

50 376
1986
293
Exclu
DU
part

THESE

présentée à

l'Université des Sciences et Techniques de Lille

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

(3^e cycle)

par

OUAFAA ANIQ FILALI

ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET MECANIQUE
D'UN ANTAGONISTE DES SITES PERIPHERIQUES AUX
BENZODIAZEPINES, LE PK III95 SUR LE MYOCARDE
VENTRICULAIRE DE COBAYE

Soutenue le 27 octobre 1986 devant la Commission d'Examen

Président : P. Guilbault Professeur à l'Université de Lille I

Rapporteur : B. Dupuis Professeur à l'Université de Lille II

Membre : A. Robelet Professeur à l'Université de Lille II

*Travail réalisé au Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de
Médecine.*

Université de Lille II

A Monsieur le Professeur P. GUILBAULT

Je vous dois d'avoir accédé au troisième cycle de la Faculté des Sciences, où l'excellent enseignement que vous dispensez, la très grande compétence et l'enthousiasme que vous manifestez pour l'Electrophysiologie Cellulaire m'ont permis de m'intéresser et de m'initier à cet aspect de la Physiologie.

Votre constante disponibilité, les aides et les conseils que vous nous prodiguez depuis plusieurs années nous ont été d'un secours très appréciable.

Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail et vous prie de croire à ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur B. DUPUIS

Il m'est particulièrement agréable de vous exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée depuis que je partage la vie du Laboratoire de Pharmacologie à la Faculté de Médecine.

Votre connaissance en Pharmacologie Clinique et Expérimentale et les entretiens que vous avez bien voulu m'accorder pour l'élaboration de ce travail et pour l'interprétation des résultats m'ont ouvert à ce souci de précision et de rigueur dans la Recherche Scientifique, dont vous me donnez constamment l'exemple.

A Monsieur le Professeur A. ROBELET .

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Encouragée par votre gentillesse et votre chaleur humaine, vous m'avez permis de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Qu'il me soit permis de vous exprimer ma profonde gratitude ainsi que mon respectueux attachement.

Je tiens à remercier les Docteurs, M. ADAMANTIDIS, J. CARON, C. LIBERSA, R. ROUET et A. VINCENT, membres du Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Lille de m'avoir admise dans leur équipe et de n'avoir jamais épargné ni leur temps, ni leurs conseils pour me permettre de travailler le plus efficacement possible. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amitié.

Je tiens également à remercier Mademoiselle V. FAUTREZ pour son extrême gentillesse. Qu'elle trouve ici le témoignage de mon amitié sincère.

Je tiens également à remercier Madame M.C. GUILLAUME pour son aide précieuse pour l'élaboration de nos expériences et de sa gentillesse, ainsi que Madame N. PRUVOST.

PLAN

INTRODUCTION	3
ETAT DE LA QUESTION	6
I - <u>LES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES</u>	7
A - Complexe GABA-récepteur BDZ.	7
B - Complexe récepteur BDZ-GABA-canal chlore.	8
C - Distribution et localisation des récepteurs aux BDZ.	10
D - Propriétés des sites périphériques.	12
E - Interférence du Ro 5-4864 avec les canaux calciques de cellules cardiaques.	13
F - Propriétés de l'antagoniste périphérique des benzodiazépines, le PK11195.	14
G - Interaction des récepteurs aux benzodiazépines périphériques avec le PK11195.	16
II - <u>LES CANAUX CALCIQUES</u>	17
III - <u>ISCHEMIE ET SURCHARGE CALCIQUE</u>	22
A - Les modifications intracellulaires de l'ischémie.	23
B - Répercussions de l'ischémie sur les translocations du calcium.	25
C - Reperfusion des territoires ischémiés.	27
D - Le PK11195 et l'ischémie myocardique.	27
MATERIELS ET METHODES	29
A - Etudes des activités électriques et mécaniques.	30
- Stimulation électrique de la préparation.	30
- Recueil de l'activité mécanique.	32
- Enregistrement et mesure des paramètres.	32
- Mise en solution des substances.	33
- Protocoles expérimentaux.	34
- Paramètres mesurés.	35
B - Etudes de préparations soumises à une ischémie.	36
- Protocole expérimental.	36
- Recueil et dosage des CK.	37
- Recueil et mesure de l'activité électrique.	38
- Expression des résultats.	39
RESULTATS	40
I - <u>CELLULES NORMALES</u>	41
1 - Effets du PK11195.	41
2 - Influence du PK11195 sur les effets du vérapamil et de la nifédipine.	41
3 - Influence du PK11195 sur les effets du BAY K 8644.	45
Discussion Partielle	54
II - <u>CELLULES DEPolarISEES</u>	55
1 - Effets du PK11195.	55
2 - Influence du PK11195 sur les effets du vérapamil.	55
3 - Influence du PK11195 sur les effets de la nifédipine.	55
4 - Influence du PK11195 sur les effets du BAY K 8644.	57
Discussion Partielle	66
III - <u>CELLULES DEPolarISEES (17 mM) ET CONTRACTION BIPHASIQUE</u>	68
1 - Effets de concentrations cumulées de PK11195.	68
2 - Effets de 3.10-6M du PK11195 sur la contraction biphasique en milieu modifié.	68
IV - <u>CELLULES "ISCHEMIEES"</u>	72

