERENCES .....</b>	<b>98</b>

---

ETAT CIVIL

---

**Nom :** BASTIDE

**Nom de jeune fille :** RIVET

**Prénoms :** Michèle, Marie

**Date et lieu de naissance :** le 8-10-63 à Poitiers (86)

**Nationalité :** française

**Situation de famille :** mariée, 2 enfants

**Adresse personnelle :** 68, rue de Madagascar

59000 LILLE

Tél : 03-20-04-43-27 / 06-80-18-53-12

**Adresses professionnelles : I.U.T.A**

Département Génie Biologique

Boulevard Paul Langevin

USTL

BP 179

59653 VILLENEUVE D'ASCQ Cedex

Tél : 03-20-33-62-71

Fax : 03-20-43-44-71

E-mail : [michele.bastide@univ-lille1.fr](mailto:michele.bastide@univ-lille1.fr)

**Laboratoire de Pharmacologie**

Faculté de Médecine

1, place de Verdun

59045 LILLE Cedex

Tél: 03-20-44-54-49

Fax: 03-20-44-68-63

**Fonction actuelle :**

**Depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2002 :** Maître de Conférences en Toxicologie-Pharmacologie à l'Institut Universitaire de Technologie (IUT A), Département Génie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille.

---

## TITRES UNIVERSITAIRES

---

**1981** : Baccalauréat D

**1984** : DEUG B, Sciences de la vie, Poitiers

**1985** : Licence de Biologie Cellulaire et de Physiologie, Poitiers

**1986** : Maîtrise de Physiologie et Pharmacologie Cellulaire, Poitiers

**1987: DEA de "Biomembranes" option "Electrophysiologie et Pharmacologie Cellulaires"**

*Enregistrement simultané des courants ioniques et de l'activité contractile des cellules musculaires squelettiques embryonnaires de rat en culture primaire.*

Directeur de DEA : Dr G. Raymond. Laboratoire de Physiologie Générale, UMR 6558, Université de Poitiers.

**1992 : Doctorat de l'Université de Poitiers option "Electrophysiologie et Pharmacologie Cellulaires". Soutenu le 10-01-92 à Poitiers, mention "très honorable" avec les félicitations du jury.**

*Perméabilités calciques et calcium intracellulaire du muscle humain normal et dystrophique en culture primaire.*

Directeur de thèse : Dr G. Raymond. Laboratoire de Physiologie Générale, UMR 6558, Université de Poitiers

---

## STAGES POST DOCTORAUX

---

- **du 1-03-92 au 30-09-92** : Dans le laboratoire de M. le Pr F. Lehmann-Horn, Abt. Angewandte Physiologie, Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee-11, 89081 Ulm, Allemagne

*"Effet de la température sur l'activité des canaux sodiques du muscle squelettique humain: implication dans les myopathies du canal sodique"*

**du 1-10-92 au 31-12-93** : Dans le laboratoire de M. le Pr R. Rüdél, Abt. Allgemeine Physiologie, Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, 89081 Ulm, Allemagne

*"Etude des canaux chlore du muscle squelettique adulte de mammifères. Rôle du cytosquelette dans la régulation des canaux chlore sur des myoballes de muscle humain"*

**du 1-01-94 au 30-09-95** : Dans le laboratoire de M. le Dr R. Fischmeister, Cardiologie Cellulaire et Moléculaire, INSERM U446, 5, rue Jean-Baptiste Clément, Faculté de Pharmacie, Université de Paris Sud 92296 Châtenay-Malabry Cedex

*"Régulation du courant calcique de type L par la voie du GMPc/NO dans les cardiomyocytes humains atriaux normaux et pathologiques"*

---

## STATUTS

---

**1988 à 1991** : Boursière de l'Association Française contre les Myopathies (AFM)

**1992 à 1993** : Boursière de la Fondation Alexander von Humboldt (Bonn, Allemagne)

**1994 à 1995** : CDD dans le cadre du stage postdoctoral effectué l'INSERM U446, (Châtenay-Malabry)

**1<sup>er</sup> octobre 1995 au 30 août 2002** : Ingénieur de Recherche dans le Laboratoire de Pharmacologie (Professeur Bernard Dupuis, Professeur Christian Libersa), EA1046 (Professeur Régis Bordet), Faculté de Médecine de Lille II

**depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2002** : Maître de Conférences à l'IUT A de l'USTL

---

## SOCIETE SCIENTIFIQUE

---

Membre de la Société Française de Pharmacologie

# **CURRICULUM VITAE**

Membre de la Société des Neurosciences

---

#### CONFERENCE INVITEE

---

« Ischémie cérébrale et paroi vasculaire » pour le Groupe Lillois de Recherche en Pathologie Vasculaire (octobre 2002)

---

#### RESPONSABILITE ADMINISTRATIVE

---

Responsable de l'animalerie du Département Génie Biologique de l'IUT A

---

#### COLLABORATIONS NATIONALES ET INTERNATIONALES

---

- Prof. D. Ganten, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

*"Etude de l'altération du courant potassique Kir2.1 des cellules musculaires cérébrales chez des rats SHR-SP"*

- Dr N Cotelle, Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, Université Lille 1

*"Etude de molécules antioxydantes de la classe des flavonoïdes dans l'ischémie/reperfusion cérébrale"*

- Prof. S. Stolc, Institute of Experimental Pharmacology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

*"Etude d'un agent neuroprotecteur antioxydant, la stobadine, et de ses dérivés, dans l'ischémie cérébrale "*

---

ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT A L'IUT A, DEPARTEMENT GENIE BIOLOGIQUE,  
2<sup>ième</sup> ANNEE

---

#### **- Option Analyses Biochimiques et Biologiques :**

\* Enseignement de **cours, travaux dirigés et travaux pratiques de Toxicologie** (12 h cours, 67,5 h travaux dirigés, 72 h travaux pratiques)

\* Enseignement de **travaux pratiques de Pharmacologie** (90h travaux pratiques)

\*Encadrement d'étudiants en **projet tutoré** (~ 20 h travaux dirigés)

\*Suivi des stages pratiques de fin d'année des étudiants

**- Option Diététique :**

\* Enseignement de **cours de Toxicologie Nutritionnelle** (12 h de cours)

\* Enseignement sur mesure de **travaux dirigés de Toxicologie Nutritionnelle** (3 h TD)

\* Suivi des stages pratiques de fin d'année des étudiants

---

AUTRES ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

---

\* Co-responsable de la journée thématique « Canalopathies » du Master 2, Ecole Doctorale Biologie-Santé LilleI-LilleII

\*Participation au certificat de Pharmacologie de la Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales, Lille II, Méthodes électrophysiologiques »

---

ENCADREMENT DE STAGIAIRES, DEA, THESE

---

- Encadrement d'une étudiante en DEUG Sciences de la Vie, Biostages, USTL :  
AC. VERHAEGHE (Février-Mars 2001)

- Encadrement d'étudiants de maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie de l'USTL : D.  
LHEUREUX (juin 1998), V. KLEPKA (septembre 1998)

- Encadrement d'une étudiante en D.U. « Sciences du Médicament et Sciences Biologiques »  
Université de Lille II : L.GRUAND (2001-2002)

- Encadrement d'une étudiante de l'IUT A de l'USTL, Département Génie Biologique : E. DESCAMPS (avril - juin 2004)
- Encadrement d'un étudiant en DEA, Sciences de la vie et de la santé, Universités Lille I–Lille II : F. PLAISIER (2003-2004)
- Encadrement d'un étudiant en Doctorat d'Université, F. PLAISIER depuis septembre 2004.
- Encadrement d'une étudiante en D.U. « Sciences du Médicament et Sciences Biologiques » Université de Lille II : E. DESCAMPS (2004-2005)

---

#### **PARTICIPATION A L'ENCADREMENT D'ETUDIANTS :**

---

- DEA « Biomembranes », Université de Poitiers : N. IMBERT (1990-1991)
- DEA « Stress oxydant et pathologies associées », Université Paris V : O.PETRAULT (2000-2001)
- Thèse d'Université, Lille II : P. GLUAIS (2002) « Prolongement de la repolarisation cardiaque d'origine iatrogène. Etude électrophysiologique chez le lapin et chez l'homme et sur un modèle porcin d'insuffisance cardiaque. »
- Thèse d'Université, Lille II. O. PETRAULT (2004) « Etude des altérations fonctionnelles de la paroi vasculaire au cours du processus d'ischémie-reperfusion cérébrale : mécanismes physiopathologiques et approches pharmacologiques »

---

## LISTE DES ARTICLES PUBLIES

---

1. **Rivet M**, Cognard C & Raymond G (1989) The slow inward calcium current is responsible for a part of the contraction of patch-clamped rat myoballs. *Pflügers Arch*, 413, 316-318.
2. Bouron A, **Rivet M**, Nasri-Sebdani M, Guillemain J, Durbin P, Guerrier D & Raymond G (1990) The direct depressant effect of LCB29 (idrocilamide) on mechanical tension of rat soleus muscle fibers. *Can J Physiol Pharmacol*, 68, 1503-1509.
3. Cognard C, **Rivet M** & Raymond G (1990) The blockade of excitation-contraction coupling by nifedipine in patch-clamped rat skeletal muscle cells in culture. *Pflügers Arch*, 416, 98-105.
4. **Rivet M**, Cognard C, Rideau Y, Duport G & Raymond G (1990) Calcium currents in normal and dystrophic human skeletal muscle cells in culture. *Cell Calcium*, 11, 507-514.
5. **Rivet M**, Bois P, Cognard C & Raymond G (1990) Phenytoin preferentially inhibits L-type calcium currents in whole-cell patch-clamped cardiac and skeletal muscle cells. *Cell Calcium*, 11, 581-588.
6. **Rivet M**, Cognard C, Imbert N, Rideau Y, Duport G & Raymond G (1992) A third type of calcium current in cultured normal and DMD human skeletal muscle cells. *Neurosci Letters*, 138, 97-102.
7. Cognard C, Constantin B, **Rivet M**, Imbert N, Besse C & Raymond G (1992) Excitation-contraction coupling in cultured rat skeletal muscle cells: evolution during maturation. *Adv. Exp Med Biol*, 311, 73-89.
8. Cognard C, **Rivet-Bastide M**, Constantin B & Raymond G (1992) Progressive predominance of "skeletal" versus "cardiac" type of excitation-contraction coupling during in vitro skeletal myogenesis. *Pflügers Arch*, 422, 207-209.
9. Cognard C, Constantin B, **Rivet-Bastide M**, Imbert N, Besse C & Raymond G (1993) Appearance and evolution of calcium currents and contraction during the early post-fusional stages of rat skeletal muscle cells developing in primary culture. *Development*, 117, 1153-1161.

10. Cognard C, Constantin B, **Rivet-Bastide M** & Raymond G (1993) Intracellular calcium transients induced by different kinds of stimulus during myogenesis of rat skeletal muscle cells studied by laser cytofluorometry with Indo-1. *Cell Calcium*, 14, 333-348.
11. Constantin B, Cognard C, **Rivet-Bastide M** & Raymond G (1993) Activation of a slow outward current by the calcium released during contraction of cultured rat skeletal muscle cells. *Pflügers Arch*, 423, 291-299.
12. Constantin B, Cognard C, **Rivet-Bastide M** & Raymond G (1993) Calcium current-dependent staircase in rat myotubes and myoballs developing in culture. *Cell Calcium*, 14, 135-144.
13. **Rivet-Bastide M**, Imbert N, Cognard C, Duport G, Rideau Y & Raymond G (1993) Changes in intracellular resting calcium concentration and calcium transients during in vitro development of normal and DMD muscle cells measured by laser cytofluorometry using Indo-1. *Cell Calcium*, 14, 563-571.
14. Lerche H, Heine R, Pika U, George AL Jr, Mitrovic N, Browatzki M, Weiss T, **Rivet-Bastide M**, Franke C, Lomonaco M, Ricker K & Lehmann-Horn (1993) Human sodium channel myotonia: slowed channel inactivation due to substitutions for a glycine within the III/IV linker. *J Physiol Lond*, 470, 13-22.
15. Häussler U, **Rivet-Bastide M**, Fahlke Ch, Müller D, Zachar E & Rüdell R (1994) Role of the cytoskeleton in the regulation of Cl<sup>-</sup> channels in human embryonic skeletal muscle cells. *Pflügers Arch*, 428, 323-330.
16. Kirstein M, **Rivet-Bastide M**, Benardeau A, Hatem S, Mercadier JJ, Fischmeister R (1995) Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest* 95, 794-802.
17. **Rivet-Bastide M**, Vandecasteele G, Hatem S, Verde I, Bénardeau A, Mercadier JJ & R Fischmeister (1997) cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes. *J Clin Invest*, 99 (11) 2710-2718.
18. Dumotier BM, Adamantidis MM, Puisieux FL, **Bastide MM** & Dupuis BA (1999) Repercussions of pharmacologic reduction in ionic currents on action potential configuration

in rabbit Purkinje fibers : are they indicative of proarrhythmic potential? Drug Dev Res, 47, 63-76.

19. **Bastide M**, Bordet R, Pu Q, Robin E, Puisieux F, Dupuis B (1999) Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab, 19, 1309-1315.

20. Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, Souil E, **Bastide M**, Bordet R (2000) Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and LPS-induced brain ischemic tolerance. Europ J Pharmacol, 389, 71-78.

21. Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, Puisieux F, Pu Q, Robin E, Martin A, **Bastide M**, Leys D, Lhermitte M, Dupuis B (1999) Enhanced endogenous antioxidant activity in lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. J Cereb Blood Flow Metab, 20, 1190-1196.

22. Deplanque D, **Bastide M**, Bordet R (2000) Ischaemic preconditioning of the endothelium and smooth muscle of cerebral arteries. Trends Pharmacol Sci, 21, 332. (lettre)

23. Dumotier BM, **Bastide M**, Adamantidis MM (2001) "Use-dependent" effects of cisapride on postrest action potentials in rabbit ventricular myocardium. Eur J Pharmacol, 422, 137-148.

24. Lacroix D, Gluais P, Marquié C, D'Hoinne C, Adamantidis M, **Bastide M** (2002) Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy. Cardiovasc Res, 54, 42-50

25. Gluais P, **Bastide M**, Caron J, Adamantidis M. (2002) Risperidone prolongs cardiac action potential through reduction of K<sup>+</sup> currents in rabbit myocytes. Eur J Pharmacol, 444, 123-132

26. Gluais P, **Bastide M**, Caron J, Adamantidis M. (2003a) Comparative effects of clarithromycin on action potential and ionic currents from rabbit isolated atrial and ventricular myocytes. J Cardiovasc Pharmacol, 41(4), 506-17

27. Gluais P, **Bastide M**, Grandmougin D, Fayad G, Adamantidis M (2003b) Clarithromycin reduces  $I_{\text{Sus}}$  and  $I_{\text{to}}$  currents in human atrial myocytes with minor repercussions on action potential duration. *Fund Clin Pharmacol*, 17, 691-701
28. Gautier S, Pétrault O, Gelé P, Laprais M, **Bastide M**, Bauters A, Deplanque D, Jude B, Caron J, Bordet R. (2003) Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke*, 24(12), 2975-9
29. **Bastide M**, Gelé P, Pétrault O, Pu Q, Caliez A, Robin E, Deplanque D, Duriez P, Bordet R. (2003) Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(4), 399-405
30. Gluais P, **Bastide M**, Grandmougin D, Fayad G, Adamantidis M (2004) Risperidone reduces  $K^+$  currents in human atrial myocytes and prolongs repolarization in human myocardium. *Eur J Pharmacol* repolarization in human myocardium. *Eur J Pharmacol*, 497, 215-222.
31. Pétrault O, **Bastide M**, Cotelle N, Gelé P, Gautier S, Laprais M, Vamecq J, Duriez P, Bordet R (2004) The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylchalcone is parallel to preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 370, 395-403.
32. Pétrault O, Ouk T, Gautier S, Laprais M, Gelé P, **Bastide M**, Bordet R (2005) Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol.*, 144, 1051-1058.

---

## RESUMES DE COMMUNICATIONS A COLLOQUES

---

1. Cognard C, Raymond G & **Rivet M** (1988) On the role of calcium current in the development of contraction of patch-clamped rat skeletal muscle cells in culture. *J Physiol Lond*, 406, 104P.

2. **Rivet M**, Cognard C & Raymond G (1988) Rôle du courant calcique dans le développement de la contraction de cellules musculaires squelettiques de rat en culture primaire. Actes du 3<sup>e</sup> Colloque National sur les Maladies Neuromusculaires, Bordeaux, 198.
3. **Rivet M**, Cognard C & Raymond G (1989) Deux types de courant calcique dans la membrane du muscle squelettique humain en culture. Colloque "Patch-clamp", ENS, Paris.
4. Cognard C, **Rivet M**, Duport G, Rideau Y & Raymond G (1990) Possible existence of a third type of calcium current in normal and DMD skeletal muscle cells in culture. J Neurol. Sci, 98, 223.
5. **Rivet M**, Bois P, Cognard C & Raymond G (1990) La phénytoïne inhibe préférentiellement les courants calciques à haut seuil ( $I_{Ca,L}$ ) des cellules musculaires squelettiques et cardiaques. Arch Int Physiol Biochem, 98, A186.
6. **Rivet M**, Cognard C, Duport G, Rideau Y & Raymond G (1990) Calcium currents in normal and DMD human skeletal muscle cells in culture. J Neurol Sci, 98, 224.
7. Cognard C, Constantin B, **Rivet M** & Raymond G (1991)  $I_{Ca,L}$ , charge du RS et concentration du calcium libre dans le myoplasme lors de la maturation des cellules musculaires squelettiques de rat en culture. Actes du 4<sup>e</sup> Colloque National sur les Maladies Neuromusculaires, Montpellier, 191.
8. Cognard C, Constantin B, **Rivet M** & Raymond G (1991) The role of L-type  $Ca^{++}$  current in excitation-contraction coupling and SR loading during skeletal muscle cell maturation. Actes du "Regional meeting of the IUPS" Prague, 37.
9. **Rivet M**, Imbert N, Cognard C & Raymond G (1991) Le calcium libre myoplasmique des cellules musculaires humaines normales et DMD en culture, au repos et après stimulation. Actes du 4<sup>e</sup> Colloque sur les Maladies Neuromusculaires, Montpellier, 426.
10. **Rivet-Bastide M**, Fahlke Ch, Seewald MJ & Rüdél R (1993) Rat skeletal muscle chloride channels reconstituted on patch pipettes. Pflügers Arch, 422, suppl. 1, R28.
11. Imbert N, **Rivet-Bastide M**, Cognard C, Duport G, Rideau Y & Raymond G (1993) Does the absence of dystrophin alter the calcium currents and the internal calcium activity in

dystrophic human skeletal muscle cells contracting or not in vitro? 58<sup>e</sup> Annual Congress of the Hungarian Physiological Society, Debrecen, L23.

12. Fischmeister R, Méry PF, Kirstein M, **Rivet-Bastide M** (1994) Nitric oxide and cGMP regulation of cardiac calcium channels. 19<sup>e</sup> INSERM European Symposium , "Hormone and cell regulation", Mont Saint-Odile.

13. **Rivet-Bastide M**, Bénardeau A, Hatem S, Mercadier JJ & R Fischmeister (1995) Comparative effects of EHNA an PDE2 inhibitor, on Ca current in human atrial and rat ventricular myocytes. J Mol Cell, Cardiol., 25 (6), A129.

14. Adamantidis M, Dumotier B, Lacroix D, **Bastide M** & B Dupuis (1997) Influence du magnésium extracellulaire sur la repolarisation du potentiel d'action des cellules épiscopardiques et endocardiques de porc et sur les effets du dl-sotalol. Arch Mal Coeur Vaiss 90 (4), 558.

15. **Bastide M**, Adamantidis M, Dumotier B, Bordet R & B Dupuis (1998) Block of inward rectifier potassium current, IK1, by cisapride in rabbit ventricular myocytes. Fund Clin Pharmacol, 12 (3), 313.

16. Dumotier B, Adamantidis M, **Bastide M**, Bordet R & B Dupuis (1998) Cisapride effects on postrest action potential duration in isolated rabbit ventricular muscle : no evidence for reverse use-dependent block. Fund Clin Pharmacol, 12 (3), 326.

17. **Bastide M**, Bordet R, Pu Q, Robin E, Puisieux F & Dupuis B (1999) Inward rectifier potassium current ( $K_{IR}$ ) is reduced in rat cerebral vascular smooth muscle cells (VSMC) after ischemia/reperfusion (I/R). Société Française de Pharmacologie, 15-17 Mars 1999, Nantes. Fund Clin Pharmacol, 13, 348.

18. **Bastide M**, Deplanque D, Lhermitte M, Bordet R (2000) Inward rectifier potassium current (KIR) in cerebral arteries : a new pharmacological target in cerebral ischemia/reperfusion. Société Française de Pharmacologie, 10-12 Avril 2000, Rouen. Fund Clin Pharmacol 14, 239.

19. Gluais P, D'Hoinne C, **Bastide M**, Grandmougin D, Adamantidis M, Lacroix D (2001) Pacing-induced heart failure causes a reduction of potassium currents Ito and IK in porcine sub-epicardial and sub-endocardial myocytes. Arch Mal Coeur, 94: 344.

20. **Bastide M**, Deplanque D, Caliez A, Gelé P, Maboudou P, Jabourek O, Bordet R (2001) Cerebral vessel wall as a potential pharmacological target in stroke. *Arch Mal Coeur*, 94 : 339.
21. **Bastide M**, Gelé P, Deplanque D, Caliez A, Maboudou P, Lhermitte M, Bordet R (2001) LPS-induced vascular protection in cerebral ischemia. *Fund Clin Pharmacol*, 15 : 143.
22. Gluais P, Bastide M, Adamantidis M, Caron J, Bordet R (2001) Clarithromycin decreases the potassium Ito, Ikr and IcaL currents in rabbit cardiac myocytes. *Fund Clin Pharmacol*, 15 : 39.
23. **Bastide M**, Deplanque D, Caliez A, Gelé P, Maboudou P, Bordet R (2001) Cerebral vessel wall as a potential pharmacological target in stroke. *Cerebrovasc Dis*, suppl 4 : 85.
22. **Bastide M**, Gelé P, Pétrault O, Pu Q, Duriez P, Bordet R (2002) Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide (LPS) during brain ischemic tolerance. 9th International symposium on pharmacology of cerebral ischemia, Marsburg July 21-24 2002, Allemagne
23. Pétrault O, **Bastide M**, Cotelle N, Laprais M, Vamecq J, Duriez P, Bordet R (2002) Antioxidants-induced protection of cerebral blood vessels function after ischemia/reperfusion (I/R). 9th International symposium on pharmacology of cerebral ischemia, Marburg July 21-24 2002, Allemagne
24. Pétrault O, **Bastide M**, Cotelle N, Laprais M, Vamecq J, Duriez P, Bordet R. (2003) Antioxidants-induced protection of cerebral blood vessels function after ischemia/reperfusion (I/R). *Fund Clin Pharmacol*, 17, 227-269.
25. **Bastide M**, Pétrault O, Gruand L, Laprais M, Stolc S, Bordet R (2003). Protective effects of stobadine, an antioxidant agent, on neuronal and vascular alterations induced by ischemia/reperfusion on rat. *Fund Clin Pharmacol*, 17, 227-269.
26. Pétrault O, **Bastide M**, Ouk T, Gelé P, Laprais M, Cotelle N, Stolc S, Vamecq J, Bordet R. (2004) Ischemia-reperfusion and vascular wall. Congrès SFP, Strasbourg Avril 2004.
27. **Bastide M**, Pétrault O, Laprais M, Ouk T, Stolc S, Bordet R (2004) Antioxidant protective effects of stobadine against ischemia/reperfusion (I/R) induced alterations of

muscular and endothelial functions of rat middle cerebral arteries (MCA). 10<sup>th</sup> International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg July 25-28, Allemagne.

28. Pétrault O, Ouk T, Laprais M, Gelé P, **Bastide M**, Bordet R (2004) Dissociate protective effects of vinblastine-induced neutropenia on post-ischemic endothelium and smooth muscle impairment in cerebral vessel. 10<sup>th</sup> International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg July 25-28, Allemagne.

29. Ouk T, Pétrault O, Gelé P, Laprais M, Gautier S, Duriez P, **Bastide M**, Bordet R (2004) Acute treatment by a PPAR- $\alpha$  agonist decreases cerebral infarct volume and prevents post-ischemic endothelium and Kir2.1 impairment. 10<sup>th</sup> International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg July 25-28, Allemagne.

**ACTIVITE DE  
RECHERCHE**

Mes travaux de recherche depuis 1986 ont concerné les mouvements ioniques transmembranaires ou intracellulaires des cellules musculaires striées squelettiques ou cardiaques et des cellules musculaires lisses. Les canaux ioniques, protéines transmembranaires distribuées de manière ubiquitaire dans les tissus assurent la transmission d'informations, jouent un rôle de contrôle des grandes fonctions de l'organisme. Dans ce cadre, ils sont soumis à des régulations physiologiques et constituent des cibles pharmacologiques (thérapeutiques) intéressantes mais ils peuvent aussi être impliqués dans des pathologies ou être responsables de canalopathies. Sur les trois types de tissus musculaires rencontrés dans l'organisme, nous avons étudié par des méthodes électrophysiologiques la modulation et/ou l'altération des signaux ioniques au travers de différentes thématiques:

#### **≡ sur le muscle strié squelettique**

- mise en place du couplage excitation-contraction au cours du développement myogénique
- étude des dysfonctionnements canaux dans les pathologies neuromusculaires : cas de la dystrophie de Duchenne et des myotonies du canal sodique
- régulation des canaux chlores par le cytosquelette

#### **≡ sur le muscle strié cardiaque**

- régulation du canal calcique L par la voie du GMPc chez l'homme
- modification de l'électrogénèse cardiaque par l'action de médicaments non cardiotropes chez le lapin et chez l'homme
- altération de la repolarisation dans l'insuffisance cardiaque sur un modèle porcin

#### **≡ sur le muscle lisse vasculaire cérébral**

- altération de la paroi vasculaire au cours de l'ischémie/reperfusion cérébrale : implication des conductances potassiques

# **I- Canaux ioniques et muscle strié squelettique**

## I- Calcium et dystrophie musculaire

Au cours de mon DEA et de mon doctorat effectués au Laboratoire de Physiologie Générale (U.M.R. C.N.R.S. 6558) sous la direction du Dr G. Raymond, mes travaux ont concerné le rôle du calcium dans la mise en place du couplage excitation-contraction au cours du développement et son implication dans les dystrophies neuromusculaires.