A - Effets de l'ischémie.	72
B - Effets du PK11195.	76
C - Effets du vérapamil.	78
D - Effets de l'influence du PK11195 sur les effets du vérapamil.	88
Discussion Partielle	93
DISCUSSION GENERALE	94
RESUME ET CONCLUSION GENERALE	98
BIBLIOGRAPHIE	101

INTRODUCTION

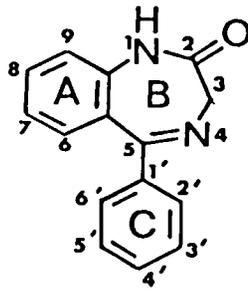
INTRODUCTION

Les benzodiazépines sont prescrites de façon très large en thérapeutique comme médicaments anxiolytiques, anticonvulsivants, sédatifs, hypnotiques et myorelaxants.

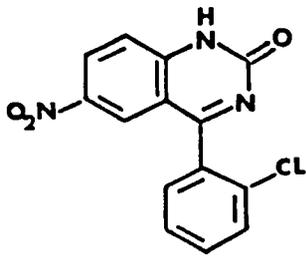
L'activité des benzodiazépines au niveau central est plus ou moins marquée selon la substitution en position 7 du cycle benzénique A et/ou des deux positions ortho sur les cycles benzéniques C (figure 1). Leur spécificité d'action dépend également de ces substitutions. Ainsi l'activité du clonazépam par exemple s'exerce de façon spécifique au niveau central alors que le Ro 5-4864 (substitué en méta ou para sur le cycle C) est un agoniste spécifique des sites périphériques (WILLIAMS, 1984).

Bien que présentant une structure chimique très différente de celle des benzodiazépines (figure 1), le PK11195 (synthétisé par les Laboratoires PHARMUKA) possède une forte affinité pour les sites périphériques aux benzodiazépines. Antagonisant les effets du Ro 5-4864, l'agoniste spécifique des sites périphériques aux benzodiazépines, sur le myocarde de cobaye, le PK11195 interagirait avec les canaux calciques dépendant du potentiel.

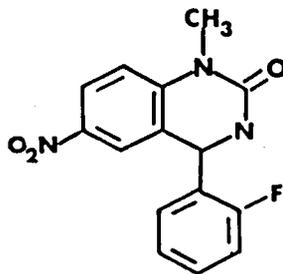
Le but du travail présenté est d'étudier les effets du PK11195 sur les mouvements de Ca dans les fibres ventriculaires de cobaye par l'intermédiaire du recueil des activités électriques et mécaniques ainsi qu'au niveau de cellules soumises à une "ischémie" entraînant une surcharge calcique dont l'importance peut être réduite par les inhibiteurs des canaux calciques tel que le vérapamil.