Les cellules satellites, à fort pouvoir mitogénique, provenant de muscle adulte reproduisent en culture primaire les premiers stades de la myogénèse (myoblastes mononucléés  $\Rightarrow$  myotubes plurinucléés). Ce système donne ainsi la possibilité d'étudier les premiers stades de développement musculaire et particulièrement la mise en place du couplage excitation-contraction. Les courants ioniques transmembranaires ont été enregistrés par la méthode de patch-clamp en configuration "cellule entière" et l'activité mécanique par une méthode optique. Ces travaux ont démontré que la contraction musculaire sur des cellules musculaires de rat en culture primaire, présente deux composantes, l'une dépendant directement des ions calcium portés par le courant calcique de type lent (L), l'autre faisant intervenir un processus voltage-dépendant via le voltage-sensor. L'importance relative de ces deux composantes varie au cours du développement avec une diminution de la composante courant-dépendante au profit de la composante potentiel-dépendante. Ce courant calcique de type L a un rôle essentiel dans la charge des sites de stockage intracellulaire du calcium essentiellement constitués par le réticulum sarcoplasmique (RS). (**Publications n<sup>os</sup> 1, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12**)

Dans le cadre d'une collaboration avec le Prof. Y. Rideau (Chef du Service de Réadaptation Fonctionnelle, Unité Duchenne de Boulogne) et le Dr G. Duport (Chef du Département de Chirurgie Générale) du C.H.R. & U. de Poitiers, les travaux de ma thèse d'université ont porté sur la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), pathologie héréditaire qui atteint et détruit progressivement les muscles squelettiques. C'est la plus fréquente et la plus sévère des myopathies de l'enfant avec une prévalence de 2 à 3 cas pour 100 000 individus (1 naissance mâle pour 3500). C'est une affection récessive transmise par le chromosome X, le locus responsable de la maladie de Duchenne est situé sur le bras court du chromosome (Xp21) et code pour une protéine appelée dystrophine. Progressivement au cours de la maladie, le tissu musculaire est peu à peu remplacé par du tissu conjonctif et du tissu adipeux entraînant une perte d'autonomie de l'enfant. Les fonctions vitales (respiration) sont atteintes et la mort survient aux alentours de la vingtième année. La dystrophine est une protéine membranaire qui joue un rôle dans l'ancrage et la consolidation du cytosquelette. Au moment où ces travaux ont débuté,

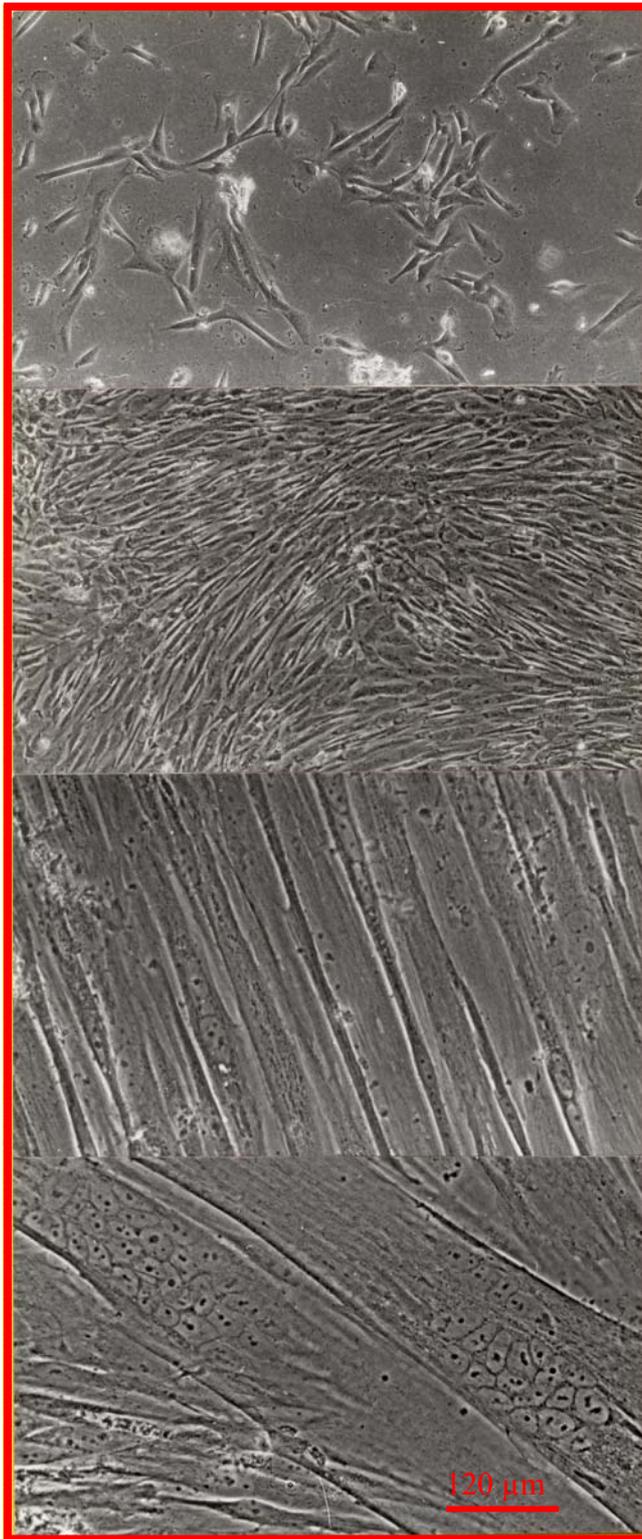
les conséquences de son absence dans la mise en place de la dégénérescence musculaire restaient à définir. En parallèle, il avait été mis en évidence dès les premiers stades de la pathologie une accumulation de calcium anormale et très délétère dans le cytoplasme des cellules musculaires squelettiques qui pouvait induire une activation des systèmes enzymatiques de type protéase responsable de la nécrose des fibres. En nous appuyant sur les connaissances que nous possédions des courants calciques du muscle squelettique, nous avons recherché les sources potentielles de l'accumulation intracellulaire anormale de calcium dans le muscle DMD. Cette surcharge calcique est présente sur le muscle squelettique dès le stade fœtal, antérieurement à tout processus dégénératif. La dystrophine étant absente sur les cellules malades mises en culture, nous avons développé un modèle de culture cellulaire primaire de muscle squelettique humain sain et DMD à partir de biopsies musculaires comme modèle expérimental de DMD afin de rechercher l'origine de ce calcium (figure 1).

Celle-ci pouvait être double c'est à dire provenir du milieu extracellulaire via les canaux calciques membranaires et/ou provenir des sites de stockage intracellulaires essentiellement constitués par le réticulum sarcoplasmique (RS) mais également par les mitochondries et la face cytoplasmique du sarcolemme. La première étape a été de caractériser les différents types de courants calciques présents sur des myotubes humains sains :

- le courant calcique "à bas seuil ou de type T" activé pour de faibles dépolarisations, présentant des cinétiques d'activation et d'inactivations rapides et sans inhibiteur spécifique, joue un rôle dans l'activité électrique automatique des cellules musculaires observée dans les premiers stades de développement.

- le courant calcique « à haut seuil ou de type L » activé pour des dépolarisations plus élevées, se développant avec des cinétiques d'activation et surtout d'inactivation très lentes. Spécifiquement sensible aux dihydropyridines, il interviendrait dans l'activation de la contraction et la charge initiale des sites de stockage du calcium.

- le courant calcique dit "de troisième type" qui se rapproche par sa potentiel-dépendance et ses cinétiques du courant de type N observé sur certaines cellules nerveuses. Son insensibilité à la nifédipine, à l' $\omega$ -conotoxine et au gadolinium se rapproche des caractéristiques du courant de type P présent sur d'autres types de préparations nerveuses. Son rôle reste hypothétique, son étude particulière difficile car il n'est pas possible de l'isoler pharmacologiquement.



Myoblastes à 8 jours de culture : prolifération

Myoblastes à 15 jours de culture : confluence

Fusion des myoblastes en myotubes après 22 jours de culture

Croissance des myotubes 15 jours après la fusion, à 30 jours de culture

**Figure 1:** Evolution des cellules musculaires humaines en culture primaire

Au cours de la maturation cellulaire aucune différence qualitative ou quantitative du courant L entre les cellules saines et dystrophiques n'a pu être démontrée. En revanche la densité de

courant T décroît progressivement sur le muscle sain alors qu'elle augmente sur le muscle DMD. Cette augmentation sur le muscle malade pourrait induire une hyperactivité membranaire, un influx accru d'ions calcium vers le cytoplasme. Mais ce résultat se doit d'être confirmé sur des temps de culture plus longs et des cellules plus matures.

Ce travail s'est poursuivi par l'étude du calcium libre intracellulaire, au repos et après stimulation pharmacologique par cytofluorométrie à laser avec la sonde Indo-1. Une concentration calcique significativement supérieure a été décelée sur les myoblastes DMD mais ne se retrouve pas au stade myotube. Trois types de stimuli ont été testés: (i) cholinergique (ACh) afin de stimuler les récepteurs nicotiques et induire une dépolarisation membranaire; (ii) hyperpotassique qui dépolarise la membrane; (iii) caféinique qui active directement les canaux calciques du RS. Les myoblastes normaux et DMD répondent seulement à l'ACh, ce qui semble indiquer que les sites calciques internes ne sont pas fonctionnels, le signal calcique observé pouvant provenir des ions  $Ca^{2+}$  transitant par le canal non sélectif du récepteur nicotinique. Les myotubes normaux et DMD répondent aux trois types de stimuli révélant qu'à ce stade les sites de stockage du calcium sont fonctionnels et disponibles en réponse à une dépolarisation membranaire. Mais ces signaux calciques sont toujours plus faibles sur le muscle DMD indiquant une altération des mécanismes de stockage et de libération et/ou du couplage entre la membrane du système tubulaire et le RS sur le muscle DMD. Ces résultats montrent en outre que la surcharge calcique existant sur le muscle DMD doit apparaître à un stade de développement musculaire plus avancé que celui atteint dans notre système de culture primaire aneurale. Juste avant mon départ du laboratoire j'ai contribué à la mise en place d'un système de coculture nerf/muscle permettant d'accéder à un stade de maturation musculaire plus avancé (acquisition de la contraction) sur lequel cette étude du signal calcique a été poursuivie.

*L'ensemble de ces travaux a été publié dans Cell calcium : "Calcium currents in normal and dystrophic human skeletal muscle cells in culture" (Rivet et coll, 1990), "Changes in cytosolic resting ionized calcium level and in calcium transients during in vitro development of normal and Duchenne muscular dystrophy cultured skeletal muscle measured by laser cytofluorometry using Indo-1" (Rivet-Bastide et coll, 1993) et dans Neurosciences Letters : "A third type of calcium current in cultured human skeletal muscle cells" (Rivet et coll, 1992).*

## **II- Canaux ioniques et canalopathies**

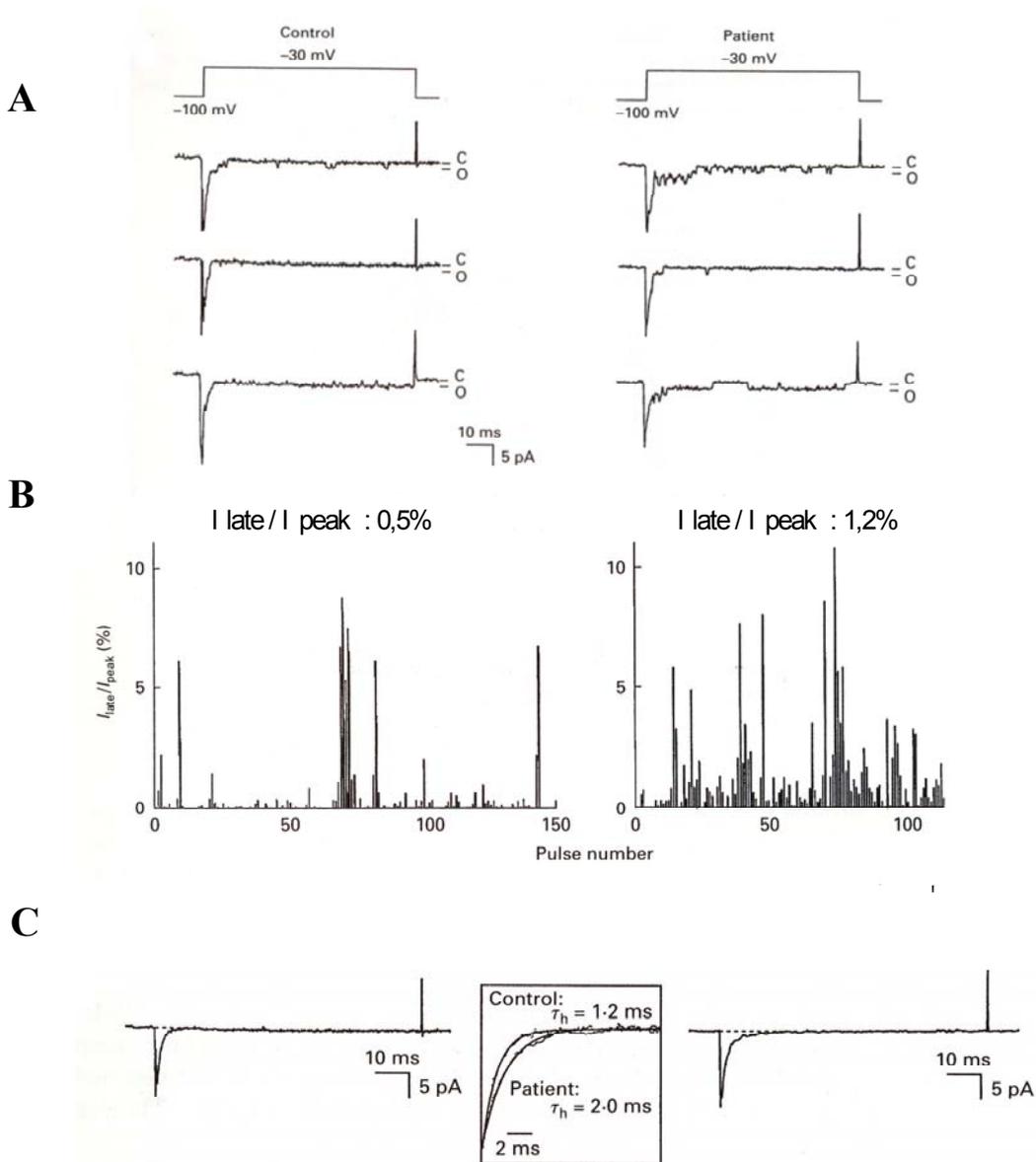
Au cours de mon stage postdoctoral, j'ai pu étudier le rôle et/ou l'implication d'autres types de canaux ioniques dans certaines canalopathies. A partir de biopsies musculaires humaines normales ou pathologiques provenant de patients traités au centre spécialisé des maladies neuromusculaires de l'hôpital universitaire de Ulm (Allemagne) et de muscle animal, les canaux ioniques sont étudiés par la technique de patch-clamp dans ses différentes configurations "cellule entière", "cellule attachée" ou "patch excisé" et sur différents supports expérimentaux: cellules musculaires humaines en culture, blebs sarcolemmiens sur fibres musculaires humaines adultes et canaux tubulaires de muscle de rat réincorporés dans des structures artificielles (liposomes) pour l'étude de canaux inaccessibles directement.

### **A- Myopathie du canal sodique**

Le canal sodique du muscle squelettique peut être porteur de mutations responsables d'un certain nombre de myopathies. Nous avons mené une étude dans le but de caractériser les effets induits par une modification de la température (21°C versus 37°C) sur l'activité des canaux sodiques sur muscle sain, résultats à comparer ultérieurement à ceux obtenus sur des muscles pathologiques atteints de la paramyotonia congenita et les myotonies du canal sodique qui présentent des symptômes dus ou aggravés par le froid. Le but était de caractériser les effets du froid sur le muscle sain afin de différencier les effets propres de la température de ceux induits par les mutations sur le muscle malade. Ainsi soumettre les fibres à 37°C puis à 21°C entraîne une diminution de la conductance unitaire du canal sodique, une augmentation de la fréquence des ouvertures tardives du canal, une augmentation du temps d'ouverture moyen des canaux ainsi qu'un ralentissement de la phase d'inactivation du courant sodique "macroscopique" obtenu après moyennage.

Parallèlement, nous avons étudié une forme atypique de myotonie du canal sodique mise en évidence au sein de trois familles dont l'analyse génétique a révélé des mutations sises sur le gène codant pour la sous-unité alpha du canal sodique au niveau d'une glycine<sup>1306</sup>, un acide aminé hautement conservé jouant un rôle dans l'inactivation du courant sodique. L'étude électrophysiologique réalisée sur des fibres musculaires provenant de biopsies de ces trois familles ont révélé un fonctionnement anormal du canal sodique au niveau de sa phase d'inactivation (figure 2). Un ralentissement de cette phase d'inactivation lié à une augmentation des ouvertures tardives du canal entraînait un courant sodique qui ne s'inactivait pas et était donc

responsable d'une dépolarisation membranaire et d'une hyperexcitabilité de la fibre (**Publication n° 14**).

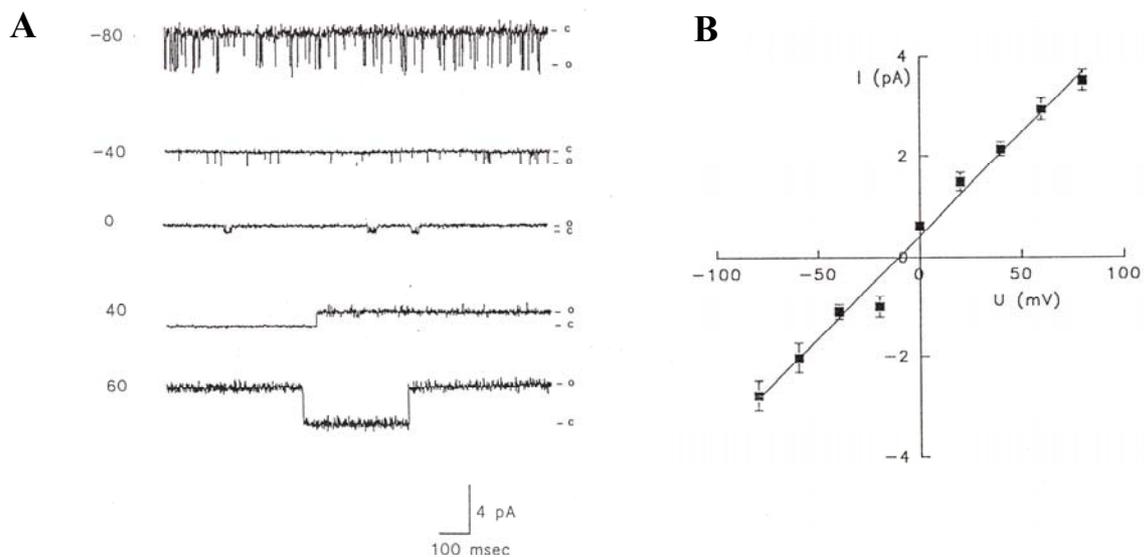


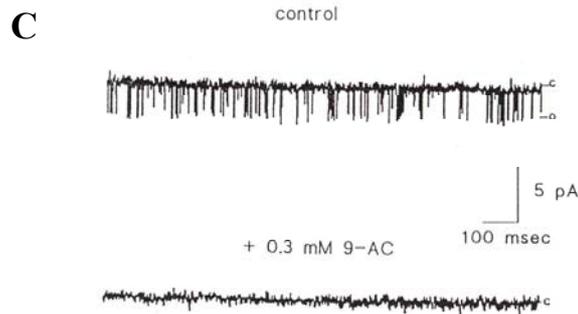
**Figure 2:** Tracés de courant sodique obtenus sur des blebs formés sur des fibres musculaires de patients témoins et de patients atteints de myopathie en réponse à un saut dépolarisant de -100 à -30 mV (A); Amplitude relative des courants sodiques tardifs mesurés sur 150 sauts consécutifs de potentiel -100 à -30 mV normalisés en fonction du pic de courant précoce (B); reconstruction du courant macroscopique sodique montrant le ralentissement de la phase d'inactivation et mesure des constantes d'inactivation (C).

## B- Myopathie du canal chlore

La conductance chlore est responsable d'environ 80% de la conductance totale de repos sur le muscle squelettique adulte et les altérations génétiques du canal chlore sont à la base de différentes maladies regroupées sous le terme de myotonies du canal chlore. Les mesures directes en patch-clamp des canaux chlores sur la fibre musculaire sont difficiles et n'ont apporté que peu d'informations car ces canaux sont localisés à la fois dans le sarcolemme et sur la membrane tubulaire, cette dernière n'étant pas accessible à une pipette de patch. Nous avons voulu dans un premier temps caractériser les canaux chlore présents sur le système tubulaire. Pour cela il a été nécessaire d'extraire les membranes tubulaires du muscle de rat. Dans un premier temps, différentes techniques de purification ont été testées pour isoler les deux fractions membranaires, sarcolemmienne et tubulaire, à partir de muscle de rat ou de lapin adulte. Ces fractions membranaires sont ensuite réincorporées dans des liposomes et les canaux ioniques étudiés par la technique de patch-clamp dans sa configuration de "patch-excisé".

Des canaux chlores ont été mis en évidence dans la fraction tubulaire avec une faible fréquence d'observation et une activité soumise à un run-down rapide. Dans les fractions sarcolemmiennes deux types de canaux chlore ont été observés correspondant respectivement à des conductances de 5 à 40 pS. Ces canaux chlores, tubulaires et sarcolemmiens, sont bloqués spécifiquement par l'acide anthracène-9-carboxylique (figure 3) (Rivet-Bastide et coll, 1993).





**Figure 3:** Tracés de courant chlore obtenu à partir de canaux chlores sarcolemmiens purifiés et réincorporés dans des liposomes. **A-** Courants obtenus en réponse à des dépolarisations successives. **B-** Courbe courant-potentiel obtenue à partir des tracés illustrés en A. **C-** Blocage des canaux chlores par le 9-AC.

En parallèle, une autre étude a été réalisée sur le muscle humain où nous avons caractérisé sur des cellules musculaires squelettiques en culture le rôle du cytosquelette dans la régulation des canaux chlore. Sur les trois types de canaux chlores présents sur cette préparation musculaire, de conductance différente, nous avons montré que le canal de conductance intermédiaire, prédominant sur ces cellules, est régulé par les variations de volume cellulaire. En jouant sur le volume cellulaire par réduction de l'osmolarité du milieu externe ou en altérant le cytosquelette des cellules par addition de molécules destructurantes, telles que la cytochalasine B ou la colchicine, le profil et la conductance de ce courant chlore sont significativement modifiés. Ces résultats ont démontré les interactions entre le réseau cytosquelettique et les canaux  $\text{Cl}^-$  de conductance intermédiaire.

*Ces travaux ont été publiés dans Pflügers Archiv : "Role of the cytoskeleton in the regulation of  $\text{Cl}^-$  channels in human embryonic skeletal muscle cell" (Häussler et coll, 1994).*

*Role of the cytoskeleton in the regulation of Cl channels  
in human embryonic skeletal muscle cells*

Häussler U, **Rivet-Bastide M**, Fahlke Ch, Müller D, Zachar E & Rüdell R (1994)

Pflügers Arch, 428, 323-330

## **II- Canaux ioniques et muscle cardiaque**

## **I- Régulation du courant calcique de type L sur le myocyte atrial humain**

A mon retour en France, j'ai intégré le laboratoire de Cardiologie cellulaire et moléculaire (INSERM U446) du Dr Fischmeister à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry dans le cadre d'un stage postdoctoral. Cette équipe s'intéressait depuis plusieurs années à la régulation des canaux calciques du myocyte cardiaque par les nucléotides cycliques intracellulaires (AMPc et GMPc). J'ai travaillé plus particulièrement sur le rôle de la voie du GMPc dans la régulation du courant calcique de type L sur des myocytes atriaux humains par la technique de patch-clamp.

Les cellules endothéliales de la paroi vasculaire des vaisseaux intracardiaques et de l'endocarde participent activement à l'activité contractile du muscle cardiaque par le biais de diverses substances libérées par les cellules endothéliales (Brutsaert, 1993). Parmi celles-ci, le monoxyde d'azote (NO) tient une place particulière. Synthétisé à partir d'un substrat, la L-arginine, par une enzyme spécifique, la NO synthase (eNOS) localisée dans les cellules endothéliales, le NO est un gaz très diffusible qui traverse la paroi vasculaire des vaisseaux intracardiaques et agit directement sur les myocytes cardiaques. Par la suite la eNOS a également été mise en évidence dans les myocytes cardiaques (Kelm & Schrader, 1988). Le NO en stimulant l'activité de la guanylate cyclase cytoplasmique (forme soluble, sGC), provoque une élévation de la concentration intracellulaire en GMPc. Le GMPc et l'AMPc jouent un rôle essentiel dans la régulation de la fonction myocardique comme seconds messagers des systèmes nerveux sympathique et parasympathique avec, entre autres comme cibles, les canaux calciques voltage-dépendants de type L. Leurs effets sont décrits comme opposés, effet stimulant pour l'AMPc et déresseur pour le GMPc. L'effet stimulant de l'AMPc a été bien décrit mais l'effet du GMPc était alors moins connu. Il avait été montré que le GMPc réduisait le flux de calcium à travers le sarcolemme, raccourcissait la durée du potentiel d'action et inhibait les potentiels d'action calcium-dépendants (Nawrath, 1977; Trautwein et coll, 1982; Bkaily & Sperelakis, 1985; Wahler & Sperelakis, 1985).

De précédents travaux effectués au laboratoire avaient montré sur des cellules cardiaques de grenouille et de rat que le NO provoquait une accumulation intracellulaire de GMPc qui agissait en intervenant sur différentes cibles selon l'espèce animale : la protéine kinase GMPc-dépendante (PK-GMPc) ; les phosphodiésterases stimulée (cGS-PDE ou PDE2) ou inhibée (cGI-PDE ou PDE3) par le GMPc qui avaient des effets inhibiteurs ou potentialisateurs

sur le courant calcique (Méry et coll, 1991; Méry et coll, 1993). Sur la base de ces résultats, notre étude avait pour but de caractériser, sur le cardiomyocyte atrial humain, la régulation du courant calcique par le NO et le GMPc car dans certaines conditions pathologiques telle que l'insuffisance cardiaque, la synthèse et la libération de NO peuvent être perturbées. Cette étude s'est faite en collaboration avec le Dr JJ Mercadier, CNRS URA 1159, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson (92). Des myocytes atriaux humains ont été obtenus par dissociation enzymatique de petits fragments de tissu de l'oreillette droite qui sont normalement réséqués lors de la mise en place de la circulation extracorporelle. Les courants calciques ont été enregistrés par la méthode du patch-clamp en configuration "cellule entière" et le SIN-1 (molsidomine, donneur de NO) utilisé pour provoquer une genèse *in vitro* de NO et une élévation intracellulaire de GMPc.

Nous avons pu démontrer que le SIN-1 dans une gamme de concentration nanomolaire provoque une augmentation du courant calcique basal, avec un effet maximal comparable à celui obtenu en présence d'isoprénaline et sans que les propriétés voltage-dépendantes du courant ne soient modifiées. A la différence du cœur de grenouille ou de rat, la stimulation préalable de la voie de l'AMPc n'est pas nécessaire. Lorsqu'un inhibiteur de la GI-PDE (milrinone) est appliqué une potentialisation du courant calcique basal est observée mais qui ne s'additionne pas à celle obtenue avec le SIN-1 suggérant que cette potentialisation du courant passe par l'inhibition GMPc-dépendante de la phosphodiesterase GI-PDE en réponse à la production de NO. L'inhibition de cette enzyme a pour conséquence de limiter la dégradation de l'AMPc et donc de favoriser la phosphorylation des canaux calciques dans le myocyte atrial humain. Ces résultats différaient de ceux observés sur le cœur de grenouille et de rat où à l'état basal, aucune potentialisation du courant calcique n'était observée suggérant soit que le taux basal d'AMPc est plus élevé sur les cardiomyocytes humains soit que le couplage GI-PDE/canaux calciques est plus performant.

Suite à ce premier travail, nous avons recherché d'autres cibles potentielles du GMPc sur les myocytes cardiaques humains et nous nous sommes intéressés à la phosphodiesterase stimulée par le GMPc (GS-PDE). Nous disposions pour cela d'un inhibiteur sélectif l'EHNA (erythro-9-[2-hydroxy-3-nonyl]adénine), qui nous a permis de mettre en évidence que le blocage de la GS-PDE sur le myocyte atrial humain induisait une augmentation significative du courant calcique basal sans en modifier les propriétés voltage-dépendantes. La stimulation de GS-PDE nécessite la présence de GTP intracellulaire comme substrat de la guanylate cyclase. Les deux PDE inhibée ou stimulée par le GMPc étaient donc capables de moduler le courant calcique à haut seuil, ICa, L. Lorsque du GMPc était appliqué intracellulairement par l'intermédiaire de la

pipette, une augmentation de l'amplitude du courant calcique était observée suggérant donc que l'effet inhibiteur du GMPc sur la GI-PDE était prédominant sur l'effet stimulateur du GMPc sur la GS-PDE. Cette activité basale des phosphodiésterases GI-PDE et GS-PDE s'est révélée spécifique des myocytes humains puisque ces résultats n'ont pas été retrouvés sur le cœur de rat que ce soit sur les cellules atriales ou ventriculaires. Cette spécificité humaine pourra avoir son importance dans certaines cardiopathies telle que l'hypertrophie ou l'insuffisance cardiaque où la production de NO et de GMPc est modifiée.

*Ces travaux ont été publiés dans Journal of Clinical Investigation : "Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes" Kirstein et coll, 1995; "cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes" Rivet-Bastide et coll, 1997.*

*Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes*

Kirstein M, **Rivet-Bastide M**, Benardeau A, Hatem S, Mercadier JJ, Fischmeister R  
(1995)

Journal of Clinical Investigation, 95, 794-802.

*cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes*

**Rivet-Bastide M**, Vandecasteele G, Hatem S, Verde I, Bénardeau A, Mercadier JJ,

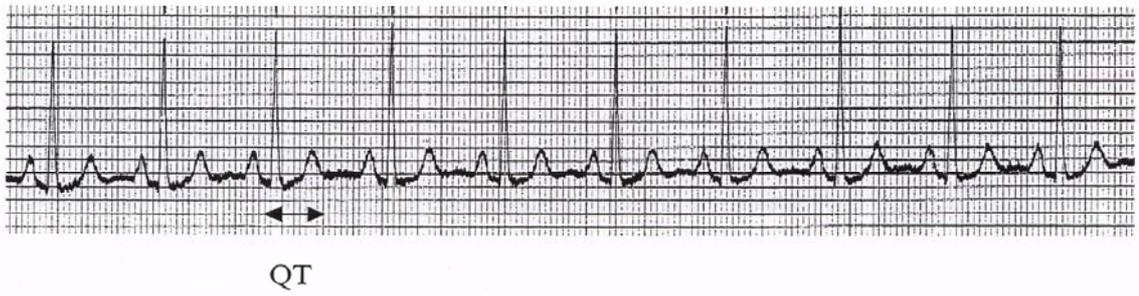
R Fischmeister (1997)

Journal of Clinical Investigation, 99 (11) 2710-2718

## **II- Implication des canaux ioniques dans les troubles du rythme d'origine iatrogène**

Un allongement de la repolarisation ventriculaire, visualisé sur l'électrocardiogramme de surface (ECG) par un allongement de l'intervalle QT, peut annoncer une arythmie ventriculaire polymorphe, appelée torsades de pointes, potentiellement létale qui peut elle-même dégénérer en fibrillation ventriculaire (figure 4) (Dessertenne et coll, 1996). L'appréciation d'un prolongement de l'intervalle QT est un facteur diagnostique très utilisé pour évaluer le risque cardiaque de diverses pathologies congénitales (syndrome du QT long) ou acquises et d'un grand nombre de médicaments de classes thérapeutiques différentes (psychotropes, antihistaminiques, antibiotiques, prokinétique,...). Le nombre d'évènements tragiques, consécutifs à un allongement de l'intervalle QT par des médicaments (syndrome du QT long acquis) à visée non cardiaque, est heureusement extrêmement faible. Cependant ce risque est difficilement tolérable pour un médicament qui n'est pas indispensable à la vie du patient, en particulier s'il peut être remplacé par un médicament sans danger. Cet effet indésirable résulte de mécanismes pharmacologiques différents de ceux qui sont responsables de son activité thérapeutique et est la conséquence directe ou indirecte d'un effet sur l'électrogénèse cardiaque qu'il est possible de visualiser expérimentalement par l'étude du potentiel d'action. L'allongement de la durée du potentiel d'action est la conséquence d'une augmentation des courants entrants et/ou d'une diminution des courants sortants qui se traduit sur l'ECG de surface par un allongement de l'intervalle QT. La relation entre le potentiel d'action et l'ECG permet d'extrapoler, avec prudence, les évènements induits sur le potentiel d'action aux évènements enregistrés sur l'ECG (figures 5 et 6).

A



B

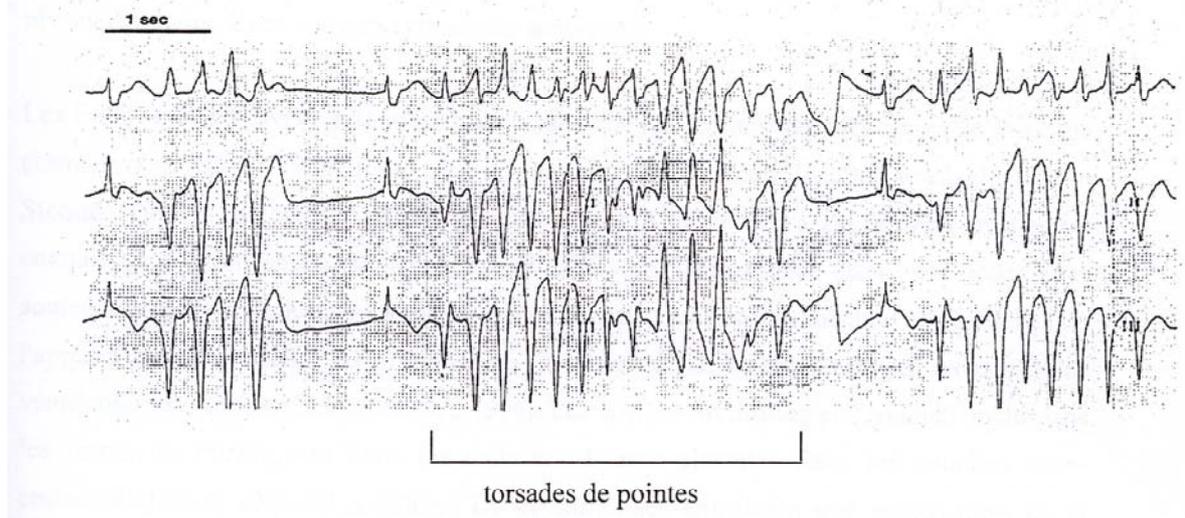


Figure 4: A- Tracé d'ECG normal; B- tracé de torsades de pointe.

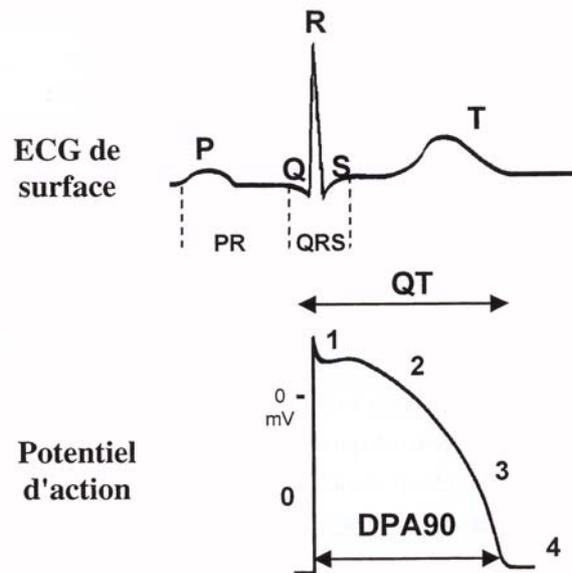
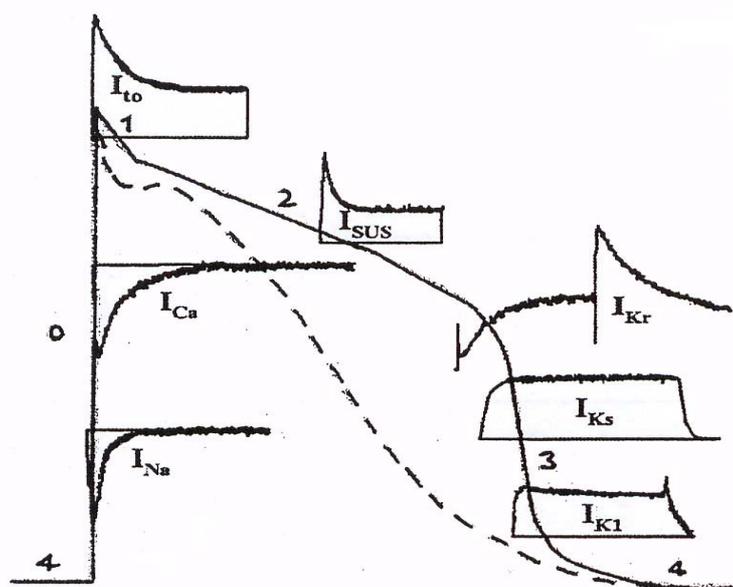


Figure 5: Tracé d'ECG de surface et de potentiel d'action.



**Figure 6:** Potentiel d'action cardiaque et les courants ioniques qui le sous-tendent.

Chez les patients souffrant d'un syndrome de QT long acquis, tout médicament provoquant un allongement de l'intervalle QT est donc à proscrire. Même si un tel événement survient rarement car différentes circonstances doivent être réunies, surdosage, interactions médicamenteuses, facteurs de risque cardiaque associés (bradycardie, hypokaliémie, ischémie, fibrillation auriculaire), insuffisance rénale ou hépatique, âge, sa gravité nécessite de détecter systématiquement à un stade précoce du développement d'un nouveau médicament s'il possède intrinsèquement une capacité à retarder la repolarisation ventriculaire cardiaque.

Depuis 1997, il est obligatoire pour l'évaluation des médicaments de réaliser des études électrophysiologiques au cours du programme de recherche et développement (« screening »). Cette recherche doit se faire à la fois sur la molécule princeps, ses énantiomères et sur ses principaux métabolites. Depuis plusieurs années, le Laboratoire de Pharmacologie étudiait les troubles du rythme cardiaque d'origine iatrogène, par la technique de la microélectrode intracellulaire permettant l'enregistrement du potentiel d'action sur des préparations multicellulaires cardiaques (ventricule ou tissu de Purkinje) par Mme le Dr Adamantidis. Ses travaux ont donné lieu à de nombreuses publications et ont permis de mettre en évidence la potentialité de certains médicaments non cardiotropes à engendrer un trouble du rythme. Pour approfondir et compléter ces travaux, il était nécessaire d'analyser ces effets sur les différents courants ioniques sous-tendant le potentiel d'action (figure 6). Après avoir mis en

place la technique de patch-clamp et les préparations de cellules isolées, différents projets ont pu être développés afin d'étudier l'effet de l'administration de médicaments, déjà commercialisés ou en cours de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché, et suspectés de pouvoir occasionner des troubles du rythme sur le potentiel d'action et les courants ioniques des myocytes cardiaques.

Trois médicaments, représentant de grandes classes médicamenteuses ou ayant provoqué des effets indésirables particulièrement graves ont ainsi été étudiés : (i) le cisapride, médicament de la motilité digestive ; (ii) la clarithromycine, antibiotique de la classe des macrolides ; (iii) la rispéridone, un neuroleptique. Ces travaux ont fait l'objet de la thèse d'Université de Pascale Gluais soutenue en 2002.

## **A- Etude des effets de médicaments non cardiotropes sur la repolarisation cardiaque des tissus auriculaire, ventriculaire et de Purkinje de lapin.**

### **1- Etude du cisapride (stimulant de la motricité digestive)**

Médicament fréquemment prescrit dans les cas de reflux gastro-oesophagien (bébés), gastroparésie, oesophagite, le cisapride (Prépulsid®) a induit un nombre significatif de cas d'allongements de l'intervalle QT et de déclenchement de Torsades de Pointe. Il avait été montré au laboratoire sur des fibres de Purkinje de lapin que le cisapride allongeait de façon majeure la durée de potentiel d'action (Puisieux et coll, 1996). D'autres travaux ont mis en évidence son effet inhibiteur sur le courant sortant retardé natif IKr ou cloné HERG (Carlsson et coll, 1997 ; Mohammad et coll, 1997 ; Rampe et coll, 1997 ; Drolet et coll, 1998).

Une analyse plus fine combinant l'enregistrement du potentiel d'action et des courants ioniques a été entreprise sur le myocarde ventriculaire de lapin afin de préciser les mécanismes responsables de cet effet. Par comparaison avec l'action d'inhibiteurs classiques des courants potassiques, nous avons pu montrer l'effet "use-dependent" du cisapride sur la durée du potentiel d'action ainsi que son effet inhibiteur sur le courant rectifiant entrant  $I_{K1}$ . Ces résultats obtenus avec des concentrations cliniquement pertinentes sont en accord d'une part avec l'affinité déjà décrite du cisapride vers les canaux HERG à l'état ouvert et/ou inactivé et d'autre part avec sa potentialité arythmogène. L'effet inhibiteur du cisapride sur  $I_{K1}$  a été observé pour des concentrations relativement importantes, supérieures aux concentrations thérapeutiques mais cependant compatibles avec un surdosage et à l'IC<sub>50</sub> sur HERG.

L'ensemble de cette étude a démontré l'effet use-dependent du cisapride sur différents mécanismes électrophysiologiques (Dumotier et coll, 2001, publication 23). Au niveau cellulaire, l'action bloquante sur les conductances potassiques particulièrement sur le canal rectifiant retardé, la survenue de post dépolarisations précoces (IKr) permettent d'expliquer au niveau du ventricule entier les allongements de l'intervalle QT et la survenue d'arythmies ventriculaires (torsades de pointes). De nombreuses restrictions ont donc été apportées à la prescription du cisapride (voir VIDAL®) particulièrement dans le cadre d'associations avec d'autres médicaments inhibant la voie métabolique du cisapride via le cytochrome P450 3A4 (antifongiques azotés, macrolides, antiprotéases...) et dans certaines situations telles que l'hypokaliémie, l'hypomagnésémie, la bradycardie, le QT long congénital. Toutes ces conditions favorisent la genèse de troubles du rythme ventriculaire par surdosage de cisapride dans l'organisme ou en créant des conditions à risque.

## **2- Etude de la clarithromycine (macrolide)**

Cet antibiotique de la classe des macrolides est communément prescrit dans le cadre de traitement d'infections de la sphère ORL, d'ulcère de l'estomac. Des allongements de l'intervalle QT et le déclenchement de torsades de pointe ont été décrits chez plusieurs patients après administration de clarithromycine (Naxy® et Zéclar®). D'un point de vue mécanisme d'action, une seule étude avait décrit la réduction du courant potassique via le canal HERG, canal porteur du courant  $I_{Kr}$  natif (Abbott et coll, 1999).

Nos travaux ont démontré au niveau des fibres de Purkinje et du myocarde atrial et ventriculaire de lapin les effets d'allongement de la clarithromycine sur le potentiel d'action. Cet allongement de la durée du potentiel d'action se retrouve aux différents étages du cœur avec une efficacité décroissante des fibres de Purkinje > ventricule >atrium droit. L'effet d'allongement observé avec nos concentrations expérimentales (0,01 à 3  $\mu$ M) est tout à fait compatible avec les concentrations plasmatiques mesurées chez les patients déclenchant des effets arythmogènes et corrélé avec la réduction significative de  $I_{Kr}$  mis en évidence sur les myocytes ventriculaires pour de faibles concentrations (0,03 – 0,3  $\mu$ M) alors que les courants Ito et  $I_{K1}$  se sont révélés moins sensibles (30  $\mu$ M). Ces travaux suggèrent que l'effet inhibiteur de la clarithromycine sur IKr participe à la prolongation de l'intervalle QT observés chez certains patients (*Gluais et coll, 2003a, publication 26*).

### **3- Etude de la rispéridone (neuroleptique)**

La rispéridone (Risperdal®) est un médicament antipsychotique prescrit dans le traitement de certaines psychoses comme la schizophrénie. Mais relativement rapidement après son introduction en clinique, des cas d'allongement de l'intervalle QT ont été décrits suite à un surdosage chez des patients présentant un déséquilibre électrolytique (hypokaliémie), sans déclenchement de torsades de pointe.

Nous avons recherché les effets directs de la rispéridone sur le potentiel d'action et les courants potassiques. La rispéridone induit un allongement concentration-dépendant de la durée du PA sur le ventricule et les fibres de Purkinje de lapin, avec une potentialisation de cet allongement à faible fréquence de stimulation, effet caractéristique dit de classe III par analogie avec les antiarythmiques de classe III décrits par Vaughan-Williams. Sur les myocytes ventriculaires nous avons mis en évidence un effet inhibiteur significatif du courant  $I_{Kr}$  avec une réduction de 55% obtenue à 0,3  $\mu\text{M}$  ce qui compte-tenu du volume de distribution et de la concentration thérapeutique plasmatique mesurée chez l'homme (0,17  $\mu\text{M}$ ) est une dose cliniquement pertinente. En revanche les courants potassiques transitoires ( $I_{to}$ ) et rectifiant entrant ( $I_{K1}$ ) se sont révélés beaucoup moins sensibles puisqu'une concentration 100 fois supérieure (très improbable chez un patient) était nécessaire afin d'obtenir une réduction significative de ces courants.

*Ces travaux ont été publiés dans European Journal of Pharmacology "Risperidone prolongs cardiac action potential through reduction of  $K^+$  currents in rabbit myocytes". Gluais et coll, 2002.*

### **B- Etude des effets de médicaments non cardiotropes sur la repolarisation cardiaque du tissu atrial humain**

La détection de la potentialité arythmogène d'un médicament, réalisée sur des tissus prélevés chez des animaux, pose toujours le problème de la pertinence du modèle vis-à-vis des observations relevées en clinique humaine. L'extrapolation des résultats expérimentaux aux situations cliniques reste donc une étape délicate, c'est pourquoi nous avons souhaité étudier le retentissement des médicaments précédemment étudiés (clarithromycine et rispéridone) sur du tissu cardiaque humain pour tenter de s'affranchir ou du moins de réduire les difficultés d'extrapolation interspèce. Grâce à la collaboration du Dr D. Grandmougin et du Dr G. Fayad

du Service de Chirurgie Cardiovasculaire de l'Hôpital Cardiologique du CHR&U de Lille, nous avons eu accès à des biopsies atriales humaines, pièces de l'oreillette droite normalement réséquées lors de la mise en place de la circulation extracorporelle, et, bien qu'en quantité moindre, à des biopsies ventriculaires gauches obtenues lors du remplacement de valve mitrale. Ces biopsies humaines ont été utilisées pour l'étude du potentiel d'action (atrial et ventriculaire) ou soumises à une dissociation enzymatique pour une étude en patch-clamp.

### **1- Etude de la clarithromycine**

La potentialité arythmogène de la clarithromycine mise en évidence chez le lapin a été recherchée sur les préparations cardiaques humaines. Aucune modification significative de la durée du potentiel d'action ventriculaire n'a pu être enregistrée, alors qu'au niveau atrial une tendance à l'allongement semble se dessiner. Sur les cellules atriales humaines, deux types de courant sont présents,  $I_{to}$ , à inactivation rapide, sensible à de fortes concentrations de 4-aminopyridine, et  $I_{sus}$ , à inactivation très lente, sensible à de faibles concentrations de 4-aminopyridine.  $I_{to}$  et  $I_{sus}$  montrent également une sensibilité différente à la clarithromycine, faible pour  $I_{to}$  (100  $\mu\text{M}$ ) et 10 fois plus importante et compatible avec un usage clinique pour  $I_{sus}$  (10  $\mu\text{M}$ ). Ce dernier essentiellement porté par les canaux  $Kv1.5$  n'étant pas fonctionnel sur les cellules ventriculaires, son inhibition ne peut donc pas être responsable des troubles du rythme ventriculaire observé en clinique. L'absence d'effet d'allongement de la durée du PA ventriculaire observée ici est surprenante car un effet inhibiteur a été mis en évidence sur le canal HERG (Volberg et coll, 2002). La difficulté d'obtenir des préparations de myocytes ventriculaires humains viables ne nous a pas permis de réaliser une étude directe sur ces cellules du courant  $I_{Kr}$  par patch-clamp. Cette étude montre qu'en dépit d'un effet électrophysiologique direct de la clarithromycine d'autres facteurs prédisposants doivent être réunis pour que des troubles du rythme létaux soient induits (*Gluais et coll, 2003b, publication 27*).

L'effet d'allongement du PA et l'effet inhibiteur de la clarithromycine sur  $I_{Kr}$  observés chez le lapin n'ont pas été retrouvés ici et peuvent être significatifs de la plus grande sensibilité de cette espèce par rapport au tissu humain et laisse supposer que d'autres facteurs doivent intervenir dans le déclenchement des activités arythmogènes chez l'homme telle qu'une pathologie ou un traitement concomitant.

## **2- Etude de la rispéridone**

Des études sur tissus cardiaques animaux (cobaye, chien, lapin) ont montré la potentialité de la rispéridone à allonger la durée du PA et à inhiber le courant potassique  $I_{Kr}$  (Magyar et coll, 2002). Dans nos conditions nous avons observé un allongement significatif de la durée du potentiel d'action sur les préparations atriales et une tendance sur les préparations ventriculaires mais celles-ci sont trop peu nombreuses pour une étude statistique. Cependant l'allongement de la durée du PA ventriculaire observé est tout à fait compatible avec les concentrations connues pour bloquer le canal HERG. Sur les courants potassiques présents au niveau atrial,  $I_{sus}$  s'est révélé plus sensible que Ito mais pour des concentrations 10 à 100 fois plus élevées que les concentrations plasmatiques observées en conditions cliniques. Le fait que  $I_{sus}$  soit sensible à la rispéridone chez l'homme et non chez le lapin peut être dû au fait que sa sélectivité varie avec l'espèce à savoir que chez le lapin ce courant est porté par des ions  $Cl^-$  et non par des ions  $K^+$ .  $I_{K1}$  n'est pas modifié ce qui concorde avec l'absence d'effet sur la valeur du potentiel de repos et l'amplitude du PA.

*Ces travaux ont été publiés dans European Journal of Pharmacology "Risperidone reduces  $K^+$  currents in human atrial myocytes and prolongs repolarization in human myocardium" Gluais et coll, 2004.*

## **C- Modifications de l'électrogénèse cardiaque dans l'insuffisance cardiaque sur un modèle porcin**

L'insuffisance cardiaque (IC) est reconnue comme un problème majeur de Santé Publique qui s'aggrave dans les pays industrialisés en raison du vieillissement de la population. L'insuffisance cardiaque est classiquement définie comme une inaptitude du cœur à fournir un débit correspondant aux besoins normaux de l'organisme. En France, on estime le nombre d'insuffisants cardiaques (IC) entre 500 000 et 1 million, aux Etats-Unis entre 4 et 5 millions, cette incidence augmentant avec l'âge. 35 à 45% des patients souffrant d'insuffisance cardiaque, meurent soudainement sans qu'il ne soit mis en évidence de détériorations hémodynamiques ou fonctionnelles. Il est connu qu'un remodelage électrique se produit au cours du développement de cette pathologie, se traduisant par un allongement de la repolarisation qui pourrait participer à la survenue d'arythmies ventriculaires. Parmi les principales causes évoquées, la tachycardie ventriculaire dégénérant en fibrillation ventriculaire serait à l'origine de la moitié des morts

soudaines (Pogwizd & Bers, 2004). Le remodelage électrique qui se produit au cours de l'IC peut contribuer à instituer cette instabilité électrique, favoriser les phénomènes de réentrée et donner lieu à des activités déclenchées. Parmi les mécanismes invoqués, nous pouvons citer :

- l'allongement non uniforme de la durée du potentiel d'action dans les différentes couches de cellules,
- la modification du profil du PA,
- la diminution des courants potassiques, variable selon les espèces et le canal incriminé,
- l'altération de l'homéostasie calcique,
- l'altération de l'expression et de la fonction de la Na/K-ATPase, de l'expression du courant de pacemaker,  $I_f$ , de l'expression des jonctions gap telle la connexine Cx43

Le professeur D. Lacroix a développé au sein du laboratoire un modèle d'étude des troubles de la repolarisation sur cœur isolé-perfusé de porc par étude de la conduction transmurale par cartographie (de l'épicarde jusqu'à l'endocarde), et par recueil du potentiel d'action au niveau de l'épicarde et de l'endocarde (Lacroix et coll, 1998 et 1999). Suite à la validation de ce modèle d'étude sur cœur de porc sain, ses travaux se sont prolongés par le développement d'un modèle d'IC induit par pacing rapide chez le porc. En parallèle de ces études cartographiques et échocardiographiques, nous avons développé une étude électrophysiologique par patch-clamp des myocytes ventriculaires épicaudiques, midmyocardiques et endocardiques isolés à partir de cœurs IC pour étudier les différents courants potassiques et leurs altérations en comparaison de myocytes issus de cœur de porc sain. Nous avons confirmé l'allongement de la durée du PA sur ce modèle d'IC et mis en évidence une disparition du gradient transmural de repolarisation avec une diminution de la densité de la composante de courant transitoire  $I_{to1}$  dans les différentes couches de tissus avec une perte de son gradient chez les animaux IC ainsi qu'une diminution de la densité de  $I_K$ , le courant rectifiant retardé, dans les trois types de cellules.

*Ces travaux ont été publiés dans Cardiovascular Research : "Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy" Lacroix et coll, 2002.*

## D- Conclusion

Les études électrophysiologiques expérimentales réalisées sur tissu animal et particulièrement le lapin permettent de mettre en évidence de manière assez sensible la potentialité arythmogène d'un médicament. En ce qui concerne la durée du PA, le tissu cardiaque de lapin apparaît comme très sensible puisque les effets observés apparaissent à des concentrations toujours plus faibles que celles observées sur le tissu humain, ce qui justifie l'utilisation de cette espèce dans les tests d'AMM. Ces études, obligatoires dans la constitution d'un dossier de demande d'AMM, permettent dorénavant de réduire le développement de médicament à potentialité arythmogène et la diffusion au niveau du Vidal® de contre-indications absolues ou d'associations déconseillées. En ce qui concerne les courants, les résultats sont identiques en ce qui concerne l'effet sur  $I_{to}$  et  $I_{K1}$  entre le lapin et l'homme. En revanche nous n'avons pas de point de comparaison en ce qui concerne l'effet sur  $I_{Kr}$  car il est difficile à mesurer sur les cellules atriales humaines bien qu'il soit présent. Cette difficulté d'enregistrement de  $I_{Kr}$  a été retrouvée par d'autres équipes aussi bien sur les cellules atriales que ventriculaires humaines et pourrait être due à une sensibilité particulière des canaux  $I_{Kr}$  au protocole de dissociation enzymatique.

Le modèle d'IC réalisé chez le porc apporte la possibilité technique de tester des substances et des médicaments sur un modèle pathologique largement répandu dans la population et d'en observer les conséquences particulières. Quant à l'extrapolation de ces résultats chez l'homme, elle n'est pas dénuée d'une certaine imprécision de par la différence de métabolisme, de l'état physiologique ou pathologique du sujet, de son âge, de la prise concomitante d'autres traitements ou de la pharmacocinétique du produit. Toutes ces données doivent être confrontées afin d'établir si les concentrations expérimentales sont compatibles avec les concentrations plasmatiques relevées chez les patients. Cependant, l'étude sur tissus cardiaques humains, présentée ici, montre des limites techniques à la fois dans la qualité des préparations qui sont fragiles, difficiles à obtenir et provenant de patients prenant des traitements thérapeutiques qui peuvent interférer avec les résultats expérimentaux. Ces préparations ne permettant pas de rendre compte des effets bloqueurs possibles sur  $I_{Kr}$ , lesquels sont potentiellement les plus "à risque". De plus en plus d'investigations sont maintenant réalisées sur le canal HERG, ré-exprimé dans des lignées cellulaires, par des techniques de patch-clamp automatisé spécifiquement développé pour des études de "screening pharmacologique". Cette dernière technique présente elle-même des limites car elle est encore plus éloignée de la situation *in vivo*, et peut induire une éviction systématique et peut-être abusive d'une molécule inhibitrice

de  $I_{Kr}$ . Enfin, la poursuite ou l'arrêt du développement d'un médicament doit tenir compte de la notion bénéfice/risque par rapport aux thérapeutiques existantes. En effet, un allongement raisonnable de l'intervalle QT peut être considéré comme acceptable s'il s'agit d'un médicament innovant pour des pathologies lourdes alors qu'il devient inacceptable pour un médicament traitant de troubles mineurs ou des pathologies nécessitant un traitement au long cours, en particulier s'il existe déjà d'autres médicaments qui ne présentent pas cet effet indésirable.

*Risperidone prolongs cardiac action potential through reduction of K<sup>+</sup> currents in rabbit myocytes*

Gluais P, **Bastide M**, Caron J, Adamantidis M. (2002)

European Journal of Pharmacology, 444, 123-132

*Risperidone reduces  $K^+$  currents in human atrial myocytes and prolongs repolarization in human myocardium*

Gluais P, **Bastide M**, Grandmougin D, Fayad G, Adamantidis M (2004)

European Journal of Pharmacology, 497, 215-222.

*Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences*  
*in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy*

Lacroix D, Gluais P, Marquié C, D'Hoinne C, Adamantidis M, **Bastide M** (2002)

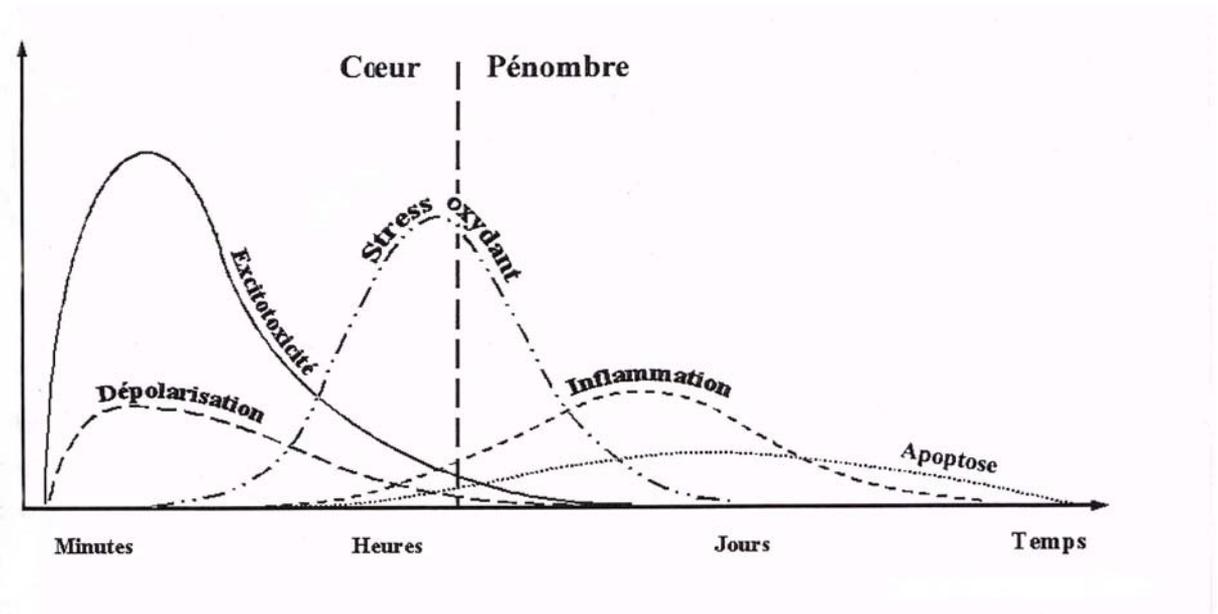
Cardiovascular Research, 54, 42-50

# **III- Canaux ioniques et paroi vasculaire cérébrale**

Le laboratoire de Pharmacologie, sous l'impulsion de Régis Bordet, a, depuis 1997, développé une thématique de recherche consacrée à l'ischémie cérébrale dans ses aspects physiopathologiques et thérapeutiques. Ces deux aspects sont indissociables puisque c'est sur une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques que peut s'ancrer une stratégie de recherche de nouvelles cibles pharmacologiques.

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent un des problèmes majeurs de Santé Publique avec une incidence estimée en France entre 2 et 3 pour 1000 habitants et par an (soit 100 000 à 150 000 nouveaux cas chaque année) dont 80% résultent d'un accident vasculaire cérébral de type ischémique, 15% d'une hémorragie intra parenchymateuse et 5% d'une hémorragie méningée. Parallèlement au vieillissement de la population, le nombre d'AVC augmente avec près de 75% des patients ayant plus de 65 ans. Les AVC représentent la 3<sup>e</sup> cause de mortalité, la 1<sup>ère</sup> cause de handicap et la 2<sup>e</sup> cause de démence. Plus de la moitié des patients ayant eu ce type d'accident en garderont un handicap physique, cognitif ou psychologique permanent qui rendra leur vie difficile et nécessitera un ré-apprentissage des gestes quotidiens grâce à une rééducation parfois éprouvante. Le pronostic de l'AVC dépend pour beaucoup de l'importance de l'accident, de la zone du cerveau atteinte, du développement d'un œdème, de la rapidité de la prise en charge dans une unité spécialisée. Dans les accidents de type ischémique, l'interruption ou la réduction du débit sanguin par l'obstruction d'un vaisseau par un caillot sanguin provoque une hypoxie et une diminution de l'apport en métabolites qui entraînent la mort des cellules. Le caillot peut se former localement ou venir du cœur ou d'une lésion de la paroi des grosses artères (carotides ou vertébrales). Dans les accidents de type hémorragique, l'extravasation sanguine par rupture d'un vaisseau cause une destruction du parenchyme cérébral, l'importance de l'hématome déterminant la gravité de l'AVC.

Dans les AVC dus à un phénomène occlusif, la taille de l'embolie, sa composition, la disponibilité d'une circulation de suppléance et la rapidité de recanalisation après lyse du caillot sont les principaux facteurs qui déterminent l'étendue de l'infarctus. Les travaux de ces dernières années ont permis de mieux appréhender l'extrême diversité des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans l'ischémie cérébrale. Au cours d'un AVC, deux zones vont se différencier: le cœur de l'ischémie où le débit sanguin est devenu très faible suite à l'occlusion artérielle et la zone de pénombre, périphérique, où le débit sanguin est juste suffisant pour assurer transitoirement la survie des cellules.



**Figure 7:** Evolution des mécanismes impliqués dans l'ischémie cérébrale en fonction du temps (d'après Dirnagl et coll, 2000)

Dans ces deux zones, les mécanismes délétères vont se mettre en place dans le temps (figure 7). Dans le cœur de l'infarctus, les cellules vont être le siège d'une nécrose irréversible si la réduction du débit sanguin est supérieure à 3 minutes en raison de phénomènes d'excitotoxicité médiée par le glutamate et le calcium et de vagues de dépolarisation qui se propagent (dépolarisations péri-infarctus). Au sein de la zone de pénombre va se mettre en place un phénomène d'apoptose qui conduit à la mort cellulaire selon un processus organisé (phases d'initiation, de décision, de dégradation et de phagocytose) et qui met en jeu la modulation de gènes pro- et anti-apoptotiques. La balance entre ces protéines représente la capacité de décision de la cellule à survivre ou mourir. Ces dommages peuvent être réversibles si une reperfusion précoce est mise en place et cette zone de pénombre représente donc un intérêt thérapeutique évident même si l'explosion du stress oxydant et l'activation des voies de l'inflammation se produisant notamment au moment de la reperfusion vont majorer ces lésions tissulaires.

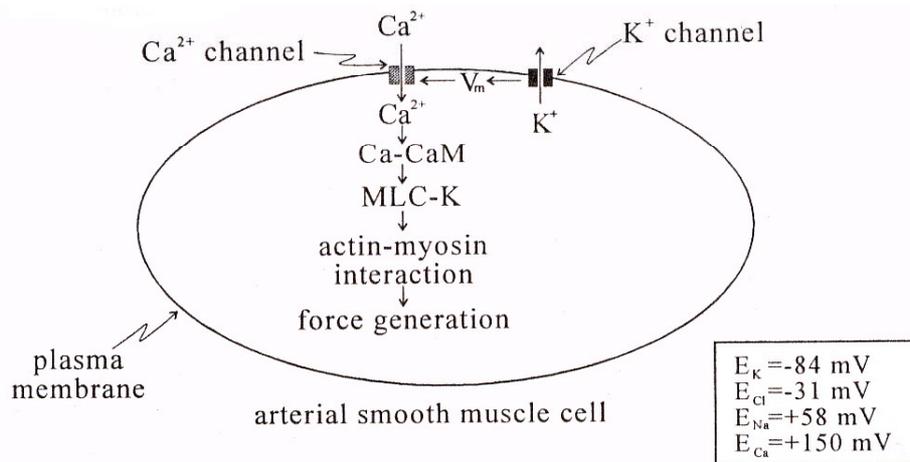
Les traitements des AVC sont peu nombreux à l'heure actuelle et reposent essentiellement, à la phase aiguë, dans la thrombolyse (rt-PA) réservée à un nombre restreint de patients répondant à des critères stricts, dans l'administration d'anticoagulants ou d'antioedémateux. En parallèle, un important travail de prévention est effectué et va se développer de plus en plus dans les années à venir car les facteurs de risque de survenue de ces AVC sont mieux définis et peuvent être pris en charge. Parmi ceux-ci peuvent être cités l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, le diabète, la consommation d'alcool, de tabac,

les cardiopathies, la prise d'hormones oestroprogestatives, la sédentarité,... La prise en charge de ces facteurs de risque par des traitements médicamenteux ou une meilleure hygiène de vie ont considérablement diminué le nombre d'AVC mais il reste primordial à l'heure actuelle d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques de la phase aiguë pour soigner les patients. Les travaux développés au sein de notre laboratoire se sont centrés sur cette thématique depuis 1997 par différentes approches expérimentales complémentaires dans le but de mieux comprendre les mécanismes pathologiques des AVC pour mieux les prévenir ou en réparer les conséquences. Je me suis intéressée plus particulièrement au rôle joué par le vaisseau cérébral dans le développement de cette pathologie en le considérant comme acteur dans les mécanismes physiopathologiques et comme cible thérapeutique potentielle.

## **I- Paroi vasculaire et contrôle du débit sanguin cérébral**

L'ischémie cérébrale est une pathologie qui touche le tissu neuronal mais aussi le tissu glial et les vaisseaux, ces trois composantes constituant une unité fonctionnelle, l'unité neuroglivasculaire. Les vaisseaux sont le point de départ de l'accident vasculaire cérébral ischémique puisque de leur obstruction naît le développement de l'infarctus. En parallèle des nombreuses études relatives aux mécanismes délétères affectant le tissu neuronal et glial, les altérations du vaisseau suite à l'ischémie apparaissent comme autant de cibles d'intérêt à explorer et comprendre. Nous avons développé spécifiquement un axe de recherche sur le vaisseau cérébral, d'une part, en développant une étude électrophysiologique du muscle lisse vasculaire, et d'autre part, une étude fonctionnelle du vaisseau par des techniques de vasomotricité. Les analyses d'électrophysiologie et de vasomotricité sont étroitement coordonnées dans les différentes publications issues des travaux qui vont être présentés car elles nous ont permis d'étudier les mêmes fonctions à deux niveaux d'organisation (cellulaire versus multicellulaire).

Le muscle lisse vasculaire, de par ses propriétés contractiles, joue un rôle essentiel dans la régulation et le maintien de la pression sanguine. Dans la circulation cérébrale, le tonus vasculaire est régulé par différents mécanismes parmi lesquels les canaux potassiques du muscle lisse (contrôle du potentiel de membrane), les facteurs d'origine endothéliale et le tonus myogénique (pour revue, Faraci & Heistad, 1998). D'un point de vue mécanistique, l'état de contraction et de relaxation du muscle lisse est conditionné par la concentration en calcium libre cytoplasmique, la sensibilité au calcium de la machinerie contractile et la phosphorylation des chaînes légères de la myosine (figure 8).

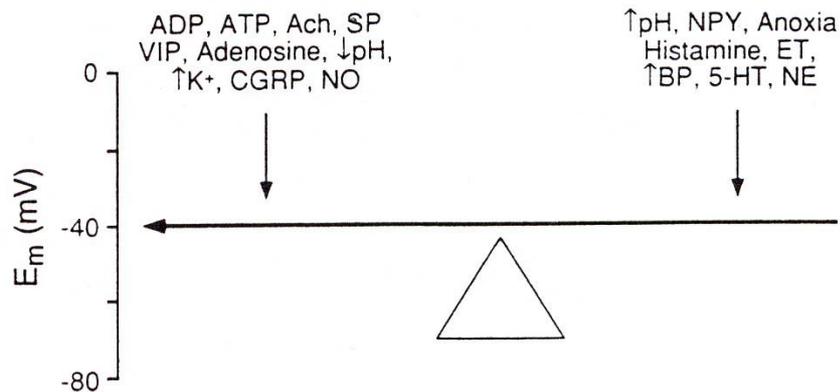


d'après Nelson & Quayle (1995)

**Figure 8:** Rôle du potentiel de membrane dans la régulation du tonus musculaire artériel

### A- Contrôle du tonus musculaire par les canaux potassiques

Le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses est un déterminant majeur des concentrations en calcium libre cytoplasmique et donc un important régulateur du tonus et du diamètre artériel. Sa valeur mesurée *in vitro* sur des artères cérébrales se situe dans une gamme de potentiels allant de  $-36$  à  $-54$  mV selon les conditions expérimentales et l'artère considérée, ce qui signifie qu'il n'est pas seulement contrôlé par la conductance potassique ( $E_K^+ \approx -85$  mV). Cependant une faible activité des canaux potassiques suffit à modifier le potentiel de membrane et à induire d'importantes variations du diamètre des artères (Nelson & Quayle, 1995). Leur ouverture, en provoquant un efflux d'ions potassium de la cellule, hyperpolarise la membrane et entraîne la fermeture des canaux calciques voltage-dépendants, diminuant l'entrée de calcium dans la cellule et induisant une relaxation des fibres musculaires lisses. De nombreux stimuli vasoactifs modifient la valeur du potentiel de membrane (ATP, ADP, ACh, acidose, calcitonine gene-related peptide CGRP, nitric oxide (NO), ouvreurs ou inhibiteurs de canaux potassiques, endothéline, histamine, norépinéphrine, alcalose,...) et agissent *in fine* via l'activation des canaux ioniques de type potassique, calcique, chlore, cationique présents sur les cellules musculaires lisses des artères cérébrales (figure 9).



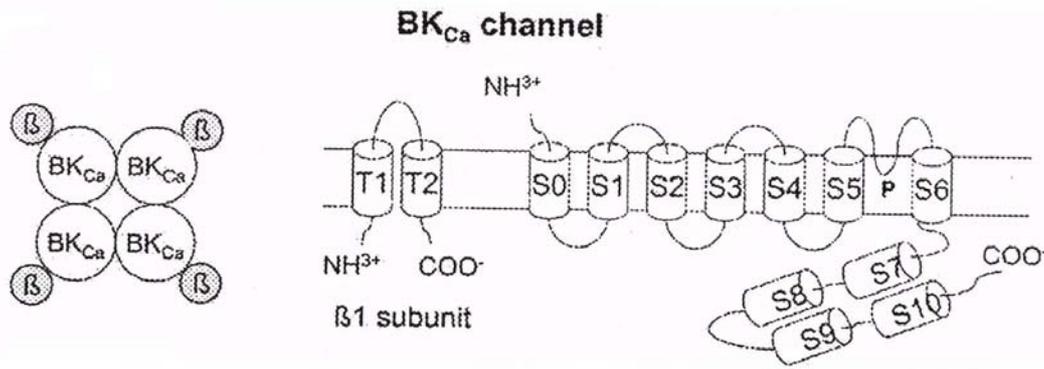
d'après Faraci & Sobey, 1998

**Figure 9:** Effets de différents stimuli vasoactifs sur le potentiel de membrane.

Cinq types de canaux potassiques ont été mis en évidence sur les artères cérébrales de résistance par des techniques de patch-clamp et de vasoréactivité *in vitro* et *in vivo* et de techniques de biologie moléculaire (Nelson & Quayle, 1995; Blondeau et coll, 2005).

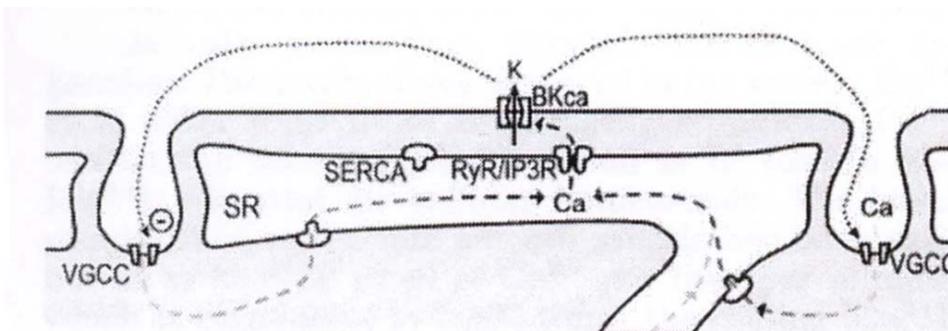
### 1- Canaux $K^+$ calcium-dépendants (K-Ca)

Ces canaux sont activés à la fois par la dépolarisation membranaire et par l'augmentation du calcium intracellulaire, plus précisément par les « sparks » libérés par les clusters de récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique (RS) adjacents à la membrane plasmique (figure 10). Encore appelés « big ou  $BK_{Ca}$  ou maxi  $K^+$  channels » à cause de leur conductance élevée (200 à 250 pS), ces canaux sont très bien représentés au niveau du muscle lisse vasculaire cérébral puisque leur densité est estimée entre 1000 et 10000 par cellule. Ce canal est un tétramère de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta_1$ , la sous-unité  $\alpha$  étant composée de 7 segments transmembranaires hydrophobes (S0-S6) qui forment le pore du canal et de 4 segments cytoplasmiques sensibles au calcium (S7-S10) (figure 10). La sous-unité  $\beta_1$  comprend deux segments transmembranaires et augmenterait la sensibilité de la sous-unité  $\alpha$  vis à vis du voltage et du calcium et d'autre part, aurait un rôle protecteur vis à vis de l'hypertension. Ainsi une mutation dans le gène codant pour  $\beta_1$  annule l'activation du canal par les sparks favorisant la vasoconstriction et l'élévation de la pression sanguine (Nelson & Bonev, 2004).



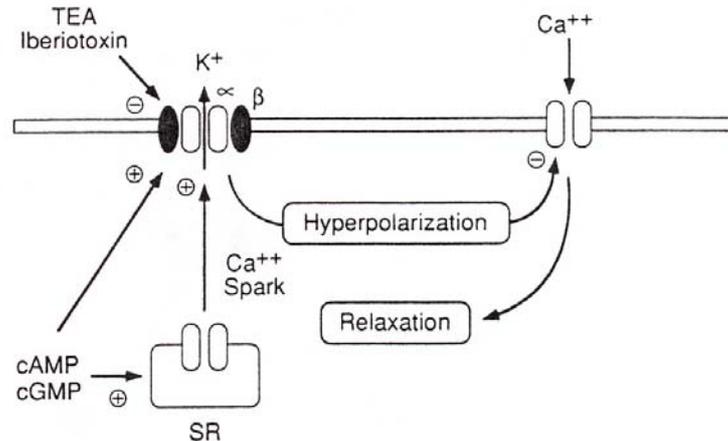
**Figure 10:** Schéma du canal BK<sub>Ca</sub> (d'après Korovkina & England, 2002)

Lorsqu'une élévation de pression artérielle se produit, une légère dépolarisation des CML par l'activation de canaux stretch-dépendants sélectifs au chlore permet l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (Nelson et coll, 1997). L'influx de calcium qui en résulte va activer les canaux sensibles à la ryanodine (RyR2 et RyR3) et provoquer une libération du calcium dans le cytoplasme qui se lie à la calmoduline et induit la contraction. Les clusters de RyR localisés à proximité du sarcolemme vont générer des sparks de calcium qui vont permettre l'activation des canaux BK<sub>Ca</sub> et induire une hyperpolarisation de la cellule et une relaxation des vaisseaux (figures 11 et 12) (Perez et coll, 1999 ; Löhn et coll, 2001 ; Ji et coll, 2004). Ces canaux jouent un rôle majeur en agissant comme un système tampon pour limiter la contraction. Ils sont activés par de nombreux messagers intracellulaires tels que le NO, le CO, le CGRP, l'adénosine, via l'AMPC et le GMPc (PKA et PKG) ou directement (Faraci & Heistad, 1998). Expérimentalement, de nombreuses substances sont capables de les activer (NS-1619) ou de les inhiber (ibériotoxine, tétraéthylammonium, peroxyxynitrite, acide arachidonique).



**Figure 11:** Activation par le calcium intracellulaire du canal BK<sub>Ca</sub> au sein d'une artère de résistance cérébrale (d'après Lee et coll, 2002)

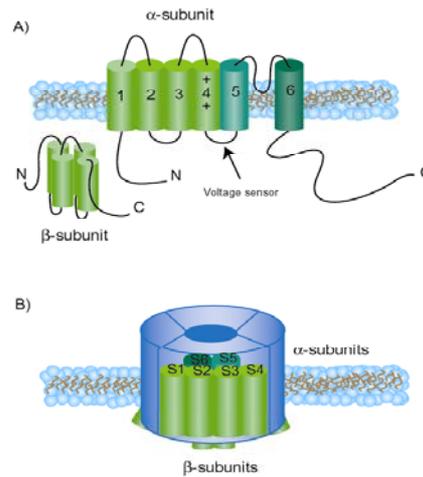
Dans l'artère basilaire de cobaye, un canal potassique calcium-dépendant mais potentiel-indépendant, de conductance plus faible (5 à 20 pS) que les BK-Ca, a été mis en évidence. Ce canal SK-Ca est bloqué par une toxine, l'apamine.



**Figure 12:** Mécanismes de relaxation suite à l'activation des canaux BK<sub>Ca</sub> (d'après Faraci & Sobey, 1998).

## 2- Canaux voltage-dépendants (Kv)

Les canaux Kv, activés par la dépolarisation, contribuent au maintien du potentiel de membrane et au diamètre des vaisseaux, leur inhibition pharmacologique par l'application de toxine (dendrotoxine), de 4-aminopyridine ou de corréolide (COR) provoque une dépolarisation et une vasoconstriction. Leur densité est estimée à environ 750 canaux par cellule. Les canaux Kv sont impliqués dans la réponse vasodilatatrice induite par le NO (Sobey & Faraci, 1999 ; Irvine et coll, 2003). Sur les CML des artères cérébrales de rat, ces canaux sont des hétérotétramères (Kv1.2/1.5) (Albarwani et coll, 2003). Ils sont constitués de 4 sous-unités  $\alpha$  comprenant chacune 6 segments transmembranaires hydrophobes, d'un voltage-senseur situé en S4 et d'une sous-unité  $\beta$  (figure 13). La sous-unité  $\beta$  entraîne des modifications des propriétés du canal au niveau de son inactivation et de sa sensibilité au voltage, de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  dans la membrane. De plus elle possède un site de phosphorylation et un site sensible au processus d'oxydo-réduction (Korovkina & England, 2002).

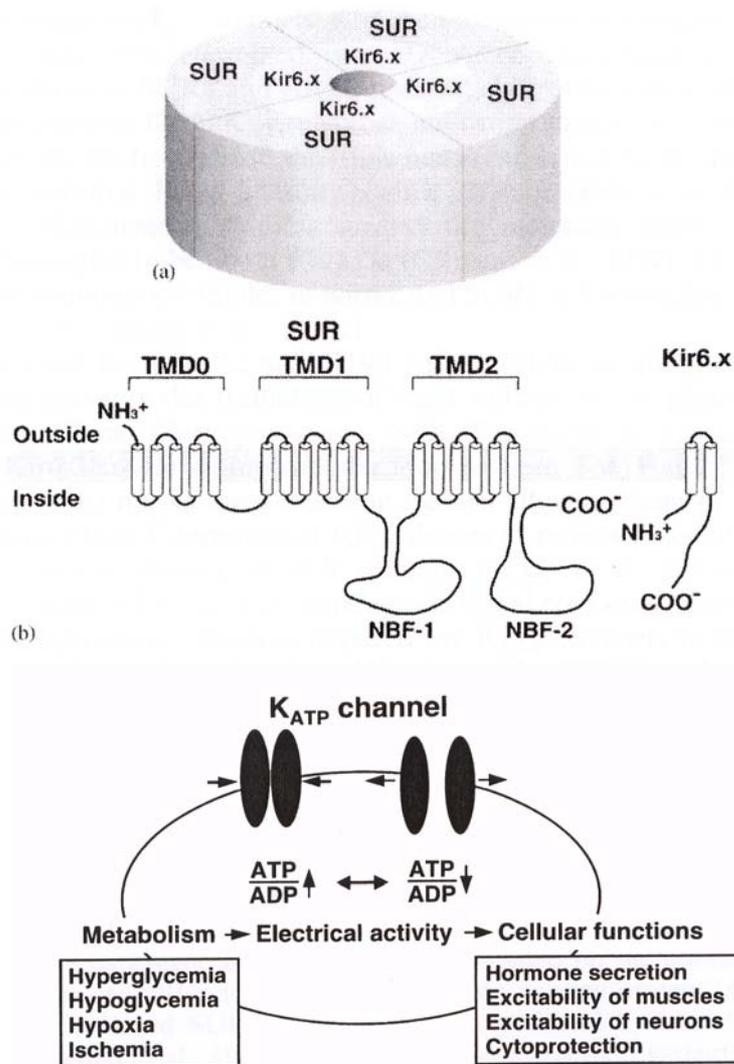


**Figure 13:** Représentation schématique du canal Kv (d'après Ion channels, Sigma)

### 3- Canaux $K^+$ ATP-dépendants (K-ATP)

L'activité des canaux potassiques ATP-dépendants reflète l'état métabolique de la cellule. La diminution du taux intracellulaire en ATP, de la pression partielle en  $O_2$ , du pH intracellulaire sont autant de stimuli qui induisent une vasodilatation par activation des canaux K-ATP. Leur densité est estimée sur les cellules musculaires lisses des artères cérébrales à 300-500 canaux par cellule. En situation physiologique, ces canaux sont majoritairement silencieux et interviennent peu dans le maintien du potentiel de repos. Ils sont cependant la cible de nombreuses substances vasodilatatrices (CGRP, adénosine, prostacycline,...) ou vasoconstrictrices (endothéline, vasopressine,...) qui par l'intermédiaire de protéines kinases vont les activer (protéine kinase A) ou les inhiber (protéine kinase C). Ces canaux peuvent également être activés par des agonistes pharmacologiques tels que le cromakalim, le minacidil, le diazoxide ou inhibés par des antagonistes tel que le glibenclamide (Faraci & Sobey, 1998). Le canal potassique ATP-dépendant appartient à la famille des canaux potassiques rectifiants entrants. Sur le muscle lisse c'est un hétéro-octamère comprenant deux sous-unités : la sous-unité Kir6.1 avec deux segments transmembranaires hydrophobes délimitant le pore du canal Kir6.1 et une sous-unité SUR2B (figure 14a). La sous-unité Kir6.1 possède un site de liaison pour l'ATP, la fixation d'un ATP sur un site suffit à bloquer le canal. Le récepteur à sulfonylurée, la sous-unité SUR, possède trois domaines transmembranaires et deux boucles liant les nucléotides (NBF1 et 2, nucleotide binding factor). La régulation du canal est fortement

dépendante du rapport ATP/ADP. Quand il diminue, le canal est activé, lorsqu'il augmente le canal se ferme (figure 14b).

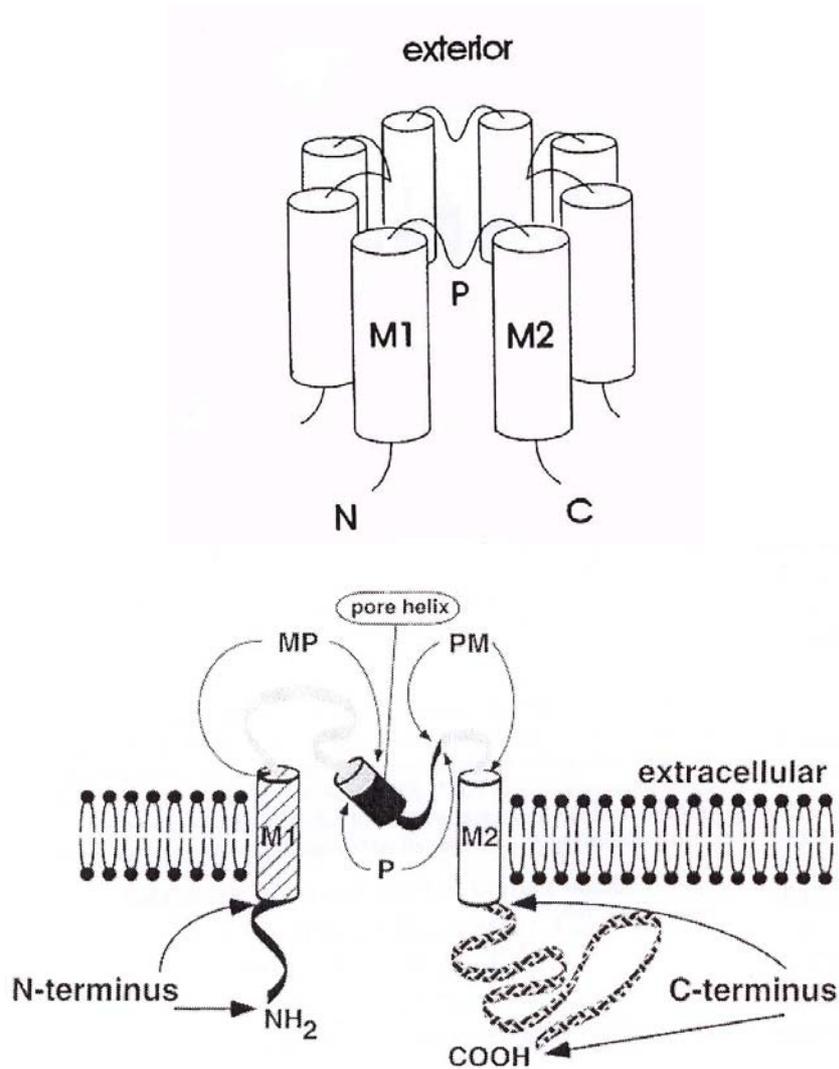


**Figure 14:** (a) Structure du canal K-ATP et (b) influence des facteurs métaboliques sur l'activité des canaux K-ATP (d'après Seino & Miki, 2003)

#### 4- Canaux K<sup>+</sup> à rectification entrante (Kir2.1)

Nous allons nous intéresser particulièrement à ce canal potassique puisqu'il est au centre des travaux que nous allons présenter. Les canaux Kir sont restés longtemps les plus méconnus des canaux potassiques des CML vasculaires. Ils ont été mis en évidence indirectement en 1990 lors d'expériences de vasomotricité sur des artères cérébrales de rat par McCarron et Halpern qui ont démontré la présence de deux composantes, dans la vasodilatation induite par l'augmentation du potassium extracellulaire sur ces vaisseaux. La première

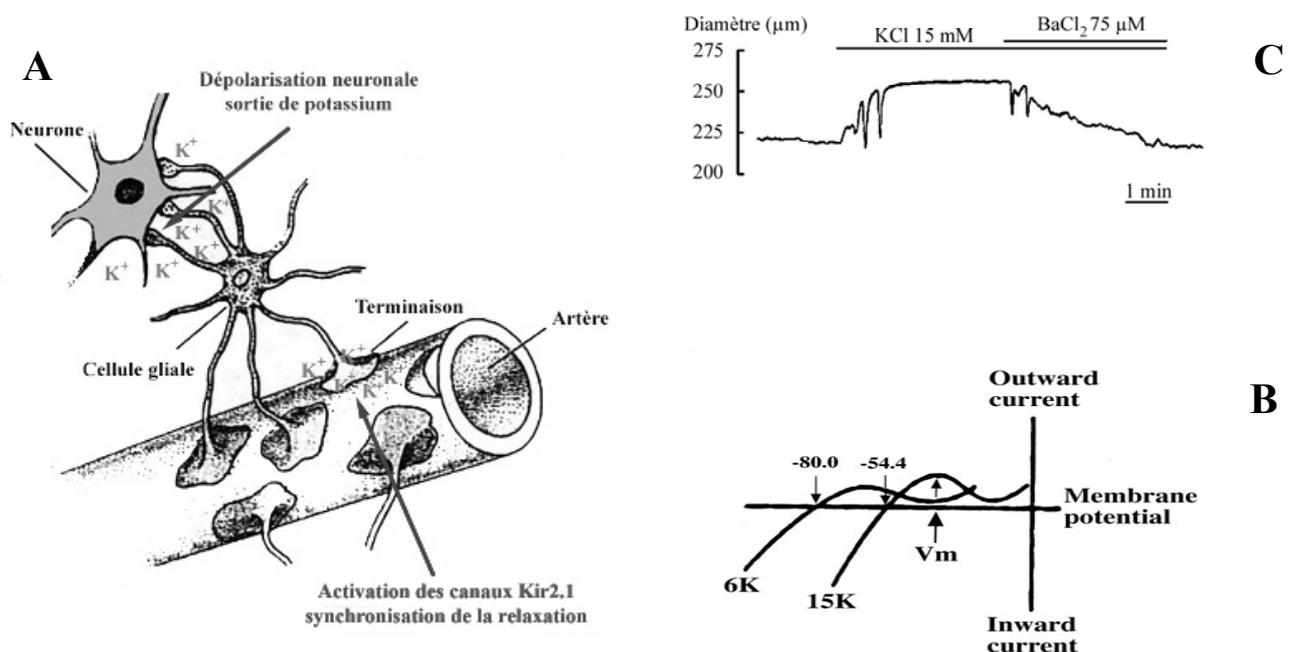
composante, activée par des concentrations inférieures à 5 mM, correspondait à l'activation de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et était inhibée par la ouabaïne. La deuxième composante était sensible au baryum, bloqueur spécifique des canaux potassiques rectifiants entrants, et activée par une élévation de la concentration en ions  $\text{K}^+$  extracellulaire supérieure à 5 mM (Edwards et coll, 1988). Le courant Kir a été caractérisé pour la première fois en patch-clamp sur des cellules musculaires lisses isolées, obtenues à partir d'artères de résistance, les artères cérébrales postérieures de rat (Quayle et coll, 1993). Le canal présent sur les cellules musculaires lisses des artères cérébrales est de type Kir2.1 (Bradley et coll, 1999 ; Zaritsky et coll, 2000). C'est un tétramère dans lequel chaque sous-unité est constituée de deux segments transmembranaires, M1 et M2. Les terminaisons  $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$  sont toutes les deux cytoplasmiques et la boucle extracellulaire contient une région P qui forme un filtre de sélectivité (figure 15). Il se caractérise par une forte rectification entrante, une haute sélectivité vis à vis du potassium, une conductance qui dépend du potassium extracellulaire et un blocage spécifique par les ions  $\text{Ba}^{2+}$  avec une  $\text{CI}_{50}$  de 2,2  $\mu\text{M}$  à  $-60$  mV. La rectification, très importante sur le canal Kir2.1, est due à la fixation d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  dans le pore du canal (segment M2) et à la fixation de polyamines intracellulaires (spermidine, spermine) sur un site du canal côté cytoplasmique au niveau de l'extrémité C-terminale (Matsuda et coll, 1987 ; Oliver et coll, 2000). Dans la gamme de potentiels physiologiques de la CML ( $-60$  à  $-30$  mV), et en raison de sa rectification les canaux Kir2.1 laissent passer un petit courant sortant qui va contribuer à l'hyperpolarisation de la cellule. Une régulation du canal Kir2.1 par la protéine kinase C a été suggérée par une étude de vasomotricité sur l'artère basilaire, puisque l'inhibition de l'activité basale de la PKC entraîne une augmentation de la réponse vasodilatatrice au  $\text{K}^+$  extracellulaire. Le mécanisme exact de ce phénomène n'est cependant pas totalement élucidé et nécessiterait une étude électrophysiologique (Chrissobolis & Sobey, 2002a).