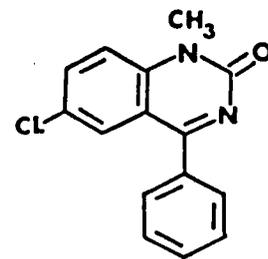
Noyau benzodiazépine



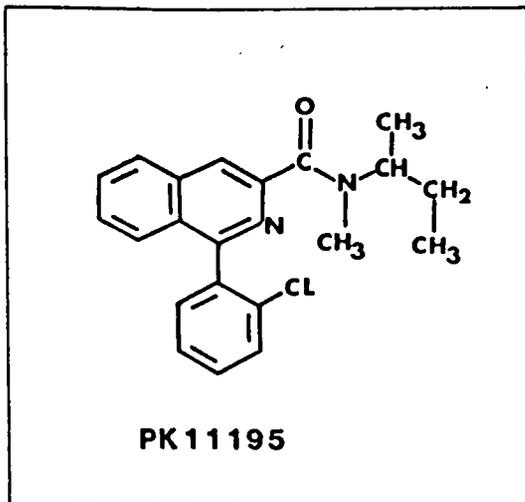
CLONAZEPAM



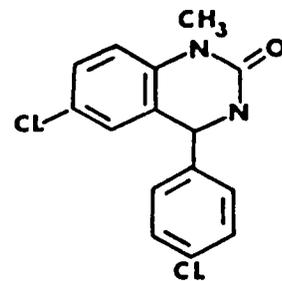
FLUNITRAZEPAM



DIAZEPAM



PK11195



Ro 5-4864

Figure 1 : Structure chimique du PK11195 comparée à celle de quelques benzodiazépines.

ETAT DE LA QUESTION

ETAT DE LA QUESTION

I - LES RECEPTEURS AUX BENZODIZEPINES.

Les récepteurs aux benzodiazépines (BDZ) ont été découverts bien après l'utilisation des BDZ en thérapeutique clinique. C'est en 1977 que les sites de liaison aux BDZ ont pu être identifiés et isolés, grâce à la technique d'autoradiographie (BRAESTRUP et SQUIRES, 1977 ; MOHLER et OKADA 1977). Ces sites de liaison sont localisés sur la face externe de la membrane des neurones ayant une haute spécificité, une forte affinité et une stéréospécificité pour les BDZ au niveau du système nerveux central (SNC) (BRAESTRUP et SQUIRES, 1977 ; MOHLER et OKADA, 1977 ; TALLMAN et al., 1980).

Les premières études ont montré que les récepteurs aux BDZ forment une population homogène (MACKERER et al., 1978 ; MOHLER et OKADA, 1977). Plus récemment d'autres études rapportent que les récepteurs aux BDZ forment une population plutôt hétérogène et peuvent se trouver sous plusieurs types de conformations (SQUIRES et al., 1979 ; BRAESTRUP et NIELSEN, 1981 ; EHLERT et al., 1981). Grâce aux expériences de liaison utilisant des composés agonistes et antagonistes, il a pu être déterminé que les récepteurs aux BDZ constituent une population homogène, pouvant exister sous deux conformations interconvertibles d'une même protéine (CHIU et al., 1982 ; CHIU et al., 1983 ; EHLERT et al., 1983).

A) Complexe acide gamma-aminobutyrique et récepteur des benzodiazépines .

Bien avant l'identification des récepteurs aux BDZ, SCHMIDT et al.

(1967) montrent que le diazépam (une des premières BDZ synthétisées) potentialise l'inhibition présynaptique des motoneurones dans la moëlle épinière de chat. Cet effet est confirmé ensuite par STATEN et BARNES (1971), POLC et al. (1974), et NICOLL et ALGER, (1979).

CURTIS et JOHNSON (1974) puis COSTA et GUIDOTTI (1975) mettent en évidence que l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) est le neurotransmetteur inhibiteur impliqué dans la dépolarisation afférente primaire et par conséquent que l'effet des BDZ potentialise la transmission inhibitrice GABAérgique, ce qui est en accord avec les études électrophysiologiques (COSTA et al., 1975). Les BDZ augmentent en outre l'inhibition postsynaptique au niveau de divers structures du SNC (HAEFELY, 1975 ; COSTA et GUIDOTTI, 1975 ; POLC et HAEFELY, 1982).

B) Complexe récepteur benzodiazépine-acide gamma-aminobutyrique et canal chlore .(Figure 2)

L'activation des récepteurs GABAérgiques entraîne l'ouverture du canal chlore à travers lequel s'écoule un flux ionique selon le gradient électrochimique du Cl⁻. Celle-ci, au niveau des terminaisons axoniques correspond à une diminution de l'amplitude de la libération du neuromédiateur. Les BDZ potentialisent l'augmentation de la conductance membranaire induite par le GABA mais ne modifient ni la conductance élémentaire, ni le temps d'ouverture moyen du canal Cl⁻ activé par le GABA (Mc DONALD et BARKER, 1979). Par contre la probabilité d'ouverture des canaux Cl⁻ est significativement augmentée en présence du GABA et des BDZ (COSTA et GUIDOTTI, 1975 ; HAEFELY et al., 1975).