**Figure 15:** Représentation schématique du canal rectifiant entrant et d'une sous-unité du tétramère (d'après Collins et coll, 1997 et Choe et coll, 2000).

Différents travaux ont montré que les canaux Kir2.1 jouaient un rôle primordial à la fois dans le maintien du potentiel de repos et dans la vasodilatation des vaisseaux de résistance induite par le potassium. C'est un des éléments importants de la régulation de l'homéostasie potassique au sein du tissu cérébral et particulièrement de l'unité neurogliovasculaire (figure 16A). Cette unité fonctionnelle se décompose en une composante neurogliale et une composante gliovasculaire complémentaires et joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie du potassium extracellulaire [K<sup>+</sup>] en permettant d'allier le fonctionnement des neurones à un apport métabolique sanguin suffisant (nutriments et oxygène). Lors de leur activité, les neurones vont libérer des ions K<sup>+</sup>, qui vont provoquer une augmentation de quelques millimoles de la concentration extracellulaire en K<sup>+</sup> (Sykova, 1983 ; Kofuji & Newman, 2004). Ces ions K<sup>+</sup> sont

immédiatement repris par les astrocytes par l'intermédiaire de deux mécanismes de transport ionique, la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et le courant potassique rectifiant entrant (Kir2.1), afin d'éviter tout phénomène d'autoactivation neuronale (D'Ambrosio et coll, 2002). Puis la composante gliovasculaire constituée des pieds astrocytaires qui sont en contact étroit avec les vaisseaux cérébraux permet au potassium tamponné et stocké dans les astrocytes suite à l'activité neuronale d'être redistribué, via les pieds astrocytaires au niveau des vaisseaux. La concentration potassique extracellulaire au niveau vasculaire s'en trouve transitoirement augmentée ce qui induit spécifiquement l'activation des pompes Na/K et du courant potassique rectifiant entrant (Kir2.1) des cellules musculaires lisses (figure 16B). Lorsque ce courant est activé, la sortie des ions potassium des cellules musculaires lisses permet la repolarisation des cellules, la fermeture des canaux calciques et donc la dilatation du vaisseau (figure 16C). Ce couplage métabolique assure une régulation de l'apport sanguin territorial en favorisant l'augmentation du débit sanguin et donc un apport accru d'oxygène et de glucose pour les neurones en activité. Le  $\text{K}^+$  serait le médiateur initial du couplage débit/métabolisme neuronal, puisqu'il est directement lié à l'activité électrique de la cellule.



**Figure 16:** Homéostasie du potassium au sein de l'unité neurogliovasculaire. A- Anatomie de l'unité neurogliovasculaire et distribution des ions  $\text{K}^+$ . B- Activation du courant Kir2.1 par l'augmentation de la  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ . C- Dilatation de l'artère cérébrale en réponse à l'augmentation de la  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  et blocage par le baryum (d'après Nelson & Quayle, 1995 et Pétrault, 2004)

## **5- Canaux potassiques à deux pores**

Cette nouvelle famille de canal potassique à deux pores a été mise en évidence dans différents tissus notamment dans les neurones (Heurteaux et coll, 2004 ; pour revue, Buckingham et coll, 2005). Très récemment, par RT-PCR et immunomarquage, le canal TREK-1 sensible aux acides gras polyinsaturés a été mis en évidence dans les vaisseaux cérébraux de rat et de souris à la fois dans la couche musculaire lisse et dans la couche endothéliale, il pourrait intervenir dans la régulation du débit sanguin cérébral et la neuroprotection induite par les acides gras polyinsaturés (Blondeau et coll, 2005).

## **B- Contrôle du tonus musculaire par l'endothélium**

La modulation du tonus vasculaire par l'endothélium représente à elle-seule un domaine d'étude beaucoup trop vaste pour être résumé ici. Nous allons seulement apporter quelques précisions sur le rôle du NO auxquelles nous ferons référence dans les travaux qui vont suivre et citer l'existence des principales autres voies.

### **1- Les substances vasorelaxantes**

L'endothélium joue un rôle critique dans le contrôle de la résistance vasculaire périphérique et de la pression sanguine par le biais de la libération de trois substances : le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et les substances hyperpolarisantes (EDHF : endothelium derived hyperpolarizing factor). Ces trois facteurs sont responsables de la relaxation endothélium-dépendante.

#### a- Le monoxyde d'azote (NO)

Sans doute l'acteur le plus important des substances endothéliales, le NO induit une relaxation endothélium dépendante (Furchgott & Zawadski, 1980). La production de NO est assurée par la transformation de l'acide aminé L-arginine en L-citrulline catalysée par la NO synthétase (NOS) dont il existe trois isoformes issues de gènes différents. Il existe deux formes constitutives et dépendantes de la concentration de calcium intracellulaire, la NOS 3 au niveau endothélial et la NOS 1 localisée au niveau neuronal. En condition physiologique, de nombreuses substances telles que l'acétylcholine, la bradykinine, la substance P, la vasopressine,

l'histamine sont capables d'activer la NOS3 en favorisant l'entrée de calcium dans le cytoplasme de la cellule endothéliale via des récepteurs couplés à des protéines G. La NOS 2, indépendante du calcium intracellulaire, est induite dans des conditions de stress pathologique par des médiateurs de l'inflammation telles que les cytokines et est retrouvée dans de nombreux types cellulaires (leucocytes, macrophages, cellules gliales, astrocytes, cellules endothéliales) (Mardsen et coll, 1992 ; Forstermann & Kleinert, 1995).

Après sa libération par l'endothélium (ou par d'autres cellules comme les neurones), il stimule la guanylate cyclase soluble du muscle lisse vasculaire favorisant l'augmentation de la concentration intracellulaire en GMPc (Waldman & Murad, 1987 ; Watanabe et coll, 1988 ; Schmidt & Walterl, 1994). Le GMPc active à son tour une protéine kinase (PKG) impliquée dans une cascade de phosphorylations qui vont toucher une phosphatase (MLCP), les sous-unités régulatrices des canaux KCa (Taguchi et coll, 1995 ; Robertson et coll, 1993). Le NO peut activer directement les canaux K-Ca et les canaux Kv du muscle lisse (Archer et coll, 1994 ; Bolotina et coll, 1994 ; Cohen et coll, 1995 ; Sobey & Faraci, 1999).

Les effets vasorelaxants du NO peuvent être contre-régulés par une inactivation rapide par l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) pour former le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) ou par la dismutation catalysée par la superoxyde dismutase, une des enzymes de défense naturelle contre le stress oxydant (Rubanyi & Vanhoutte, 1986 ; Moncada & Higgs, 1995 ; Katusic, 1996). En condition physiologique, la formation  $ONOO^-$  n'est pas cytotoxique puisque sa concentration est très faible.

#### b- Autres agents relaxants

En plus de la production de NO, l'endothélium peut induire une relaxation en libérant :

- des facteurs EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor, produits du métabolisme de l'acide arachidonique par le cytochrome P-450 monooxygénase, comme les acides epoxyeicosatriénoïques qui hyperpolarisent les cellules musculaires lisses par activation des canaux BKCa et SKCa et les K-ATP (Campbell et coll, 1996 ; Petersson et coll, 1997)

- la prostacycline ( $PGI_2$ ), puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, qui jouerait sur plusieurs voies en favorisant la phosphorylation des chaînes légères de myosine induisant ainsi une relaxation, en activant différents canaux potassiques (BK-Ca, K-ATP, Kv, Waldron & Cole, 1999).

## 2- Les substances vasoconstrictrices

L'endothélium produit également des substances vasoconstrictrices parmi lesquelles l'endothéline dont il existe trois isoformes (ET-1, ET-2 et ET-3) et dont les effets passent par l'activation de deux types de récepteurs (ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>) exprimés dans le muscle lisse et la prostacycline (Rubanyi & Polokoff, 1994). D'autres facteurs endothéliaux peuvent intervenir dans les effets vasoactifs décrits précédemment : des espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde), des métabolites de l'acide arachidonique produits par la voie des COX endothéliales qui favorisent la contraction *via* des récepteurs PGH<sub>2</sub>-thromboxane A<sub>2</sub>.

### C- Autorégulation

Les vaisseaux cérébraux ont une capacité d'autorégulation du débit sanguin cérébral qui leur permet de modifier activement leur diamètre, en réponse à une variation de pression de perfusion. Parmi les mécanismes impliqués, le tonus myogénique joue un rôle important. Il correspond à la dilatation ou à la constriction du muscle lisse vasculaire en réponse à une diminution ou une augmentation de la pression transmurale dans le but de maintenir un débit sanguin constant et de protéger le cerveau. Ce tonus myogénique représente le tonus de base sur lequel vont s'exercer toutes les régulations neurohumorales et endothéliales. Les mécanismes sous-jacents à la mécanotransduction impliquée dans le développement de ce tonus myogénique ne sont pas parfaitement compris mais impliqueraient des intégrines (glycoprotéines de la matrice extracellulaire) qui transmettraient l'information mécanique au cytosquelette des cellules musculaires lisses. Sur ces dernières, il a été montré que les canaux calciques voltage-dépendants étaient modulés par ces intégrines, de manière opposée selon le type d'intégrines, et induiraient une augmentation ou une diminution de la concentration en calcium cytoplasmique qui pourraient être responsables des variations du tonus myogénique. D'autres mécanismes peuvent intervenir tels des canaux cationiques mécano-sensibles (TRPC6), la fluidité membranaire, la sensibilité des protéines contractiles au calcium, les systèmes de remplissage ou d'extrusion du calcium intracellulaire (pour revue, voir Hill et coll, 2001; Welsh et coll, 2002).

## II- Paroi vasculaire: Cible de l'ischémie cérébrale

Durant l'ischémie cérébrale, le vaisseau joue un rôle primordial puisque de son obstruction naît le développement de l'infarctus. Notre modèle d'ischémie/reperfusion focale est

basée sur l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne qui provoque un infarctus dans les régions corticales et sous-corticales assez représentatif de l'infarctus, dû chez l'homme, à l'occlusion de l'artère sylvienne. Nous allons étudier les altérations fonctionnelles de ce vaisseau au cours de la phase aiguë de l'AVC, puis sa potentialité en tant que cible thérapeutique potentielle de neuroprotection.

## **A- Altération du courant Kir2.1 dans l'ischémie cérébrale**

Les vaisseaux cérébraux assurent une relation étroite entre les éléments de la circulation sanguine, les neurones et les cellules gliales (astrocytes) auxquels ils apportent l'énergie nécessaire à leur fonctionnement. Très rapidement au décours du processus d'ischémie/reperfusion, leur vasoréactivité est profondément modifiée et le contrôle du DSC perdu. Comme nous l'avons décrit précédemment au sein de la paroi vasculaire, la couche endothéliale et la couche musculaire lisse jouent un rôle prépondérant dans le maintien du tonus musculaire. Alors que le modèle d'ischémie cérébrale venait d'être mis en place au sein du laboratoire afin d'étudier les phénomènes de tolérance et de susceptibilité à l'ischémie cérébrale c'est à dire les circonstances physiologiques, pathologiques au cours desquelles le tissu cérébral s'avère moins sensible (tolérance) ou plus sensible (susceptibilité) aux conséquences du processus ischémique, deux études ont été publiées montrant par des travaux de vasoréactivité de l'artère cérébrale moyenne occluse et reperfusée, le dysfonctionnement de la relaxation endothélium-dépendante et de la relaxation Kir-dépendante. Suite à l'ischémie/reperfusion le tonus myogénique était presque totalement aboli c'est à dire que face à une augmentation de pression l'artère ne se contractait plus, le flux sanguin n'était plus régulé et la relaxation endothélium-dépendante activée par application d'acétylcholine était sévèrement diminuée (Cipolla et coll 1997). Il est nécessaire de préciser qu'une période d'ischémie seule non suivie de reperfusion ne suffisait pas à induire ces effets délétères. La seconde étude, également réalisée à l'aide de techniques de vasomotricité, démontrait l'altération de la relaxation dépendant de l'activation du courant Kir après ischémie/reperfusion et était la première à mettre en évidence que le canal Kir pouvait être impliquée dans l'ischémie/reperfusion (Marrelli et coll, 1998).

Parmi les cinq types de courant potassique présents au niveau de la membrane des cellules musculaires lisses, seuls les effets de l'ischémie/reperfusion sur les canaux potassiques ATP-dépendants et les canaux Ca-dépendants des CML avaient été étudiés (Bari et coll, 1996). Dans leur modèle d'ischémie globale réalisée sur le porcelet, ces auteurs ont démontré la perte transitoire de sensibilité des artérioles vis à vis des activateurs des canaux K-ATP comme

l'aprikalim. La perte de cette réponse artériolaire pouvait conduire à un apport d'oxygène inadapté au tissu cérébral et favoriser la mort cellulaire. Aucune réduction de l'activité des canaux K-Ca n'a été mise en évidence sur ce même modèle suite à l'I/R, puisque au contraire ces canaux peuvent être activés par certaines espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène produit en grande quantité au cours de l'I/R (Bari et coll, 1997 ; Sobey et coll, 1997).

Suite à ces études réalisées en vasomotricité, nous avons voulu apporter des preuves directes d'un dysfonctionnement potentiel du canal Kir qui expliquerait la perte de la relaxation  $K^+$ -dépendante. Dans un premier temps nous avons mis au point une préparation cellulaire de myocytes isolés à partir d'artères cérébrales de rat afin de caractériser le courant Kir sur du muscle sain en nous basant sur les travaux de Quayle et coll (1993). Les caractéristiques de sélectivité, de rectification et de sensibilité au baryum des canaux Kir ayant été confirmées sur notre préparation nous avons poursuivi cette étude sur des myocytes isolés à partir de rat ischémié/reperfusé selon la technique de l'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne droite (Zea-Longa et coll, 1989). Brièvement les rats sont soumis à 1 heure d'ischémie suivie de 24 heures de reperfusion puis sacrifiés et les artères ipsi- et contra-latérale à l'occlusion sont prélevées pour être dissociées. Le cerveau est congelé pour une étude histologique ultérieure afin de quantifier les volumes d'infarctus et l'œdème.

Nous avons ainsi mis en évidence que le courant Kir était significativement diminué sur les myocytes issus de l'artère ipsilatérale comparé au courant enregistré sur des artères d'animaux témoins ou sur l'artère contralatérale à l'occlusion. De plus l'importance de cette altération était corrélée positivement au volume d'infarctus suggérant que l'altération du courant Kir en provoquant une perte de la réponse vasodilatatrice  $K^+$ -dépendante pouvait contribuer à un découplage entre les besoins neuronaux et l'apport sanguin et participer à l'extension des dommages neuronaux. Ce dysfonctionnement pouvant être particulièrement préjudiciable dans la zone de pénombre où il est connu que les cellules peuvent être "sauvées" si la reperfusion se fait précocement. L'altération du courant Kir pourrait être due à l'effet délétère du stress oxydant se produisant au moment de la reperfusion car les espèces réactives de l'oxygène sont connues pour induire des modifications importantes des protéines de transport (Kourie, 1998).

***Ces travaux ont été publiés dans Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism :  
"Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after  
cerebral ischemia/reperfusion" Bastide et coll, 1999.***

*Relationship between inward rectifier potassium current impairment and  
brain injury after cerebral ischemia/reperfusion*

**Bastide M**, Bordet R, Pu Q, Robin E, Puisieux F, Dupuis B

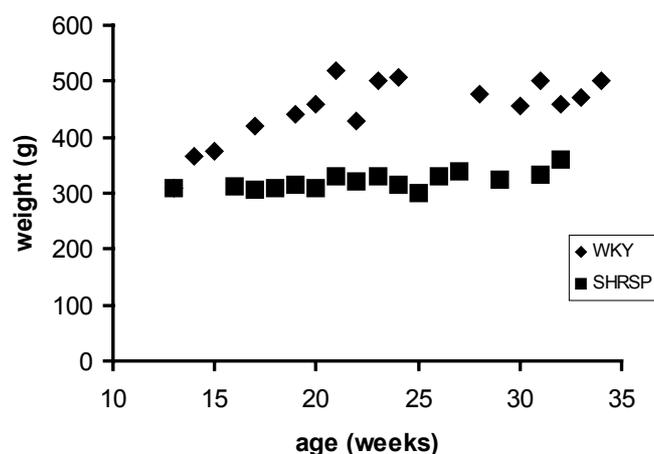
Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (1999), 19, 1309-1315

## **B- Implication du courant Kir2.1 dans la susceptibilité à l'ischémie cérébrale**

La susceptibilité à l'ischémie suggère l'installation de conditions qui favorisent la survenue d'accidents vasculaires cérébraux. Les facteurs de risque que nous avons évoqués précédemment peuvent jouer ce rôle. Parmi ceux-ci l'hypertension artérielle a été reconnue de longue date comme un risque majeur. Des modèles expérimentaux ont démontré la taille plus importante des infarctus cérébraux chez des rats spontanément hypertendus (SHR) qui ne développent pas spontanément des infarctus. La sélection d'une nouvelle souche de rats SHR qui développaient spontanément des accidents vasculaires cérébraux (SHRsp, stroke-prone spontaneously hypertensive rat) a permis d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes pathologiques (Yamori et coll, 1974). De très nombreuses études ont été réalisées par de multiples approches et à différents niveaux sur ces animaux afin de déterminer les facteurs contribuant à cette susceptibilité. Au niveau vasculaire, une altération de la relaxation endothélium-dépendante, la perte de la relaxation  $K^+$ -dépendante, une désorganisation des cellules musculaires lisses chez les animaux jeunes et âgés affectant la capacité de contraction, la perte progressive de la capacité d'autorégulation en fonction de la pression sont autant de mécanismes observés, qui prouvent qu'antérieurement à l'apparition d'un AVC, un dysfonctionnement vasculaire s'est préalablement installé (McCarron & Halpern, 1990b; Yang et coll, 1991; Arribas et coll, 1996; Smeda & King, 1999).

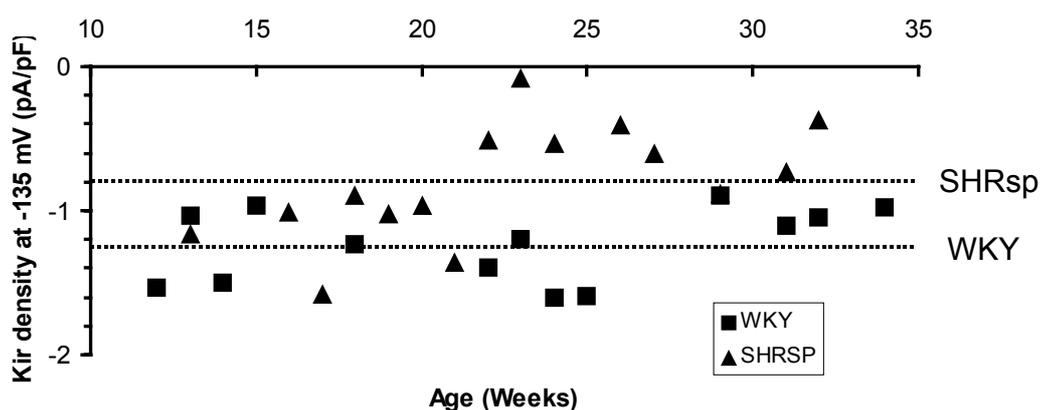
Ces animaux SHRsp n'étant pas commercialement disponibles c'est dans le cadre d'une collaboration avec le professeur Ganten qui possède une colonie qu'il continue à exploiter (Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Allemagne) que nous avons pu mettre en place une étude électrophysiologique des cellules musculaires lisses, afin de déterminer si la perte de la vasodilatation  $K^+$ -dépendante pouvait résulter d'une altération préischémique du courant Kir.

Dans la perspective de la mise en place progressive de la susceptibilité au cours du temps, nous avons suivi les rats sur une période de plusieurs semaines (12 à 34 semaines) par comparaison avec des rats témoins WKY non hypertendus d'âge comparable. La mise en place de l'hypertension a été vérifiée par mesure de la pression artérielle au niveau de l'artère caudale chez les rats SHRSP ( $206 \pm 4$  mm Hg,  $n=6$  vs  $142 \pm 4$  mm Hg chez les rats WKY,  $n=7$ ). La croissance des animaux est différente, les WKY continuant à prendre du poids tout au long de la période étudiée (500 g à 34 semaines) alors que les SHRSP ne grossissent plus au-delà de 15 semaines (340 g) (figure 17).



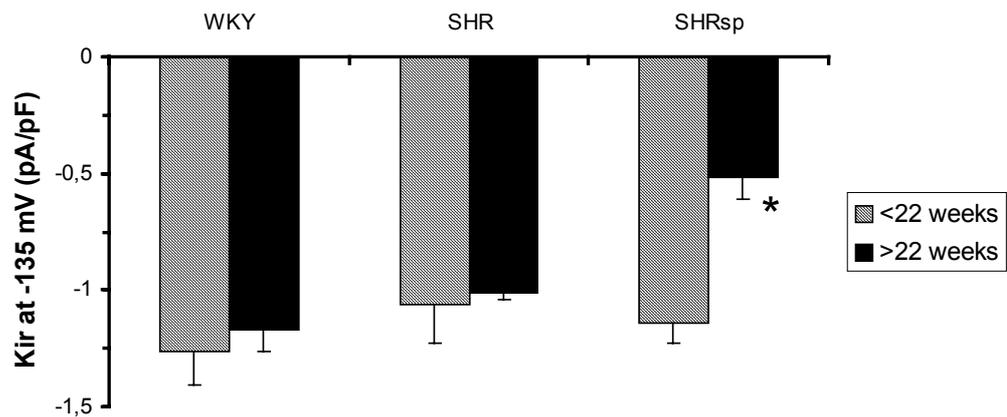
**Figure 17:** Evolution du poids des rats WKY et SHRsp en fonction de l'âge

La mesure de la densité de courant Kir a été réalisée selon le même protocole que celui décrit précédemment. Nous avons pu mettre en évidence sur les myocytes isolés à partir d'artères cérébrales moyennes de rats SHRsp que la densité de courant Kir au cours du temps diminuait durant la période étudiée comparativement à la densité mesurée sur les myocytes isolés à partir d'ACM de WKY d'âge équivalent. Cette diminution intervient de manière significative à partir de 22 semaines (figure 18).



**Figure 18:** Densité de courant Kir mesurée à  $-135$  mV sur les myocytes issus des artères de rats WKY et SHRsp à différents âges. Les lignes pointillées indiquent la densité moyenne de Kir sur la période de 12 à 34 semaines pour chaque souche.

Nous avons alors comparé les rats SHRsp âgés de plus de 22 semaines avec une autre souche de rats hypertendus, les rats SHR. Comme illustré sur l'histogramme de la figure 19, les valeurs de densité obtenues sur les myocytes de rats SHR ne sont pas modifiées en fonction de l'âge et restent stables dans le temps confirmant que l'hypertension seule n'est pas responsable du dysfonctionnement du courant Kir.



**Figure 19:** Histogramme des densités de courant Kir mesurées à  $-135$  mV sur les myocytes issus d'artères de rats WKY, SHR et SHRsp pour la période de 12-22 semaines et la période de 22-34 semaines (\*:  $p < 0,05$  vs période <22 sem).

Ces résultats confirment l'installation d'une dysfonction au niveau du muscle lisse des rats SHRsp évoquées dans plusieurs études. Une altération des canaux K-ATP dépendants, une augmentation des courants calciques, une diminution de la vasoconstriction dépendant de la pression, une diminution de la lumière des vaisseaux ont ainsi également été mises en évidence sur le muscle lisse (Coyle & Heistad, 1991; Smeda, 1992; Kitazono et coll, 1993; Wilde et coll, 1994; Smeda & King, 1999). La relaxation endothélium-dépendante est également altérée (Yang et coll 1991 ; Volpe et coll, 1996 ; Hamilton et coll, 2001). Le développement de ces défauts fonctionnels dans la réponse mécanique des vaisseaux cérébraux des rats SHRsp va compromettre la régulation du débit sanguin et les réponses métaboliques aux besoins des cellules neuronales et pourrait contribuer à la susceptibilité de ces animaux à développer des AVC.

Un des mécanismes proposés pour expliquer la perte de l'intégrité vasculaire chez les animaux SHRsp serait la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène au sein des vaisseaux particulièrement la production d' $O_2^{\cdot -}$  liée à la surproduction d'oxydases (xanthine oxydase et NADH/NADPH oxydase). Cette surproduction diminuerait la disponibilité du NO et réduirait la

relaxation endothélium-dépendante d'une part, et, d'autre part ce radical peut modifier le fonctionnement des canaux ioniques par oxydation des radicaux –SH (Kerr et coll, 1999).