Le GABA augmente l'affinité des BDZ pour leurs récepteurs (SKOLNICK et al., 1980), probablement par un mécanisme d'allostérie

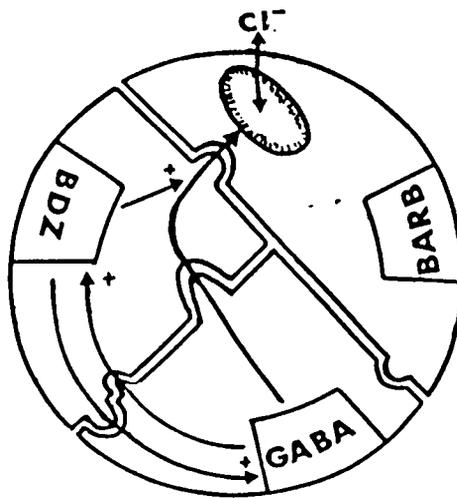


Figure 2 : Modèle hypothétique du fonctionnement du complexe récepteur GABA-Récepteur BDZ-canal chlore, d'après POLC et al., 1983.

GABA = acide gamma-aminobutyrique, BDZ = benzodiazépine, BARB = barbiturique, Cl = canal chlore.

(TALLMAN et al., 1978 ; MARTIN et CANDY, 1978 ; SKERRITT, 1982 ; EHLERT et al., 1981). De la même façon, les BDZ augmentent l'affinité du GABA pour son récepteur (GUIDOTTI, 1978). Récemment RICHARDS et al. (1986) confirment par des études de radiohistochimie et d'immunohistochimie que les BDZ sont fonctionnellement impliquées dans le mécanisme de couplage entre les récepteurs GABAérgiques et le canal chlore. L'action des BDZ est une modulation allostérique du système récepteur GABA-effecteur.

C) Distribution et localisation des récepteurs aux benzodiazépines :

Grâce aux techniques d'autoradiographie utilisant comme ligands le H3-flunitrazépam et le H3-diazépam, on a pu visualiser sur des coupes de SNC, des sites de liaison aux BDZ de densité variable selon la région du cerveau explorée.

Deux types de sites de liaison ont pu ainsi être mis en évidence. Le premier type est constitué de sites présents seulement dans le cerveau et considérés comme récepteurs centraux aux BDZ et par l'intermédiaire desquels les BDZ exercent leurs effets pharmacologiques, et thérapeutiques. Ces sites récepteurs sont spécifiquement reconnus par le clonazépam (une BDZ agoniste) et par le Ro 15-1788 (une BDZ antagoniste de tous les effets pharmacologiques des BZD). Le second type se compose de sites de liaison montrant une très faible affinité pour le clonazépam et une forte affinité pour le Ro 5-4864 (para 4'-chloro-diazépam, une BDZ spécifique des récepteurs périphériques) (SCHOEMAKER et al., 1982). Le Ro 5-4864 est dénué des effets pharmacologiques habituels des BDZ. Cependant, le H3-Ro 5-4864 reconnaît dans le cerveau certains sites qui diffèrent fortement des récepteurs de type central alors que sous certaines conditions appropriées, ces derniers peuvent être modulés par le

récepteur GABA, par la liaison avec des barbituriques, par la picrotoxine et le canal chlore, ce qui laisse supposer une structure supramoléculaire comme site d'action de ces substances (OLSEN, 1981 ; SPETH et al., 1980). La liaison du Ro 5-4864 n'est affectée par aucune de ces substances.

La distribution régionale des sites reconnus par le Ro 5-4864 dans le cerveau est nettement différente de celle établie pour les récepteurs centraux (BRAESTRUP et SQUIRES, 1977 ; BRAESTRUP et al., 1977 ; SPETH et al., 1980 ; SQUIRES et BRAESTRUP, 1977). Ainsi la plus forte densité de liaison est trouvée dans le bulbe olfactif et la plus faible dans le cortex cérébral, le striatum et l'hippocampe (SPETH, 1980 ; RICHARDS et al., 1982). Les sites reconnus par le Ro 5-4864 sont associés de façon prédominante avec la névroglie (GALLAGER et al., 1981). Ces sites sont modulés dans certaines conditions pathologiques (SCHOEMAKER et al., 1982 ; 1982) ; ainsi une augmentation de la liaison du Ro 5-4864 est observée dans la maladie de HUNTINGTON et peut refléter une prolifération des cellules gliales (SCHOEMAKER et al., 1982).