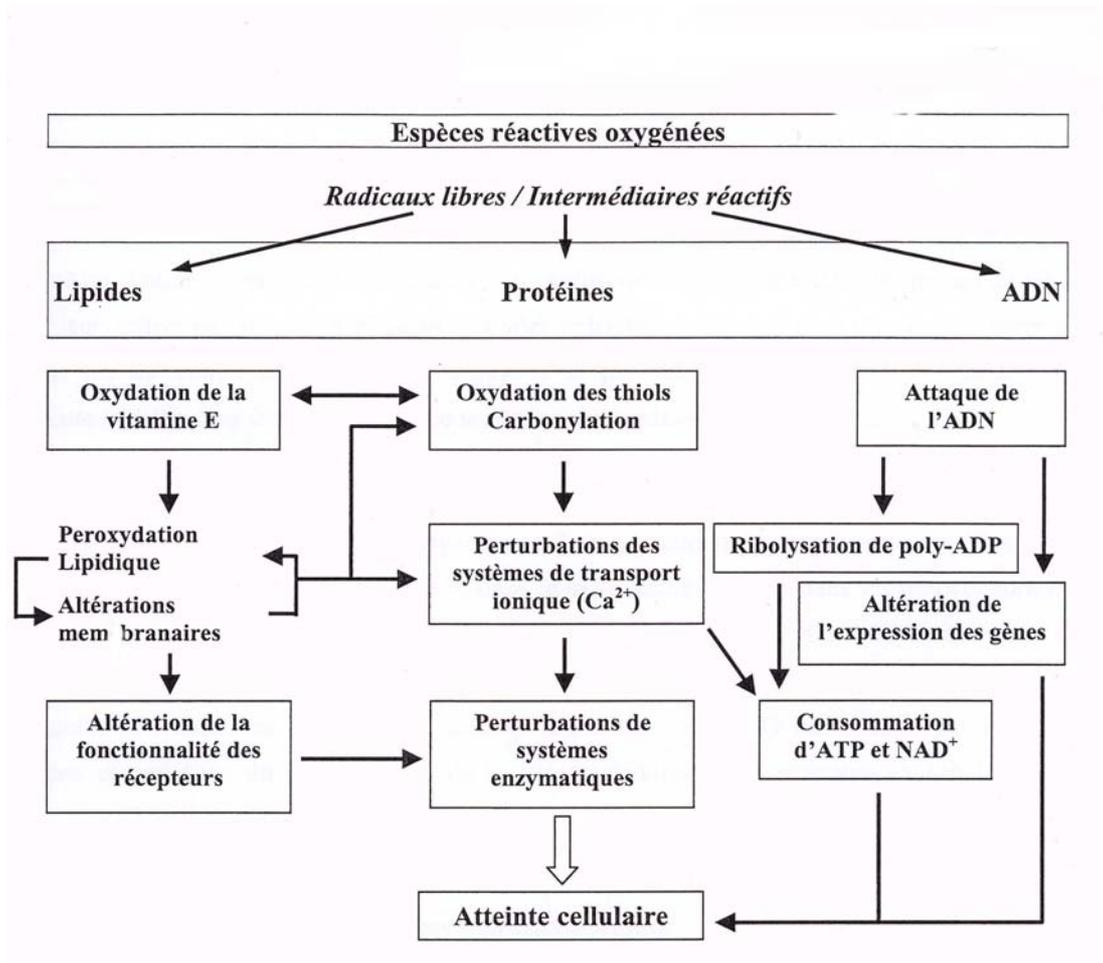
*Cette étude sur les rats SHRsp conforte le rôle potentiel d'un dysfonctionnement vasculaire dans l'ischémie cérébrale, ici dans une phase pré-ischémique. Ces travaux font l'objet d'une publication qui est actuellement en préparation. "Age-induced progressive alteration of Kir current in cerebral smooth muscle cells of stroke-prone spontaneously hypertensive rats".*

### **III- Stress oxydant : Mécanisme pathologique des altérations vasculaires ?**

Ces différents travaux sur le phénomène de résistance neurovasculaire à l'ischémie cérébrale nous ont conduit à étudier le rôle du stress oxydant au cours de l'ischémie reperfusion cérébrale en le modulant pharmacologiquement. Cipolla et coll (1997, 2002) ont démontré l'influence de la phase de reperfusion et de sa durée sur la mise en place de l'altération de la fonction endothéliale et du tonus myogénique. L'implication de la reperfusion sous-entend un rôle essentiel du stress oxydant, qui explose avec le retour du sang oxygéné dans les territoires ischémiés. Le stress oxydant est représenté par l'ensemble des réactions faisant intervenir des espèces réactives de l'oxygène caractérisées par la présence d'un électron célibataire très réactif. Dans un premier temps, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire neuronale va favoriser leur production. Dans une phase précoce de l'ischémie, par le biais de la NOS neuronale calcium-dépendante et par les mitochondries, il y a production de NO et de  $O_2^{\circ-}$  ou superoxyde. La réaction entre le NO et le  $O_2^{\circ-}$  produit alors du peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) très délétère. D'autres mécanismes entrent alors en jeu et contribuent à la production de radicaux libres: (i) la diminution des capacités de défense antioxydante ; (ii) l'altération du système de transformation de la xanthine en hypoxanthine ; (iii) l'accumulation d'eicosanoïdes par induction principalement de la COX 2. Cette production est majorée au moment de la reperfusion par l'apport d'oxygène. Les différentes espèces réactives de l'oxygène produites dans le cerveau (l'anion superoxyde  $O_2^{\circ-}$ , le radical hydroxyle  $^{\circ}OH$  très réactif, les dérivés oxygénés non radicalaires : NO et  $H_2O_2$ ) vont avoir plusieurs conséquences sur les lipides (peroxydation lipidique, atteinte de la fluidité membranaire, production de malonate dialdéhyde), les protéines (oxydation, perte de leurs fonctions, destruction) et sur l'ADN (cassure des brins, modification de l'expression des gènes), toutes extrêmement délétères pour les cellules (figure 20). Les effets des radicaux libres sur l'activité des canaux ioniques sont très hétérogènes suivant l'espèce radicalaire impliquée. Ainsi les canaux BKCa sont activés par  $H_2O_2$  et par  $O_2^{\circ-}$  mais inhibés par  $ONOO^-$ . Les canaux K-ATP sont activés par les différentes espèces radicalaires et les canaux Kv inhibés par  $O_2^{\circ-}$ . La modification de l'activité des canaux potassiques par le stress oxydant peut donc modifier considérablement la réponse vasculaire (Liu & Gutterman, 2002).

L'organisme possède des mécanismes naturels de défense de type enzymatique (superoxydes dismutases ou SOD, catalase, peroxydases) et non enzymatique (vitamines C, E, glutathion) pour maintenir la concentration d'espèces radicalaires faible. Cependant ces systèmes

sont dépassés et insuffisants pour neutraliser l'explosion de stress oxydant se produisant au moment de la reperfusion.



**Figure 20:** Cascades des conséquences délétères des radicaux libres

L'acquisition au laboratoire d'un artériographe de Halpern nous a permis d'étudier la vasoréactivité de l'artère cérébrale moyenne *in vitro* dans sa composante endothéliale et sa composante musculaire lisse en complément des études électrophysiologiques (Halpern & Kelley, 1991). L'activation de la relaxation  $K^+$ -dépendante est réalisée *in vitro* dans l'artériographe d'Halpern en appliquant sur un segment d'ACM une solution saline contenant 15 mM KCl. Cette augmentation de la concentration extracellulaire en KCl mime l'augmentation *in vivo* en ions potassium dans l'espace extracellulaire due à l'activité neuronale et déclenche une vasodilatation de l'artère spécifiquement bloquée par l'application de baryum, inhibiteur spécifique des canaux Kir. La composante endothéliale de la vasodilatation est testée par l'application d'ACh sur l'ACM par l'intermédiaire de la solution saline. Après vérification, les artères répondaient correctement dans nos conditions expérimentales et les dysfonctionnements décrits dans la littérature par Cipolla et coll (1997; 2001; 2002) et Marrelli et coll (1998) après

I/R étaient retrouvés. Les études concernant le vaisseau ont été menées de manière concomitante par les techniques de patch-clamp et de vasomotricité. Les travaux qui vont être décrits maintenant, particulièrement en vasomotricité, ont constitué une partie de la thèse d'université d'Olivier Pétrault (soutenue en Décembre 2004). Dans notre modèle, nous avons pu mettre en évidence qu'une période d'ischémie seule non suivie de l'étape de reperfusion ne modifiait pas la fonction du muscle lisse vasculaire puisque ni la densité de courant Kir ni la relaxation qui est liée à l'activation de ces canaux n'étaient altérées. La relaxation endothélium-dépendante des animaux ischémiés et non reperfusés est significativement réduite par rapport aux animaux témoins mais de manière moins importante que chez les animaux ischémiés et reperfusés. Ces résultats soulignent le rôle délétère de la reperfusion dans la mise en place des altérations vasculaires et nous ont amené à tester l'hypothèse du rôle déterminant du stress oxydant dans le développement des lésions.

La stratégie des molécules antioxydantes dans le traitement de la pathologie ischémique a fait l'objet de très nombreux travaux expérimentaux, le développement de certaines molécules ayant même atteint un stade de phase clinique. Les résultats qui en ont découlé se sont révélés hétérogènes, avec un réel bénéfice au stade expérimental mais qui ne se retrouvait pas systématiquement en clinique (Internet Stroke Center). Nous avons eu l'opportunité par l'établissement de deux collaborations d'évaluer l'efficacité de deux molécules antioxydantes dans notre modèle d'ischémie/reperfusion :

1- Les flavones, composés polyphénoliques naturellement présents dans les végétaux (quercétin, apigénin,...), possèdent des propriétés antioxydantes et ont démontré des effets cardioprotecteurs (Lebeau et coll, 2001). Sur cette base, l'équipe du Dr Nicole Cotelle de l'Université de Lille 1 (UPRES 8009), a synthétisé des flavones possédant un pouvoir antioxydant plus puissant que les molécules naturelles et qui ont été testées au laboratoire dans notre modèle d'I/R, particulièrement le dérivé 3'5' di-*tert*-butyl-hydroxyphenyl (dt-BC) (Lebeau et coll, 2000 et 2001).

2- La stobadine, ((-)-cis-2,8-diméthyl-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-1H-pyrido[4,3-b]-indole), de la famille des pyridoindoles est la propriété de l'Institut de Pharmacologie Expérimentale de Bratislava (République slovaque) et nous a été donnée par le Professeur S. Stolc. Développée pour ses propriétés antioxydantes, elle est capable de piéger les radicaux hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ), alkoxy ( $\text{RO}^\circ$ ) et peroxy ( $\text{ROO}^\circ$ ), de neutraliser l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  et a montré des propriétés neuroprotectrices dans d'autres modèles d'ischémie (Stolc et coll, 1983 et 1997).

Ces deux molécules (dt-BC et stobadine) ont été administrées aux animaux à la phase aiguë de l'ischémie c'est à dire au moment de la reperfusion et 5h après et nous avons évalué les effets sur le volume d'infarctus et sur la fonctionnalité du vaisseau. Un effet neuroprotecteur a été obtenu avec les deux molécules avec une réduction significative du volume d'infarctus au niveau cortical. Au niveau de la fonctionnalité du vaisseau, les deux substances protègent les canaux Kir puisqu'en leur présence aucune diminution de la densité de courant Kir n'a pu être observée chez les myocytes isolés à partir des animaux I/R. Au niveau de la vasorelaxation la réponse est plus complexe. L'administration de dt-BC protège la vasorelaxation  $K^+$ -dépendante des effets de l'I/R mais en revanche ne prévient pas la réduction de la relaxation endothélium-dépendante induite par l'ACh. L'administration de stobadine prévient l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante mais semble avoir un effet propre, délétère, sur la relaxation Kir-dépendante puisque chez les animaux témoins traités par la stobadine une réduction de cette vasorelaxation est observée qui se retrouve chez les animaux I/R alors que la densité de courant Kir est inchangée. Ce dernier résultat suggère l'existence d'un effet sur une étape intermédiaire entre l'activation du courant Kir et la relaxation mécanique des fibres qu'il reste à identifier.

Néanmoins, il ressort de ces deux études que les agents antioxydants que nous avons testés ont la capacité de protéger le cerveau des effets délétères de l'I/R et de protéger partiellement les propriétés de vasomotricité des vaisseaux. L'effet ciblé de chacune de ces molécules sur l'endothélium ou sur le muscle lisse suggère des mécanismes délétères différents. Le fait que l'ischémie seule, sans étape de reperfusion, soit capable d'induire une altération de la relaxation endothélium-dépendante laisse penser que le stress oxydant n'est peut-être pas le seul mécanisme responsable de cette lésion et qu'un agent antioxydant pur ne peut pas être totalement protecteur. D'autre part, la dt-BC semble présenter des effets pro-oxydants qui peuvent contrebalancer son pouvoir antioxydant comme cela a été montré pour certaines flavones naturelles comme la quercétin, et comme le suggère l'absence d'effet neuroprotecteur et la diminution de la relaxation ACh-dépendante sur les animaux témoins lorsque la dose est augmentée (30 mg/kg vs 10 mg/kg).

Les deux molécules ont un effet protecteur sur la densité de courant Kir qui laisse penser que leur pouvoir antioxydant est suffisant pour neutraliser l'oxydation des protéines-canal particulièrement en empêchant l'oxydation des groupements -SH des résidus cystéine et/ou pour préserver la composition lipidique des membranes cellulaires qui peut avoir un effet propre sur l'activité des canaux Kir (Horakova & Stolc, 1998 ; Romanenko et coll 2002 et 2004; Garneau et coll, 2003).

La stobadine, agit de manière différente au niveau de la relaxation avec un effet protecteur vis à vis de la relaxation endothélium-dépendante et un effet délétère sur la relaxation musculaire lisse  $K^+$ -dépendante qui se développe au niveau basal en dehors du processus ischémique. Cet effet délétère intervient au niveau d'une étape intermédiaire entre l'hyperpolarisation des cellules par activation des canaux  $K_{ir}$  et le relâchement des myofibrilles, qui reste à identifier. L'équipe du Professeur Stolc a synthétisé de nouvelles molécules sur la base de la structure chimique de la stobadine afin de potentialiser son pouvoir antioxydant et limiter certains effets secondaires particulièrement l'effet hypotenseur transitoire observé à la suite de l'injection IV. Un de ces dérivés à fort pouvoir antioxydant a été mis à notre disposition afin de le tester dans notre modèle en comparaison de la stobadine. Il sera intéressant de voir si l'effet délétère observé sur la relaxation  $K^+$ -dépendante est encore présent. L'effet protecteur observé au niveau de l'endothélium peut résulter de la capacité de la stobadine à préserver la biodisponibilité du NO en limitant la formation de peroxy-nitrite.

Ces travaux montrent que les molécules antioxydantes ont un réel pouvoir neuroprotecteur en parallèle d'un effet vasculoprotecteur partiel. Ils ne permettent pas d'affirmer que la protection du vaisseau soit la clé indispensable au développement de l'effet neuroprotecteur mais que les mécanismes responsables des lésions vasculaires sont probablement multiples car l'endothélium et le muscle lisse ne sont pas affectés de la même manière ni protégés par les mêmes mécanismes. Une étude du rôle des polynucléaires neutrophiles dont l'activation module la réactivité musculaire au cours de l'I/R confirme cette hypothèse. La neutropénie, pharmacologiquement induite préalablement à l'ischémie, entraîne une neuroprotection et une protection de l'endothélium mais en revanche aucune prévention de l'altération du muscle lisse (Pétrault et coll, 2005 publication 32).

*Les travaux sur la dt-BC ont été publiés dans Naunyn-Schmiedeberg's Archiv of Pharmacology. "The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylchalcone is parallel to preventive effect on post-ischemic  $K_{ir2.x}$  impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction". Pétrault et coll, 2004.*

*Les travaux sur la stobadine sont actuellement poursuivis, les figures relatives aux résultats décrits ici sont présentées ci-dessous.*

**En conclusion**, l'ensemble des travaux présentés ici, a mis en évidence des altérations de la paroi vasculaire au décours de l'ischémie cérébrale en terme de conductance ionique et de

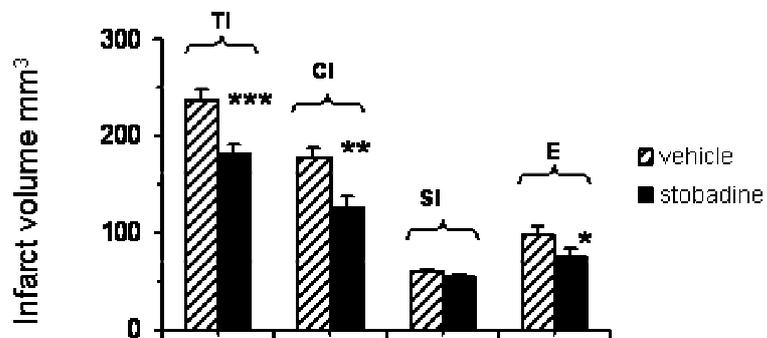
relaxation. Les altérations vasculaires peuvent être prévenues par des traitements pharmacologiques simultanément au développement d'une protection neuronale. Le lien entre ces deux protections reste difficile à déterminer. Quelle est la place de la protection vasculaire dans la protection neuronale ? La corrélation mise en évidence entre la réduction de la densité de Kir et le volume d'infarctus ainsi que l'altération progressive de ce courant sur des rats SHRsp, dans une phase préischémique suggère que le vaisseau puisse participer au développement des lésions ischémiques. D'un autre côté, il est possible d'obtenir une neuroprotection alors que seule la fonction du muscle lisse (dt-BC), que la densité de courant Kir2.1 et la fonction endothéliale sont préservées (stobadine) ou que seule la composante endothéliale est préservée (neutropénie induite par la vinblastine, Pétrault et coll, 2005 publication 32).

***The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylchalcone is parallel to preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction***

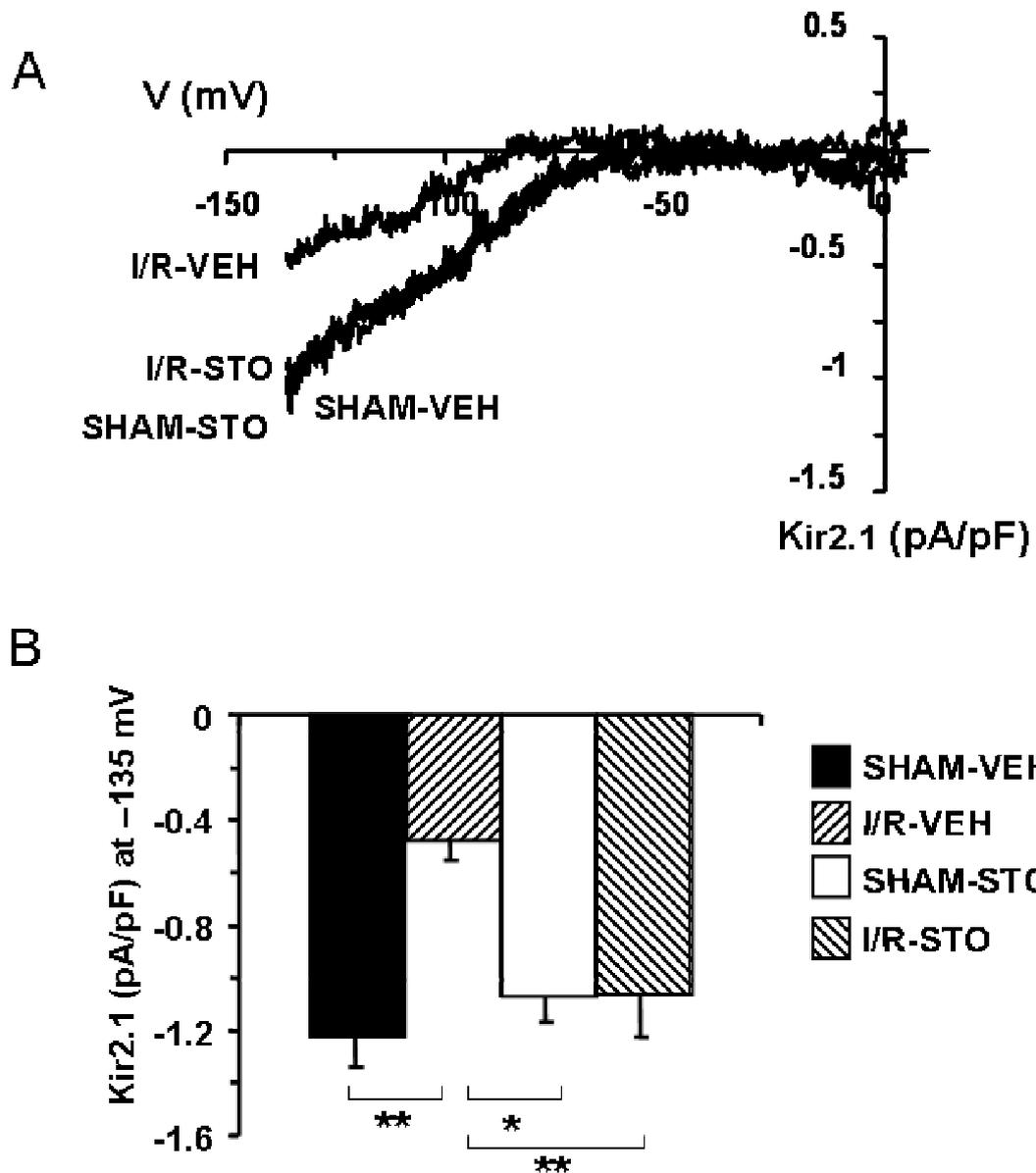
Pétrault O, Bastide M, Cotelle N, Gelé P, Gautier S, Laprais M, Vamecq J, Duriez P, Bordet R

Naunyn-Schmiedeberg's Archiv of Pharmacology, (2004), 370, 395-403.

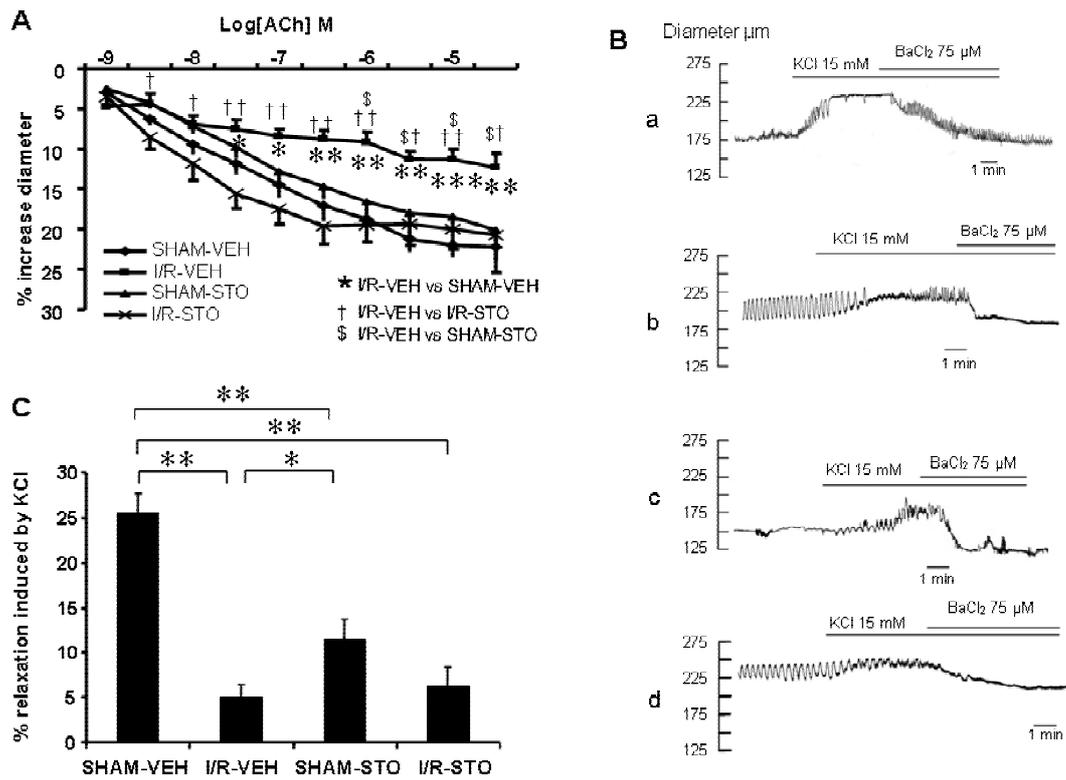
*Effets neuroprotecteur et vasculoprotecteur de la stobadine*  
*(Figures 21, 22 et 23)*



**Figure 21** : Effect of stobadine (filled bars) and vehicle (hatched bars) on total, cortical, striatal infarct volumes and edema volume. Values are mean  $\pm$  s.e.m.. \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  versus vehicle-treated animals.



**Figure 22:** Effects of stobadine on Kir2.1 current densities. **(A)** Meaned current densities recorded on smooth muscle cells originated from SHAM-VEH, SHAM-STO, I/R-VEH and I/R-STO animals. **(B)** Average Kir2.1 current densities measured at a potential of  $-135$  mV. In A and B, SHAM-VEH (n=9 cells), SHAM-STO (n=9 cells), I/R-VEH (n=6 cells), I/R-STO (n=16 cells). Values are mean  $\pm$  s.e.m; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ .



**Figure 23:** Endothelial- and KCl-dependent relaxations. **(A)** Endothelial-dependent relaxation in response to ACh ( $10^{-9}$  to  $3.10^{-5}$  M) by measurements of the percent of diameter increase of MCA originated from SHAM-VEH (diamonds;  $n=11$ ), SHAM-STO (triangles;  $n=6$ ), I/R-VEH (squares;  $n=6$ ), I/R-STO (crosses;  $n=4$ ). Values are mean  $\pm$  s.e.m. #  $p<0.05$  I/R-VEH versus SHAM-VEH; §  $p<0.05$  I/R-VEH versus I/R-STO; □  $p<0.05$  I/R-VEH versus SHAM-STO. **(B)** Representative examples of recordings of diameter changes in response to 15 mM KCl and 75  $\mu\text{M}$  BaCl<sub>2</sub> additions on SHAM-VEH MCA (a), I/R-VEH MCA (b), SHAM-STO MCA (c), I/R-STO MCA (d). **(C)** Averaged relaxation values in response to KCl addition on SHAM-VEH ( $n=15$ ), SHAM-STO ( $n=11$ ), I/R-VEH ( $n=11$ ), I/R-STO ( $n=8$ ) MCA. Values are mean  $\pm$  s.e.m. \*\*  $p<0.005$ , \*  $p<0.05$ .

## **IV- Paroi vasculaire : rôle dans la tolérance à l'ischémie cérébrale.**

Les anomalies vasculaires, comme la perte du tonus vasculaire, la réduction significative de la densité de courant Kir, de la relaxation qui en est dépendante et la diminution de la relaxation endothélium-dépendante, mises en évidence en phase préischémique (chez les rats SHRsp) et en phase postischémique, nous ont poussé à considérer le vaisseau comme une cible potentielle dans la tolérance ou la susceptibilité à l'ischémie et à suggérer qu'une vasculoprotection pourrait contribuer à la neuroprotection (Cipolla et coll, 1997; Marrelli et coll, 1998; Bastide et coll, 1999 publication 19). La tolérance à l'ischémie repose sur la notion que tout stimulus capable de provoquer une lésion peut, quand il est utilisé à une dose inférieure au seuil de lésion, protéger le cerveau contre une ischémie future.

La tolérance à l'ischémie est un enjeu d'envergure et a suscité et suscitera encore de nombreux travaux expérimentaux. Axée sur la protection neuronale, elle peut être induite par divers stimuli: le préconditionnement ischémique, l'hypoxie, et l'administration de faibles doses de LPS (dérivé d'*Escherichia coli*). Plusieurs études ont mis en évidence que l'administration d'une faible dose de LPS quelques jours (3 jours étant le délai optimal) avant de réaliser l'ischémie diminuait l'impact délétère de celle-ci comme le démontrait la plus faible taille du volume d'infarctus (Chen & Simon, 1997 ; Tasaki et coll, 1997; Dawson et coll, 1999; Bordet et coll, 2000 publication 21). L'effet bénéfique du LPS serait induit par la production de NO qu'il engendre, celui-ci n'agissant pas par un effet vasodilatateur direct mais plutôt en favorisant la production d'enzymes antioxydantes et la libération de cytokines (TNF $\alpha$ ). Le développement de cette tolérance est inhibé par le blocage de la voie du NO suite à l'administration de L-NAME (inhibiteur de la synthèse de NO) et par des inhibiteurs de la voie des prostanoides ou de la libération de TNF $\alpha$  suggérant le rôle des processus inflammatoires dans l'augmentation de la SOD (Bordet et coll, 1999 ; Puisieux et coll, 2000 publication 20). Le temps nécessaire à la mise en place de cette protection (3 jours) suggérait la synthèse de protéines ou d'enzymes. En effet, une augmentation de la synthèse de la NOS endothéliale dans les vaisseaux 24h après l'administration de LPS et de la superoxyde dismutase (SOD) dans les neurones 72h après l'administration de LPS ont été mises en évidence. Hypothèse confirmée par des travaux menés au laboratoire où il a été démontré que l'inhibition de la synthèse protéique bloquait la neuroprotection induite par le LPS (Bordet et coll, 1999).