Grâce à l'analyse thermodynamique, le Ro 5-4864 a été identifié comme agoniste des récepteurs périphériques aux BDZ par analogie avec les modifications thermodynamiques enregistrées lors de l'interaction des récepteurs bêta-adrénergiques et des récepteurs centraux aux BDZ avec leurs agonistes et antagonistes respectifs (WEILAND et al., 1979 ; MOHLER et RICHARDS, 1981). Les sites de liaison reconnus par le Ro 5-4864 et ne retenant pas les ligands centraux comme le clonazépam ou le Ro 15-1788 sont largement répartis au niveau de tissus périphériques dans l'organisme. Ces sites dits périphériques ont été identifiés dans le coeur (DAVIES et HUSTON, 1981 ; MARANGOS et al., 1982 ; Le FUR et al., 1983 ; ANHOLT et al., 1984 ; De SOUZA et al., 1985), les poumons (MARANGOS et al., 1982 ; ANHOLT et al., 1984 ; De SOUZA et al., 1985), les surrénales

(MARANGOS et al., 1982 ; ANHOLT et al., 1984 ; De SOUZA et al., 1985), les testicules et le foie (ANHOLT et al., 1984 ; De SOUZA et al., 1985), l'épithélium nasal et la langue, les cellules pituitaires (SCHOEMAKER et al., 1982 ; De SOUZA, 1985), les glandes salivaires (De SOUZA et al., 1985), les mastoïdes (TANIGUCHI et al., 1980), les plaquettes (WANG et al., 1980), dans le cerveau également, au niveau des cellules gliales, des plexus choroïdes et de l'épiderme ventriculaire (SCHOEMAKER et al., 1981, 1982, 1983 ; MARANGOS et al., 1982 ; RICHARDS et al., 1982 ; GEHLERT et al., 1983 ; BENAVIDES et al., 1983b ; ANHOLT et al., 1984 ; De SOUZA et al., 1985) et aussi dans la moëlle épinière.

D) Propriétés des sites périphériques aux benzodiazépines .

Ces sites diffèrent fondamentalement des sites centraux identifiés par leurs propriétés biochimiques et pharmacologiques. Ils ne sont pas dépendants du GABA (TANIGUCHI et al., 1982). Jusqu'à présent, ces sites de liaison n'étaient pas considérés comme des récepteurs mais seulement comme des accepteurs (RICHARDS et al., 1982) car aucun rôle physiologique ne leur était connu. Cependant des travaux rapportent une variation du nombre de ces sites dans des conditions pathologiques chez l'animal dans le cas de l'hypertension (REGAN et al., 1980 ; TANIGUCHI et al., 1981), de diabète insipide (Del ZOMPO et al., 1984). Cependant la signification de cette variation, cause ou conséquence, n'est pas déterminée de façon précise.

Récemment, des études de localisation dans les tissus ont permis d'approcher le rôle physiologique de ces sites qui sont maintenant considérés comme des récepteurs (RICHARDS et al., 1986). Dans le rein, ils sont concentrés dans le tube contourné distal du cortex rénal et dans la

portion épaisse ascendante de l'anse de Henlé de la médulla (GEHLERT et al., 1983 ; BUTLEN, 1984). Dans la glande surrénale, les récepteurs sont présents dans le cortex mais absents dans la médulla (BENAVIDES et al., 1983 ; De SOUZA et al., 1985). Dans les testicules, ils sont localisés dans les cellules du tissu interstitiel et dans les tubes séminifères mais en très faible densité (De SOUZA et al., 1985). Dans ces glandes endocrines, les récepteurs semblent être associés avec les cellules stéroïdogènes (ANHOLT et al., 1985).

En étudiant systématiquement la source primaire en énergie métabolique, ANHOLT et al. (1985) essaient de distinguer et de discriminer les tissus à haute et à faible densité en récepteurs périphériques. Les tissus à faible densité en récepteurs périphériques tels que le cerveau, les muscles striés (squelettiques) et lisses (intestinaux) dépendent pour leur énergie de la consommation de glucose. Au contraire, le cortex surrénal, la peau et le muscle cardiaque tirent leur énergie métabolique de la phosphorylation oxydative active. Une relation entre les récepteurs périphériques aux BDZ et le métabolisme en aérobie obligatoire pourrait expliquer la grande richesse en sites du muscle cardiaque et la pauvreté des muscles squelettique et lisse. La localisation différentielle des récepteurs périphériques dans le rein est en accord avec cette suggestion. En effet, les portions de rein qui sont responsables du transport des ions Na^+ et de l'eau sont les plus riches en récepteurs et contiennent la plus haute densité en mitochondries.

E) Interférence du Ro 5-4864 avec les canaux calciques de cellules cardiaques .