Ces résultats nous ont amenés à regarder si la composante vasculaire jouait un rôle dans cette tolérance induite par le LPS. En parallèle de la neuroprotection, le LPS prévenait la réduction de densité du courant Kir et de la relaxation qui en dépend ainsi que la réduction de la relaxation endothélium-dépendante en réponse à l'ACH observée après 1h d'ischémie et 24h de reperfusion. La protection de la relaxation endothélium-dépendante peut s'expliquer par une production de NO accrue suite à l'augmentation de la NOS endothéliale démontrée dans les vaisseaux cérébraux (Puisieux et coll, 2000). En revanche l'effet protecteur sur le courant Kir reste plus difficile à expliquer. Bien qu'un mécanisme de régulation NO-dépendant de la relaxation K<sup>+</sup>-dépendante ait été mis en évidence sur des rats spontanément hypertendus (SHR), aucune preuve directe d'un effet du NO sur le canal Kir n'a été apportée (Chrissobolis et coll, 2002b).

Cette étude a confirmé le parallèle entre la protection neuronale et la protection vasculaire à 24 h de reperfusion qui laisse supposer un lien entre ces deux processus. En effet une prévention de l'altération des vaisseaux cérébraux doit permettre à ceux-ci de répondre aux variations de pression et maintenir dans la zone de pénombre un débit sanguin suffisant pour minimiser les lésions. Il serait intéressant de vérifier maintenant si la fraction non toxique du LPS, le monophosphoryl A utilisé en clinique dans d'autres indications dont les effets protecteurs ont été démontrés depuis plusieurs années dans l'ischémie myocardique et plus récemment dans l'ischémie cérébrale (travaux en cours au laboratoire) possède les mêmes effets protecteurs sur la fonction vasculaire.

***Ces travaux ont été publiés dans Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism  
“Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance”. Bastide et coll, 2003.***

*Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to  
brain ischemic tolerance*

**Bastide M**, Gelé P, Pétrault O, Pu Q, Caliez A, Robin E, Deplanque D, Duriez P, Bordet R

Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism ( 2003), 23(4), 399-405

# **IV- Perspectives**

## **I- Plasticité ionique de la paroi vasculaire**

### **A- Plasticité du courant Kir2.1 et récupération fonctionnelle à court terme**

L'ischémie cérébrale est une pathologie évolutive dont les conséquences vont évoluer sur des semaines et même des mois. Nous nous sommes jusque là intéressés au rôle des altérations fonctionnelles post-ischémiques vasculaires dans l'extension des lésions ischémiques et nous avons testé l'hypothèse que la prévention pharmacologique de ces altérations pouvait contribuer à améliorer la protection cérébrale. Les différents résultats obtenus ne nous ont pas permis de répondre de manière définitive à l'implication de la protection vasculaire dans la protection neuronale. Or comme l'ont souligné récemment Fagan et coll (2004) les processus pathophysiologiques impliqués dans les altérations vasculaires se développent à long terme et sont multiples et peuvent constituer autant de cibles thérapeutiques potentielles. De sorte que nos travaux réalisés à 24h de reperfusion appellent maintenant un développement sur des périodes de reperfusion beaucoup plus longues d'où l'extension de nos investigations de la phase aiguë de l'ischémie (24h de reperfusion) à la phase subaiguë (de 24h à quelques semaines). Tout en continuant nos travaux à l'échelon "cellulaire" en les développant aux autres types cellulaires de l'unité neurogliovasculaire, nous allons également étudier en parallèle le handicap fonctionnel induit par l'I/R par une évaluation des déficits neurologiques des animaux au niveau moteur et sensitif. En effet tout traitement neuroprotecteur se doit de faire la preuve d'améliorer la vie des patients en réduisant leur handicap au quotidien.

Simultanément à l'évaluation de la densité de courant Kir2.1, de la vasorelaxation qui lui est associée et de la relaxation endothélium-dépendante, une analyse comportementale sera réalisée. Une récupération fonctionnelle plus ou moins importante est généralement observée après un accident ischémique due à une plasticité cérébrale qui se met en place progressivement grâce à des propriétés intrinsèques de réparation du tissu cérébral sous-tendues par des réarrangements cellulaires et moléculaires. De cette récupération fonctionnelle va dépendre la qualité de vie des patients ayant subi un accident vasculaire cérébral. Il est donc important d'avoir des critères expérimentaux pour évaluer cette capacité de récupération spontanée, mais il est également essentiel de prouver si les différents traitements pharmacologiques qualifiés de neuroprotecteurs ont un effet bénéfique sur elle. L'analyse comportementale a été récemment implantée au laboratoire afin d'évaluer la récupération fonctionnelle des animaux. En nous basant sur la littérature, nous avons mis en place dans un premier temps deux tests simples afin

d'évaluer les capacités motrices et sensorimotrices des animaux ischémiés/reperfusés. Le premier test (sensorimoteur) est celui du retrait du ruban adhésif qui consiste à placer un morceau de ruban adhésif sur chaque patte avant de l'animal et à évaluer sa capacité à les retirer (Zhang et coll, 2000). Le deuxième test (moteur) consiste à placer l'animal par ses pattes avant sur une barre placée à 40 cm du sol (test de traction) et à évaluer sa force musculaire et ses capacités à se maintenir et se déplacer sur cette barre. Cette analyse comportementale a fait l'objet du diplôme universitaire « Sciences du Médicament et Sciences Biologiques » d'Emeline Descamps (2004-2005).

Ces travaux ont déjà été engagés et dans un premier temps nous avons décidé de suivre les animaux sur une période de 24h à 7 jours avec un temps intermédiaire de 3 jours. Les volumes d'infarctus n'évoluent pas de manière homogène, à savoir que l'infarctus cortical ne diminue pas au cours du temps et est même potentialisé bien que de manière non significative à 3 jours alors que l'infarctus striatal est significativement diminué. Nous observons une régression spontanée de l'œdème à 7 jours de reperfusion après une légère potentialisation à 3 jours, cette cinétique a déjà été décrite dans un modèle similaire (figure 24) (Slivka et coll, 1995). L'évolution des volumes d'infarctus au cours du temps a été décrite également sur l'homme avec une extension de la zone infarctée pendant les 36 premières heures qui peut évoluer jusqu'à 7 jours. Plus le volume d'infarctus précoce est important et plus le pronostic de récupération des patients est sombre. En revanche chez un petit nombre de patients dont le volume d'infarctus avait régressé au bout de 7 jours, le score neurologique était significativement meilleur (Pantano et coll, 1999).

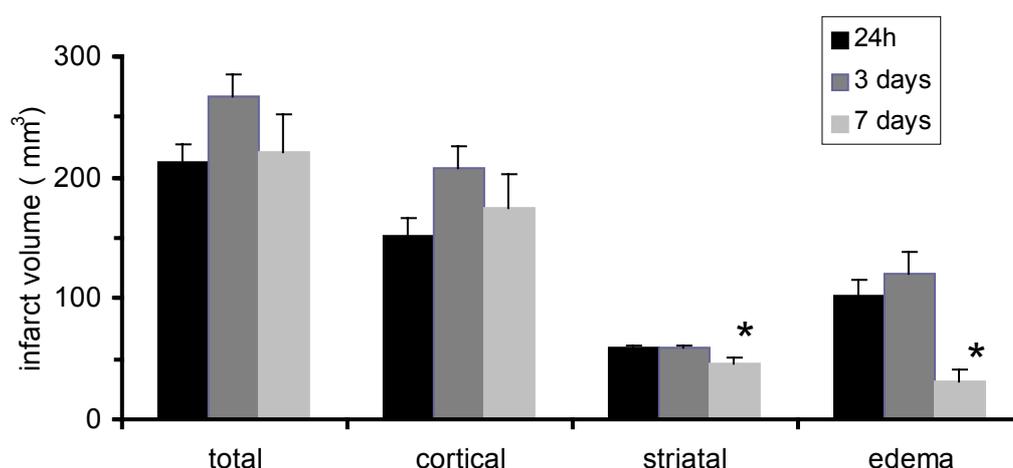
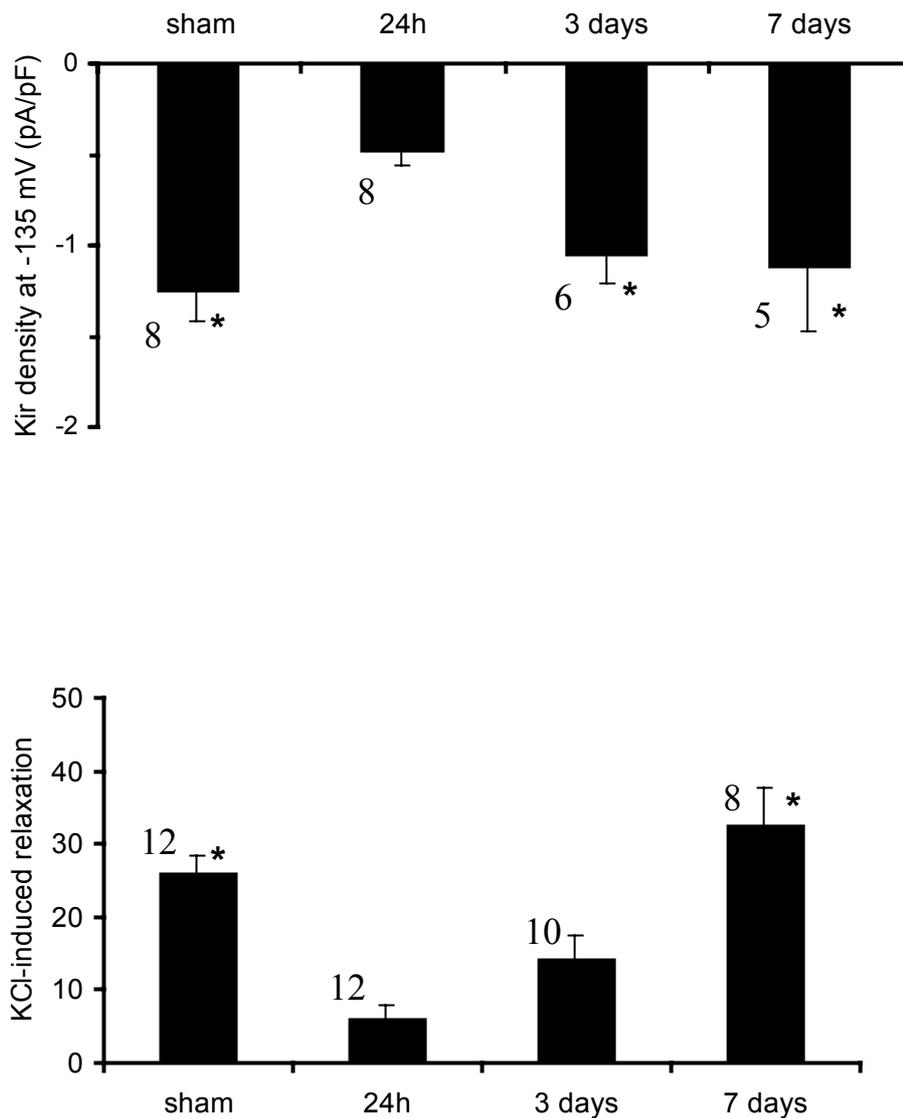


Figure 24: Volumes d'infarctus et d'œdème chez des animaux ischémiés et reperfusés pendant 24h, 3 jours ou 7 jours. \*  $p < 0,05$  vs 24h (moyenne  $\pm$  sem)

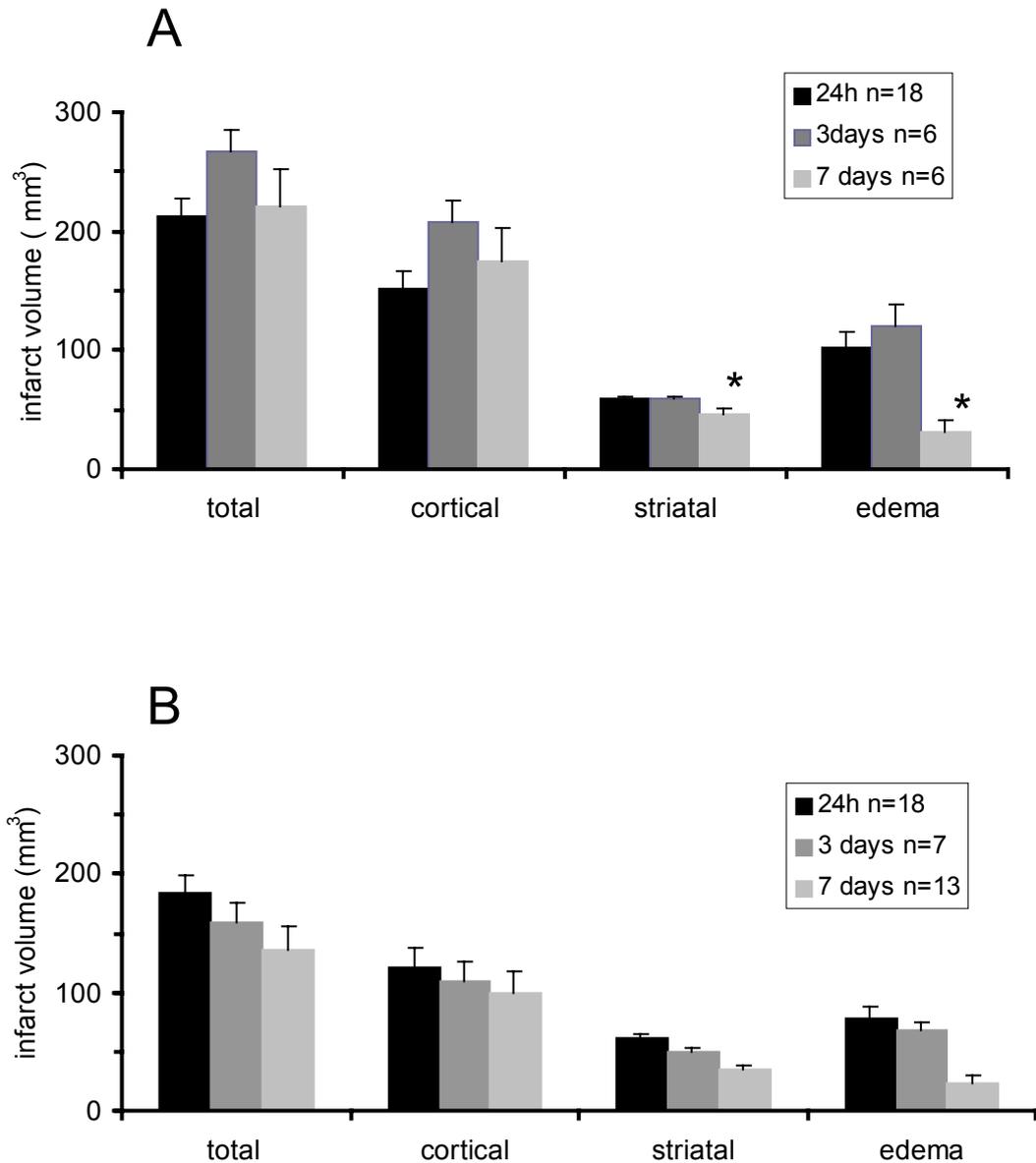
Nous avons mis en évidence au niveau vasculaire que la densité de courant Kir2.1 revenait progressivement à une valeur normale et qu'à 3 jours de reperfusion elle était similaire à celle observée sur des rats sham. En parallèle la relaxation  $K^+$ -dépendante est, elle aussi, restaurée avec une récupération totale retrouvée après 7 jours de reperfusion (figure 25). Quant à la relaxation endothélium-dépendante aucune récupération n'est observée même après 7 jours de reperfusion, ce qui confirme que les mécanismes délétères au niveau du muscle lisse et de l'endothélium empruntent probablement des voies différentes.



**Figure 25:** (A) Densité de courant Kir2.1 mesurée à  $-135$  mV sur des myocytes issus d'artères d'animaux sham ou ischémiés à différents temps de reperfusion; (B) Relaxation  $K^+$ -dépendante d'artères provenant d'animaux sham ou ischémiés à différents temps de reperfusion. \*  $p < 0,05$  vs 24h (moyenne  $\pm$  sem)

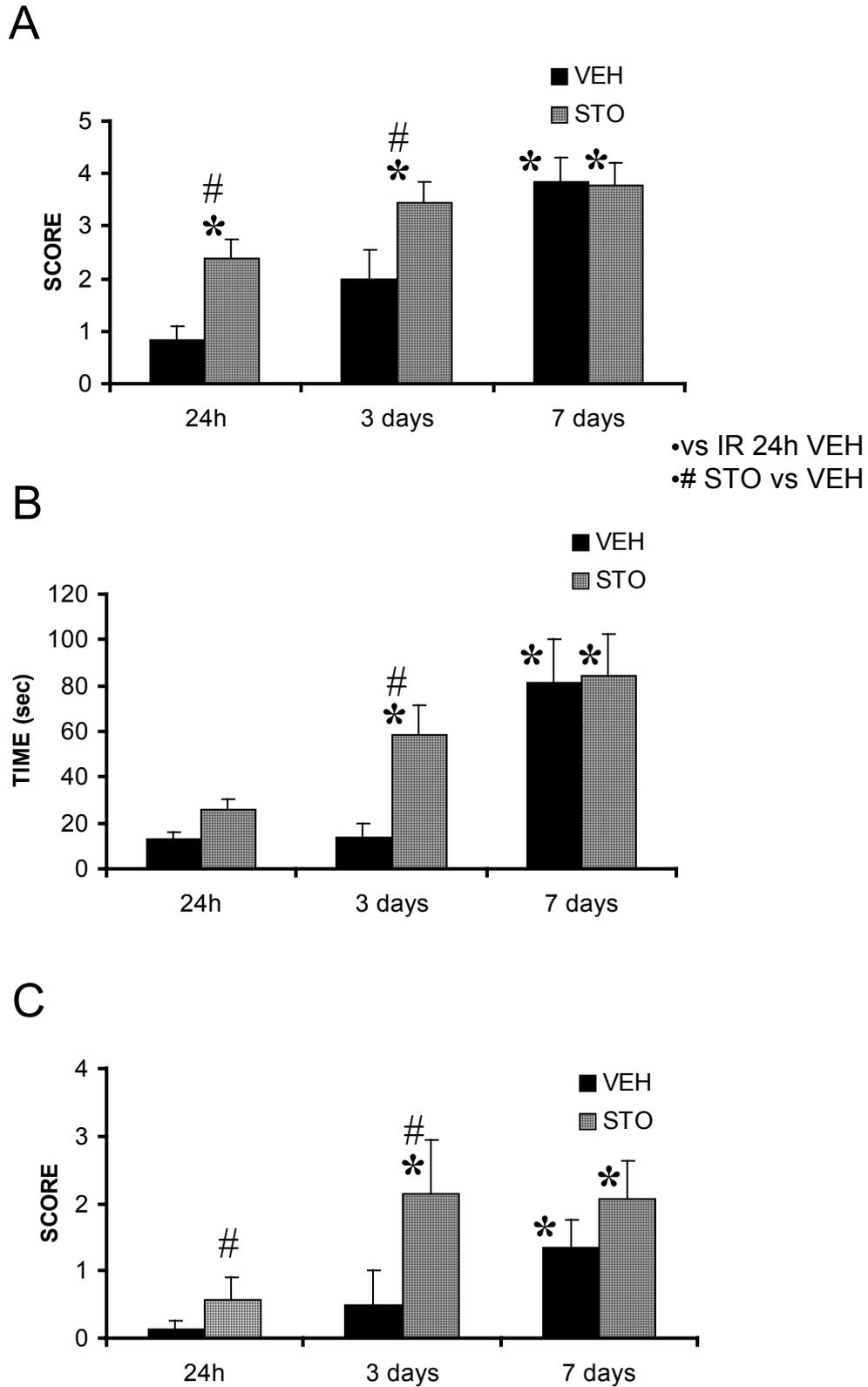
Sur la période étudiée, une amélioration des performances obtenues aux 2 tests comportementaux est observée. Dans une autre étude chez des rats ayant subi une occlusion de l'artère cérébrale moyenne de 30 minutes à 7 jours, une récupération totale des performances obtenues au test du ruban adhésif a été observée, alors que sur des animaux ayant subi une ischémie de 120 minutes la récupération ne s'observait qu'après 21 jours (Zhang et coll, 2000). Dans notre protocole la récupération obtenue après 1h d'occlusion est intermédiaire entre ces deux temps puisqu'elle est partielle et significative seulement après 7 jours de reperfusion. Le résultat obtenu avec le test de traction corrobore également ces résultats puisqu'une récupération progressive et partielle des animaux est observée à 7 jours de reperfusion. Ces améliorations peuvent être mises en relation avec la diminution significative du volume d'infarctus dans le striatum, une des zones du cerveau intervenant dans le développement des commandes motrices et celle du volume d'œdème qui réduit la pression intracrânienne et permet ainsi une meilleure reperfusion des tissus. Ces résultats rejoignent l'étude de Pantano et coll (1999). Les deux tests comportementaux que nous avons mis en place permettent de mettre en évidence une récupération fonctionnelle spontanée mais incomplète après 7 jours de reperfusion, simultanément à la restauration de la fonction musculaire lisse ce qui suggère une plasticité postischémique au niveau cérébral et vasculaire. Néanmoins il est nécessaire de compléter ces tests avec des animaux supplémentaires afin de voir s'il est possible d'établir une corrélation entre les volumes d'infarctus et les performances obtenues aux tests comme cela a été montré dans un modèle d'ischémie focale par introduction d'un embolie chez la souris (Zhang et coll, 2002).

De ces résultats encourageants se dégagent deux perspectives à exploiter, étendre la période d'étude à 14, 28 jours voire 2 mois pour continuer à quantifier la récupération fonctionnelle, et tester l'impact de traitement neuroprotecteur sur cette phase de récupération spontanée. Dans ce but, nous avons traité des rats avec la stobadine (2 mg/kg), l'agent antioxydant précédemment testé à 24h de reperfusion, et les animaux ont été évalués à 24h, 3 et 7 jours. Des premiers résultats obtenus, nous avons pu constater une évolution différente des volumes d'infarctus au cours de la période d'étude par rapport aux animaux traités avec le véhicule. Premièrement les volumes sont globalement plus faibles chez les rats traités par la stobadine que chez les rats traités par le véhicule. Deuxièmement ils diminuent durant les 7 jours de manière progressive et significative sans observer de potentialisation à 3 jours de reperfusion (figure 26).



**Figure 26:** Volumes des infarctus totaux, corticaux, striataux et d'œdème à 24 h, 3 et 7 jours de reperfusion mesurés sur des rats traités par le véhicule (A) ou par la stobadine (2 mg/kg) (B). \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.005$  vs 24h (mean $\pm$ sem)

L'administration de stobadine a un effet bénéfique sur la récupération fonctionnelle en accélérant la récupération des animaux ischémiés/reperfusés. Comme il est illustré sur les histogrammes ci-dessous, dès 24h en ce qui concerne le test du ruban adhésif et dès 3 jours pour le test de force de traction, les animaux traités réalisent des performances significativement meilleures que les animaux traités par le véhicule (figure 27).



**Figure 27:** Test du ruban adhésif (A) et de la force de traction (B, C) à 24 h, 3 et 7 jours de reperfusion par des animaux traités par le véhicule (barre noire) ou la stobadine (barre quadrillée) A. Score de comportement. B. Durée passée accrochée à la barre. C. Score de comportement. \*:  $p < 0,05$  vs IR 24h VEH; #  $p < 0,05$  IR STO vs IR VEH)

Les effets de la stobadine sur la réactivité vasculaire aux temps de reperfusion de 24h, 3 et 7 jours sont en cours de réalisation et vont venir compléter cette étude. Mais ces premiers résultats sont prometteurs et suggèrent que l'on puisse, par modulation pharmacologique, améliorer le pronostic de l'ischémie cérébrale du moins à 7 jours de reperfusion. Ce résultat a été observé avec un autre agent antioxydant, le NXY-059, qui améliore le déficit neurologique 24h après une ischémie transitoire ou permanente en parallèle d'une diminution des volumes d'infarctus chez le rat (Sydserff et coll, 2002). Cet agent antioxydant (NXY-059 ou Cerovive) maintenant en phase III d'essai clinique a montré des effets neuroprotecteurs chez des patients avec une amélioration de la récupération fonctionnelle postischémique, sur la base d'une administration à la phase aiguë de l'ischémie/reperfusion (dans les 6 heures suivant l'apparition des symptômes) (SAINT I et II, Stroke Interner Center, 2005). Ce résultat positif chez l'homme est le premier obtenu avec un agent antioxydant et nous incite à poursuivre l'étude de ce type de molécules notamment en regardant à plus long terme les effets sur la plasticité vasculaire, cérébrale en parallèle de la récupération fonctionnelle. Dans le cadre de la collaboration avec le Prof S. Stolc, nous disposons d'un dérivé de la stobadine récemment développé par l'Institut de Pharmacologie de Bratislava avec des propriétés antioxydantes plus puissantes dont nous allons pouvoir mesurer les effets sur les volumes d'infarctus et les performances fonctionnelles des animaux ischémiés/reperfusés.

## **B- Régulation et modulation de l'expression du courant Kir2.1**

Nous allons poursuivre l'étude du courant Kir2.1 en nous attachant à deux points particuliers, le premier concernera la régulation propre du courant et le second, l'étude de son expression par Western-blot chez des rats témoins et au cours de l'ischémie en fonction des différents temps de reperfusion et des différents traitements pharmacologiques appliqués.

La rectification entrante du courant Kir2.1 est sous la dépendance à la fois des ions  $Mg^{2+}$  intracellulaire et de la concentration intracellulaire en polyamines (spermine, spermidine, putrescine). L'administration de polyamines dans des modèles de trauma ou d'ischémie a démontré une action neuroprotectrice par le biais d'une modulation du stress oxydant et du contrôle de l'homéostasie calcique. Est-ce que par l'administration de polyamines il serait possible de modifier l'activité du courant Kir2.1 en modifiant ses caractéristiques électrophysiologiques intrinsèques, le protéger du stress oxydant et participer ainsi à la protection vasculaire? L'utilisation de nouveaux dérivés synthétiques lipophiles de polyamines

ou d'inhibiteurs de leur synthèse devraient nous aider à répondre à cette question (Gilad & Gilad, 1999).

La mise au point du contrôle de l'expression de la protéine Kir2.1 par la technique du Western-blot est en cours au laboratoire afin de mettre en évidence sur les artères cérébrales moyennes si la réduction de la densité de courant Kir2.1 est la conséquence d'une diminution de l'expression de la protéine suite à l'ischémie. Le délai de 3 jours nécessaire à la récupération progressive de la densité du courant après l'ischémie pourrait être lié au délai de synthèse et de maturation de nouvelles protéines.

### **C- Implication du courant Kv dans la pathologie ischémique**

Parmi les quatre types de courant potassique présents sur le muscle lisse, le courant Kv voltage-dépendant a été peu étudié. Or, de par son rôle important dans la repolarisation des cellules musculaires lisses et la relaxation du vaisseau, il serait intéressant d'étudier les altérations éventuelles de ce courant potassique au décours de l'ischémie-reperfusion cérébrale (Nelson & Quayle, 1995). De plus, il a été montré, par analyse de la réactivité vasculaire de l'artère cérébrale moyenne, que le courant Kv est modulé par le monoxyde d'azote via la voie du GMPc. Aucune preuve électrophysiologique n'est venue à ce jour corroborer cette observation. Dans un premier temps nous voulons disséquer pharmacologiquement cette régulation. Dans un second temps, la voie du NO étant fortement perturbée au cours de l'ischémie/reperfusion, nous voulons observer quelles peuvent en être les conséquences sur l'activité de ces canaux Kv et la régulation du débit sanguin cérébral (Sobey et Faraci, 1999).

## **II- Facteurs de risque et paroi vasculaire**

Dans la suite de nos travaux sur les rats SHRsp, nous voulons continuer à étudier l'impact des facteurs de risque sur la paroi vasculaire dans la survenue d'accidents vasculaires cérébraux. Le syndrome métabolique qui associe différents facteurs de risque, hypertension artérielle, diabète de type 2 et dyslipémie, représente une situation particulièrement favorable au développement d'accident vasculaire cérébral. Différents travaux expérimentaux plaident pour une implication d'anomalies des conductances ioniques du muscle lisse dans la survenue des accidents ischémiques dès qu'un facteur de risque est présent: (i) les courants potassiques calcium-dépendants et ATP-dépendants altérés en cas de résistance à l'insuline (Erdös et coll, 2002 et 2004) ; (ii) les courants potassiques calcium-dépendants et voltage-dépendants modifiés

chez le rat spontanément hypertendu (Liu et coll, 1998) ; (iii) le courant potassique Kir 2.1 musculaire lisse altéré avec l'âge chez le rat SHRsp, parallèlement au risque de survenue d'une ischémie cérébrale spontanée (Bastide et coll, en préparation).

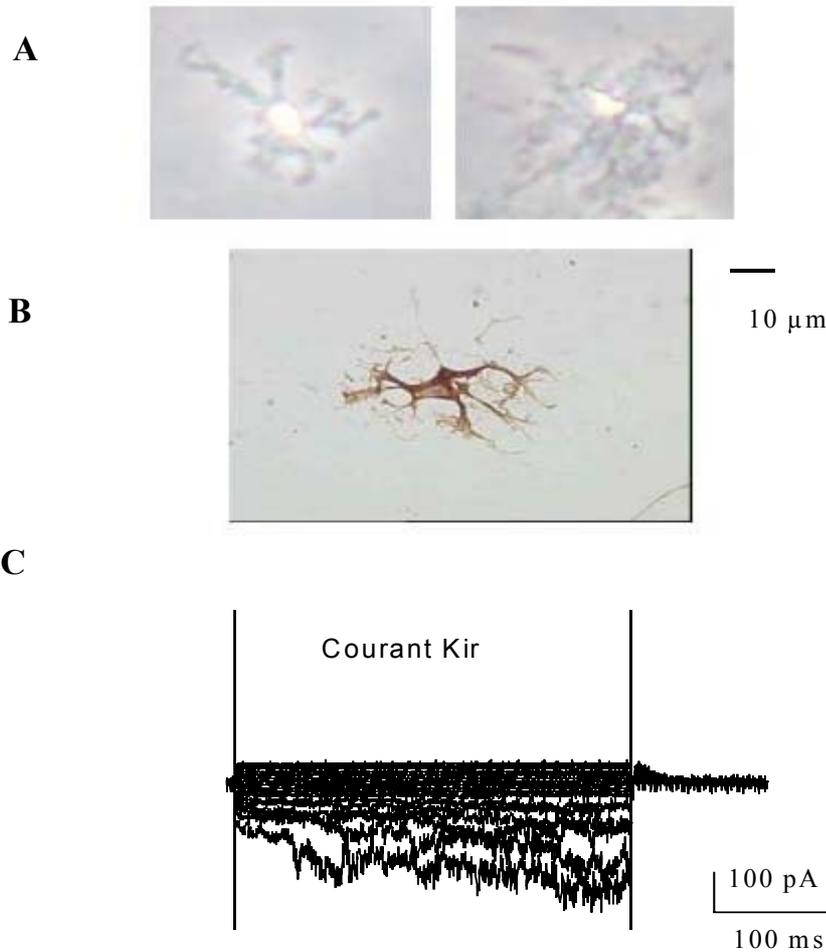
Ces données nous incitent à développer un modèle expérimental de syndrome métabolique qui nous permettrait d'évaluer électrophysiologiquement l'impact de l'association de plusieurs facteurs de risque sur l'activité des canaux ioniques des cellules vasculaires musculaires lisses. Par un régime alimentaire adapté, il est possible d'induire un syndrome métabolique chez des rats SHR. Nous nous focaliserons sur l'étude des canaux calciques et potassiques, en évaluant leur altération, la cinétique d'installation de cette plasticité ionique et son rôle dans la survenue d'un infarctus spontané ou d'une susceptibilité accrue vis-à-vis de l'ischémie cérébrale. Nous évaluerons si des agents pharmacologiques utilisés à visée préventive dans le syndrome métabolique (anti-hypertenseurs, activateurs de PPAR-alpha et de PPAR-gamma, statines) sont susceptibles de corriger les anomalies des conductances ioniques.

### **III- Plasticité ionique neuro-gliale**

Il a été démontré que suite à l'ischémie dans les semaines qui suivent l'accident, des phénomènes de plasticité cérébrale particulièrement au niveau cortical, se mettent en place au cours du temps, avec des changements dans la distribution et la latéralité des représentations de fonctions cognitives, de la motricité et des fonctions sensorielles qui sont corrélées avec la récupération fonctionnelle postischémique. Ces changements se produisent tant du côté ipsilatéral que du côté controlatéral à la lésion en induisant des phénomènes de compensation. Cette réorganisation du cerveau implique l'émergence de nouveaux bourgeonnements neuronaux avec des projections locales, intrahémisphériques voire interhémisphériques et de nombreux processus cellulaires dont des modifications des conductances ioniques (Carmichael, 2003; Calabresi et coll, 2004). Au sein de cette reconstruction, des échanges d'information sont initiés par les grandes voies moléculaires et peuvent être traduits, en partie, par des modifications des mouvements ioniques via les canaux transmembranaires. Différents travaux ont montré ponctuellement des modifications d'activité de différentes conductances ioniques en période postischémique. Par exemple, une augmentation de l'amplitude et de la conductance des courants calciques a été mise en évidence sur les neurones corticaux situés du côté contralatéral à l'occlusion. Cette modification, présente sur une durée de 28 jours correspondant à celle de l'étude, est présente seulement chez des animaux qui présentent un volume d'infarctus modéré et une capacité de récupération significative. Chez les animaux présentant un infarctus massif,

aucune potentialisation des courants calciques n'est observée et aucune récupération fonctionnelle n'est observée chez ces animaux fortement lésés (Bruehl et coll, 2000). Au niveau astrocytaire, une up-régulation des canaux calciques voltage-dépendants de type L (classe C) a été décrite, elle induirait une libération accrue de facteurs de croissance et de cytokines favorisant la survie neuronale (Westenbroeck et coll, 1998). Ces résultats montrent une évolution parallèle au cours du temps entre les modifications des conductances calciques (côté ipsilatéral et côté contralatéral à la lésion) et l'évolution positive de la récupération.

En revanche, une altération transitoire d'une conductance potassique de type Kir a été observée sur les astrocytes provenant de la zone d'infarctus et de la zone péri-infarctuelle, 3 jours après l'ischémie-reperfusion avec une récupération progressive après 14 jours de reperfusion (Koller et coll, 2000). La conductance Kir des astrocytes est essentielle dans le mécanisme de "K<sup>+</sup> buffering" qui permet de réguler la concentration potassique extracellulaire et l'excitabilité neuronale (Kofuji & Newman, 2004). Dès lors que cette conductance est altérée le contrôle de l'homéostasie potassique n'est plus assuré et une dysfonction neuronale est observée liée à une hyperexcitabilité. Une récupération précoce de cette conductance ne pourrait être que bénéfique pour la restauration de l'activité neuronale et limiter l'extension des effets délétères. Nous avons cherché dans notre modèle à mettre en évidence l'altération du courant Kir2.1 sur les astrocytes suite à l'ischémie cérébrale par une étude en patch-clamp sur astrocytes isolés. Cette étude a fait l'objet du DEA de Fabrice Plaisier (année 2003-2004). Au cours de cette étude nous avons observé que la préparation d'astrocytes fraîchement isolés par dissociation enzymatique est très difficile à utiliser en patch-clamp (animaux en bas âge, faible rendement cellulaire et structure très plate avec des prolongements étoilés) et de très rares enregistrements ont pu être obtenus (figure 28).



**Figure 28:** Microphotographies d'astrocytes de rat fraîchement isolés par dissociation enzymatique (A) et après immunomarquage avec la GFAP (glial fibrillary acid protein) (B). Enregistrement du courant Kir sur un astrocyte fraîchement isolé (C) (Plaisier, 2004).

Classiquement les astrocytes sont très peu étudiés sur cellules isolées immédiatement après dissociation enzymatique mais plutôt en culture primaire ou sur tranches de cerveau. Grâce au soutien de la Région Nord-Pas de Calais (financement CPER-FEDER) le laboratoire a pu faire l'acquisition d'un microscope à infra-rouge qui va nous permettre de réaliser des explorations électrophysiologiques sur tranches de cerveau à partir d'animaux ischémiés/reperfusés. Ce nouvel outil électrophysiologique va nous permettre d'étudier la plasticité cérébrale d'un point de vue mouvements d'ions au sein de l'unité neuro-glio-vasculaire au cours de la pathologie ischémique et de tester des modulateurs pharmacologiques. Nous nous proposons d'étudier l'implication des conductances potassiques (Kir) et calciques, neuronales et/ou gliales, dans les processus de récupération fonctionnelle dans notre modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale. Nous les étudierons, au cours du temps (J1, J3, J7, J14 et J28 voire J56 de

reperfusion) dans le cortex ipsilatéral, en bordure de la zone d'infarctus où il a été démontré que d'importantes réorganisations fonctionnelles se mettent en place et dans le cortex controlatéral en vis à vis de la lésion (Nudo & Friel, 1999). La préparation sur tranches nous permettra de travailler sur des zones "géographiques" bien localisées du cerveau et de délimiter pour chaque animal la zone d'infarctus, la zone péri-infarctuelle et les vis à vis correspondant du côté contralatéral à la lésion. Les volumes d'infarctus cérébraux et leur évolution seront quantifiés sur ces mêmes temps de reperfusion et une analyse comportementale sera réalisée en parallèle. Une inhibition ou une suractivation d'un canal peut être à la base d'un mécanisme protecteur ou délétère et peuvent être corrélées à l'évolution des altérations lésionnelles et comportementales. L'objectif à terme sera de comprendre l'origine des signaux moléculaires mis en cause dans cette plasticité ionique, afin de pouvoir la moduler dans le but d'accélérer la récupération fonctionnelle soit en utilisant des agents pharmacologiques (antioxydants, facteurs de croissance, statines, activateurs de récepteurs PPAR) soit par d'autres moyens tels que l'enrichissement de l'environnement ou l'entraînement physique (Ang et coll, 2003; Wang et coll, 2005).

# Références

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, 97(2): 175-187.

Albarwani S, Nemetz LT, Madden JA, Tobin AA, England SK, Pratt PF, Rusch NJ (2003) Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in rat small cerebral arteries: molecular identity of the functional channels. *J Physiol*, 551: 751-763.

Ang ET, Wong PTH, Moochhala S, NG YK (2003) Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience*, 118: 335-345.

Archer SL, Huang JMC, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 7583-7587.

Arribas SM, Gordon JF, Daly CJ, Dominiczak AF, McGrath JC (1996) Confocal microscopic characterization of a lesion in a cerebral vessel of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Stroke*, 27: 1118-1123.

Bari F, Louis TM, Meng W, Busija DW (1996) Global ischemia impairs ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel function in cerebral arterioles in piglets. *Stroke*, 27: 1874-1881.

Bari F, Louis TM, Busija DW (1997) Calcium-activated K<sup>+</sup> channels in cerebral arterioles in piglets are resistant to ischemia. *J Cereb Blood Flow metab*, 17(11): 1152-1156.

Bkaily G, Sperelakis N (1985) Injection of guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate into heart cells blocks calcium slow channels. *Am J Physiol*, 248: H745-H749.

Blondeau N, Jarretou G, Gounon P, Giordano V, Lazdunski M, Heurteaux C (2005) Is the vascular TREK-1 potentially involved in PUFAS-induced neuronal protection? XXII<sup>nd</sup> International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function. June 7-11, 2005, Amsterdam, The Netherlands.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368: 850-853

Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, Puisieux F, Pu Q, Robin E, Martin A, Bastide M, Leys D, Lhermitte M, Dupuis B (2000) Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20: 1190-1196.

Bradley KK, Jaggar JH, Bonev AD, Heppner TJ, Flynn ERM, Nelson MT, Horowitz B (1999)  $K_{ir}2.1$  encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol*, 515: 639-651.

Bruehl C, Neumann-Haefelin T, Witte OW (2000) Enhancement of whole cell calcium currents following transient MCAO. *Brain Res*, 884: 129-138.

Brutsaert DL (1993) Endocardial and coronary endothelial control of cardiac performance. *News Physiol Sci*, 8: 82-86.

Buckingham SD, Kidd JF, Law RJ, Franks CJ, Sattelle DB (2005) Structure and function of two-pore-domain  $K^+$  channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol Sci*, 26 (7): 361-367.

Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Cupini L, Bernardi G (2003) Synaptic plasticity in the ischemic brain. *Lancet Neurol*, 2: 622-629

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*, 78: 415-423.

Carlsson L, Amos GJ, Andersson B, Drews L, Duker G, Wadstedt G (1997) Electrophysiological characterization of the prokinetic agents cisapride and mosapride *in vivo* and *in vitro*: implications for proarrhythmic potential? *J Pharmacol Exp Ther*, 282: 220-227.

Carmichael ST (2003) Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist*, 9: 64-75.

Chen J, Simon R (1997) Ischemic tolerance in the brain. *Neurology*, 48: 306-311.

Choe H, Sackin H, Palmer LG (2000) Permeation properties of inward-rectifier potassium channels and their molecular determinants. *J Gen Physiol*, 115: 391-404.

Chrissobolis S, Sobey CG (2002a) Inhibitory effects of protein kinase C on inwardly rectifying K<sup>+</sup>- and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-mediated responses of the basilar artery. *Stroke*, 33: 1692-1697.

Chrissobolis S, Ziogas J, Anderson CR, Chu Y, Faraci FM, Sobey CG (2002b) Neuronal NO mediates cerebral vasodilator responses to K<sup>+</sup> in hypertensive rats. *Hypertension*, 39: 880-885.

Cipolla MJ, McCall AL, Lessov N, Porter JM (1997) Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal ischemia in rats. *Stroke*, 28: 176-180.

Cipolla MJ, Curry AB (2002) Middle cerebral artery function after stroke: the threshold duration of reperfusion for myogenic activity. *Stroke*, 33(8): 2094-9.

Cippola MJ, Lessov N, Hammer ES, Curry AB (2001) Threshold duration of ischemia for myogenic tone in middle cerebral arteries: effect on vascular smooth muscle actin. *Stroke*, 32: 1658-1664.

Cohen RA, Vanhoutte PM (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic cGMP. *Circulation*, 92: 3337-3349.

Collins A, Chuang HH, Nung Jan Y, Yeh Jan L (1997) Scanning mutagenesis of the putative transmembrane segments of K<sub>ir</sub>2.1, an inward rectifier potassium channel. *Proc Natl Acad Sci*, 94: 5456-5460.

Coyle P, Heistad DD (1991) Development of collaterals in the cerebral circulation. *Blood vessels*, 28: 183-189.

D'Ambrosio R, Gordon DS, Winn HR (2002) Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K(+) in rat hippocampus. *J Neurophysiol*, 87(1): 87-102.

Dawson DA, Furuya K, Gotoh J, Nakao Y, Hallenbeck JM (1999) Cerebrovascular hemodynamics and ischemic tolerance: lipopolysaccharide-induced resistance to focal cerebral ischemia is not due to changes in severity of the initial ischemic insult, but is

associated with preservation of microvascular perfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19: 616-623.

Dessertenne F, Fabiato A, Coumel P (1996) A new chapter in electrocardiography : progressive variations in the amplitude of the electrocardiogram. *Actual Cardiol Angeiol Int (Paris)*, 15: 241-58.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22: 391-397.

Drolet B, Khalifa M, Daleau P, Hamelin BA, Turgeon J (1998) Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation*, 97: 204-210.

Edwards FR, Hirst GD, Silverberg GD (1988) Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol*, 404: 455-66.

Erdős B, Miller AW, Busija DW (2002) Alterations in  $K_{ATP}$  and  $K_{Ca}$  channel function in cerebral arteries of insulin-resistant rats. *Am J Physiol*, 283: H2472-2477.

Erdős B, Simandle SA, Snipes JA, Miller AW, Busija DW (2004) Potassium channel dysfunction in cerebral arteries of insulin-resistant rats is mediated by reactive oxygen species. *Stroke*, 35: 964-969.

Escande D, Le Marec H (2000) Le syndrome du QT long congénital. [www.sciences.univ-nantes.fr](http://www.sciences.univ-nantes.fr)

Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A (2004) Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke*, 35: 2220-2225.

Faraci FM, Heistad DD (1998) Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*, 78: 53-97.

Faraci FM, Sobey CG (1998) Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18: 1047-1063.

Forstermann U, Kleinert H (1995) Nitric oxide synthase : expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schiedebergs Arch of Pharmacol* 352:351-364

Furchgott RF, Zawadski JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 28: 373-376.

Gardener MJ, Johnson IT, Burnham Mp, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH (2004) Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*, 142: 192-202.

Garneau L, Klein H, Parent L, Sauvé R (2003) Contribution of cytosolic cysteine residues to the gating properties of the Kir2.x inward rectifier. *Biophys J*, 84: 3717-3729.

Gasche Y, Copin J-C (2003) Physiopathologie de la barrière hématoencéphalique et œdème cérébral d'origine ischémique. *Ann Fr Anesth Reanim*, 22: 312-319.

Gilad GM, Gilad VH (1999) Novel polyamine derivatives as neuroprotective agents. *J Pharmacol Exp ther*, 291: 39-43.

Halpern W, Kelley M (1991) In vitro methodology for resistance arteries. *Blood Vessels*, 228: 245-251.

Hamilton CA, Brosnan J, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF (2001) Superoxide excess in hypertension and aging. *Hypertension*, 37(part 2): 529-534.

Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zancouri M, Romey G, Lazdunski M (2004) TREK-1, a K(+) channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J*, 23: 2684-2695.

Hill MA, Zou H, Potocnik SJ, Mienninger GA, Davis MJ (2001) Arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca<sup>2+</sup> signalling pathways underlying myogenic reactivity. *J Appl Physiol*, 91: 973-983.

Horakova L, Stolec S (1998) Pharmacodynamic effects of pyridoindole stobadine. *Gen Pharma*, 30: 627-638.

Internet Stroke Center (2004) Washington University School of Medicine Internet Stroke Clinical Trials Database. <http://www.neuro.wustl.edu/stroke>

Irvine JC, Favalaro JL, Kemp-Harper B (2003) NO<sup>-</sup> activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension*, 41: 1301-1307.

Ji G, Feldman ME, Greene KS, Sorrentino V, Xin HB, Kotlikoff MI (2004) RYR2 proteins contribute to the formation of Ca<sup>2+</sup> sparks in smooth muscle. *J Gen Physiol*, 123: 377-386.

Katusic ZS (1996) Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radical Biol Med*, 20: 443-448

Kelm M, Schrader J (1988) Nitric oxide release from the isolated guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol*, 155: 317-321.

Kerr S, Brosnan J, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA (1999) Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension. Role of the endothelium. *Hypertension*, 33: 1353-1358.

Kitazono T, Heistad DD, Faraci FM (1993) ATP-sensitive potassium channels in the basilar artery during chronic hypertension. *Hypertension*, 22: 677-681.

Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129: 1045-1056.

Köller H, Schroeter M, Jander S, Stoll G, Siebler M (2000) Time course of inwardly rectifying K<sup>+</sup> current reduction in glial cells surrounding ischemic brain lesions. *Brain Res*, 872: 194-19

Korovkina VP, England SK (2002) Detection and implications of potassium channel alterations. *Vascul Pharmacol*, 38: 3-12.

Kourie JI (1998) Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol*, 275- C1-C24.

- Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H (1995) Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol Rev*, 47: 387-573.
- Lacroix D, Delfaut P, Adamantidis M, Cardinal R, Klug D, Kacet S, Dupuis B (1998) Differential effects of quinidine, flecainide and cibenzoline on anisotropic conduction in the isolated porcine heart. *J Cardiovascular Electrophysiol*, 9: 55-69.
- Lacroix D, Extramiana F, Delfaut P, Adamantidis M, Grandmougin D, Klug D, Kacet S, Dupuis B (1999) Factors affecting epicardial dispersion of repolarization : a mapping study in the isolated porcine heart. *Cardiovasc Res*, 41: 563-574.
- Lebeau J, Furman C, Bernier JL, Duriez P, Teissier E, Cotelle N (2000) Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 278: 32068-32076.
- Lebeau J, Nevriere R, Cotelle N (2001) Beneficial effects of different flavonoids, on functional recovery after ischemia and reperfusion in isolated rat heart. *Bioorg Med Chem Lett*, 11: 23-27.
- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW (2000) Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest*, 106: 723-731.
- Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow CY, Van Breemen C (2002)  $Ca^{2+}$  oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, 282: H1571-H1583.
- Liu Y, Gutterman DD (2002) Oxidative stress and potassium channel function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29: 305-311.
- Liu Y, Hudetz AG, Knaus HG, Rusch N (1998) Increased expression of  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^+$  channels in the cerebral microcirculation of genetically hypertensive rats. Evidence for their protection against cerebral vasospasm. *Circ Res*, 82: 729-737.
- Löhn M, Jessner W, Fürstenau M, Wellner M, Sorrentino V, Haller H, Luft FC, Gollasch M (2001) Regulation of calcium sparks and spontaneous transient outward currents by RyR3 in arterial vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 89: 1051-1057.

- Magyar J, Banyasz T, Bagi Z, Pacher P, Szentandrassy N, Fulpo L, Kesckemeti V, Nanasi PP (2002) Electrophysiological effects of risperidone in mammalian cardiac cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 366: 350-356
- Marrelli SP, Johnson TD, Khorovets A, Childres WF, Bryan RM (1998) Altered function of inward rectifier potassium channels in cerebrovascular smooth muscle after ischemia/reperfusion? *Stroke*, 29:1469-1474.
- Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T (1992) Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett*, 307:287-293.
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal  $Mg^{2+}$ . *Nature*, 325 : 156-9.
- McCarron JG, Halpern W (1990a) Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol*, 259 : H902-H908.
- McCarron JG, Halpern W (1990b) Impaired potassium-induced dilation in hypertensive rat cerebral arteries does not reflect altered  $Na^+, K^+$ -ATPase dilation. *Circ Res*, 67: 1035-1039.
- Méry PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R (1991)  $Ca^{2+}$  current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 88 : 1197-1201.
- Méry PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R (1993) Nitric oxide regulates cardiac  $Ca^{2+}$  current. *J Biol Chem*, 268(35): 26286-26295.
- Mohammad S, Zhou Z, Gong Q, January CT (1997) Blockage of the HERG human cardiac  $K^+$  channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride. *Am J Physiol*, 273: H2534-2538.
- Moncada S, Higgs EA (1995) Molecular mechanism and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J*, 9: 1319-1330.
- Nelson MT, Bonev AD (2004) The  $\beta_1$  subunit of the  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^+$  channel protects against hypertension. *J Clin Invest*, 113 : 955-957.

Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Cell Physiol*, 37 : C799-C822.

Nelson MT, Conway MA, Knot HJ, Brayden JE (1997) Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J Physiol*, 502 : 259-264.

Nudo RJ, Friel KM (1999) Cortical plasticity after stroke: implications for rehabilitation. *Rev Neurol*, 155 (9): 713-717.

Oliver D, Baukrowitz T, Fakler B (2000) Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem*, 267: 5824-5829.

Pantano P, Caramia F, Bozzao L, Dieler C, von Kummer R (1999) Delayed increase in infarct volume after cerebral ischemia. Correlations with thrombolytic treatment and clinical outcome. *Stroke*, 30: 502-507.

Perez GJ, Bonev AD, Patlak JB, Nelson MT (1999) Functional coupling of ryanodine receptors to K<sub>Ca</sub> channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J Gen Physiol*, 113: 229-237.

Petersson J, Zygmunt PM, Hogestatt ED (1997) Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br J Pharmacol*, 120 : 1344-1350.

Pétrault O (2004) Etude des altérations fonctionnelles de la paroi vasculaire au cours du processus d'ischémie-reperfusion cérébrale : mécanismes physiopathologiques et approches pharmacologiques. Thèse d'université.

Plaisier F (2004) Etude des courants Kir des cellules musculaires lisses et des astrocytes au cours de l'ischémie cérébrale chez le sujet jeune et adulte : Effets neuroprotecteur et vasculoprotecteur de la stobadine. DEA.

Pogwizd SM, Bers D (2004) Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends cardiovasc Med*, 14(2): 61-66.

Puisieux F, Adamantidis M, Dumotier B, Dupuis B (1996) Cisapride-induced prolongation of cardiac action potential and early afterdepolarization in rabbit Purkinje fibres. *Br J Pharmacol*, 117(7): 1377-1379.

Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, Souil E, Bastide M, Bordet R (2000) Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *Eur J Pharmacol*, 389: 71-78.

Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT (1993) Inward rectifier K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol*, 265: C1363-C1370.

Rampe D, Roy ML, Dennis A, Brown AM (1997) A mechanism for the proarrhythmic effects of cisapride (Propulsid): high affinity blockade of the human cardiac potassium channel HERG. *FEBS Lett*, 417: 28-32.

Robertson BE, Schubert R, Hescheler J (1993) cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 265: C299-C303.

Romanenko VG, Rothblat GH, Levitan I (2002) Modulation of endothelial inward-rectifier K<sup>+</sup> current by optical isomers of cholesterol. *Biophys J*, 83: 3211-3222.

Romanenko VG, Fang Y, Byfield F, Travis AJ, Vandenberg CA, Rothblat GH, Levitan I (2004) Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophys J*, 87: 3850-3861.

Rubanyi GM, Polokoff MA (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 46: 325-415.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM (1986) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 9: H822-H827.

Schmidt H.H.H.W, Walter U (1994) NO at work. *Cell*, 78: 919-925.

Seino S, Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Prog Biophys Mol Biol*, 81: 133-176.

Slivka A, Murphy E, Horrocks L (1995) Cerebral edema after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 26: 1061-1066.

Smeda JS (1992) Cerebral vascular changes associated with hemorrhagic stroke in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*, 70: 552-564.

Smeda JS, King S (1999) Cerebrovascular alterations in protein kinase C-mediated constriction in stroke-prone rats. *Stroke*, 30: 656-661.

Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM (1997) Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate  $K^+$  channels. *Stroke*, 28: 2290-2295.

Sobey CG, Faraci FM (1999) Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 126: 1437-1443.

Stolc S, Bauer V, Benes L, Tichy (1983) Medicine with antiarrhythmic and antihypoxic activity and its method of preparation. patents : CS 229067, SWED.8204693-9, Belg. 894148, SWISS 651 754, BRD P-323 1088, SPAIN 553 017, JAP. 151 4040.

Stolc S, Vlkolinsky R, Pavlasek J (1997) Neuroprotection by the pyridoindole stobadine : a minireview. *Brain Res Bull* 42(5): 335-340. (1997).

Sydserff SG, Borelli AR, Green AR, Cross AJ (2002) Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. *Br J Pharmacol*, 135: 103-112.

Sykova E (1983) Extracellular  $K^+$  accumulation in the central nervous system. *Prog Biophys Mol Biol*, 42: 135-189.

Taguchi H, Heistad DD, Kitazono T, Faraci FM (1995) Dilatation of cerebral arterioles in response to activation of adenylate cyclase is dependent on activation of  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels. *Circ Res*, 76: 1057-1062.

Tasaki K, Ruetzler CA, Ohtsuki T, Martin D, Nawashiro H, Hallenbeck JM (1997) Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res*, 748: 267-270.

Trautwein W, Taniguchi J, Noma A (1982) The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells. *Pfluegers Arch*, 392: 307-314.

Vanhoutte PM (2000) Say NO to ET Journal of the Autonomic Nervous System, 81: 271-277.

Volberg WA, Koci BJ, Su W, Lin J, Zhou J (2002) Blockade of human cardiac potassium channel human ether-a-gogo-related gene (HERG) by macrolide antibiotics. J. Pharmacol Exp Ther, 302: 320-327.

Volpe M, Iaccarino G, Vecchione C, Rizzoni D, Russo D, Rubattu S, condorelli G, Ganten U, Ganten D, Trimarco B, Lindpaintner K (1996) Association and cosegregation of stroke with impaired endothelium-dependent vasorelaxation in stroke prone, spontaneously hypertensive rats. J Clin Invest, 98: 256-261.

Wahler GM, Sperelakis N (1985) Intracellular injection of cyclic GMP depresses cardiac slow action potentials. J Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res, 10: 83-95.

Waldman SA, Murad F (1987) Cyclic GMP synthesis and function. Pharmacol Rev, 39: 163-196.

Waldron GJ, Cole WC (1999) Activation of vascular smooth muscle K<sup>+</sup> channels by endothelium-derived relaxing factors. Clin Exp Pharmacol Physiol, 26: 180-184.

Wang RY, SM Y, Yang YR (2005) Treadmill training effects in different age groups following middle cerebral artery occlusion in rats. Gerontology, 51(3): 161-165.

Watanabe M, Rosenblum WI, Nelson GH (1998) In vivo effect of methylene blue on endothelium-dependent and endothelium-independent dilatations of brain microvessels in mice. Circ Res, 62: 86-90.

Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE (2002) Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. Circ Res, 90: 248-250.

Westenbroeck RE, Bausch SB, Lin RC, Franck JE, Noebels JL, Catterall WA (1998) Upregulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in reactive astrocytes after brain injury hypomyelination, and ischemia. J Neurosci 18(7): 2321-2334.

Wilde DW, Furspan PB, Szocik JF (1994) Calcium current in smooth muscle cells from normotensive and genetically hypertensive rats. Hypertension, 24: 739-746.

Yamori Y, Nnagaoka A, Okamoto K (1974) Importance of genetic factors in stroke: an evidence by selective breeding of stroke-prone and –resistant SHR. *Jpn Circul J*, 38: 1095.

Yang ST, Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD (1991) Endothelium-dependent responses of cerebral blood vessels during chronic hypertension. *Hypertension*, 17: 612-618.

Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL (2000) Targeted disruption of Kir2.1 genes reveals the essential role on the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in K<sup>+</sup>-mediated vasodilation. *Circ Res*, 87: 160-166.

Zea-Longa E, Weinstein PR, Carison S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20: 84-91.

Zhang L, Chen J, Li Y, Zhang ZG, Chopp M (2000) Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments after mild (30 min) and severe (2h) transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurol Sci*, 174: 141-146.

Zhang I, Schallert T, Zhang ZG, Jiang Q, Arniego P, Li Q, Lu M, Chopp M (2002) A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Meth*, 117: 207-214.