Sur le muscle papillaire de cobaye, MESTRE et al. (1984) ont montré que le Ro 5-4864 diminue de façon "dose-dépendante" la durée du

potentiel d'action et l'amplitude de la force contractile, ces effets étant de moindre degré avec le diazépam et nuls avec le clonazépam. L'augmentation de la concentration extracellulaire en Ca^{2+} inverse l'effet inotrope négatif du Ro 5-4864.

D'autre part les effets du Ro 5-4864 au niveau cardiaque sont antagonisés par un composé sans relation structurale avec les BDZ, mais présentant une haute affinité pour les sites périphériques aux BDZ, le PK11195 (Le FUR et al., 1983).

F) Propriétés de l'antagoniste périphérique des benzodiazépines, le PK11195 .

Bien que de structure chimique très différente de celle des BDZ (figure 1), le PK11195 possède une haute affinité pour les sites périphériques aux BDZ. Il est capable d'antagoniser les effets dépresseurs des inhibiteurs du canal calcique (MESTRE et al., 1985) ainsi que les effets stimulants d'une dihydropyridine agoniste, le BAY K 8644. L'interaction des récepteurs périphériques aux BDZ avec les canaux calciques a été dès lors avancée comme possible et responsable des effets pharmacologiques de ces substances.

Par la méthode d'autoradiographie, Le FUR et al. (1983) ont pu visualiser au niveau des coupes de coeur de rat et par codage en couleur, la densité de liaison au H^3 -PK11195. Celle-ci est plus importante au niveau des ventricules que dans les oreillettes. La répartition des sites diffère selon l'espèce animale, elle est inhomogène chez le rat et homogène chez le chien. Au niveau subcellulaire, la localisation des sites est importante au niveau du sarcolemme, plus modeste dans le réticulum

sarcoplasmique, et accessoire dans les mitochondries.

Le PK11195 se lie aux membranes cardiaques avec une très grande affinité ($KD = 10^{-9}$ M) (Le FUR et al., 1983a), cette liaison étant réversible. La densité des sites de fixation déduite de l'analyse des cinétiques de saturation selon la méthode de SCATCHARD est semblable d'une espèce animale à l'autre. Les sites de liaison de H3-PK11195 présentent les caractéristiques pharmacologiques spécifiques des sites périphériques aux BDZ. La liaison du H3-PK11195 et du H3-Ro 5-4864 au niveau des membranes myocardiques est déplacée par les mêmes substances et avec la même efficacité (Le FUR et al., 1983b). Le PK11195 apparaît ainsi aussi actif que le Ro 5-4864.

Les sites périphériques aux BDZ sont marqués dans le rein, le cœur et le cerveau de chat et de souris par injection intraveineuse de H3-PK11195 et de H3-Ro 5-4864. La spécificité de ce marquage est démontrée par l'ordre dans lequel sont déplacées les substances étudiées. Le FUR et al. (1983a) montrent que le déplacement est le même pour les deux ligands.

Le PK11195 est inactif vis-à-vis des récepteurs centraux aux BDZ même à une concentration aussi élevée que 1.10^{-5} M, elle est 10 000 fois supérieure à celle active sur les sites périphériques cardiaques. Cette absence d'effet a été démontrée sur des membranes du cortex cérébral de rat qui n'est pas modifiée par le PK11195. Le PK11195 ne modifie pas la liaison du H3-flunitrazépam aux sites centraux des BDZ.

L'interaction du PK11195 avec le récepteur périphérique aux BDZ a été comparée avec celle du Ro 5-4864. L'affinité du PK11195 demeure constante entre $+4^{\circ}\text{C}$ et $+37^{\circ}\text{C}$, alors que celle du Ro 5-4864 varie en raison inverse de la température (Le FUR et al., 1983c). Traduits en terme de thermodynamique, ces résultats suggèrent que la liaison du PK11195 avec

le récepteur périphérique aux BDZ s'effectue avec une variation d'entropie du système c'est-à-dire qu'il n'y a pas de modification dans la conformation des sites, contrairement à la liaison du Ro 5-4864 qui, s'effectuant avec une variation d'enthalpie, induit des changements de ces sites. Ces résultats sont en accord avec le modèle à 2 étapes proposé pour les bêta-récepteurs (WEILAND et coll., 1979, 1980).



où L est le ligand, R le récepteur et R', l'état de la protéine récepteur induit par l'agoniste. Dans ce modèle, les antagonistes participeraient seulement à la réaction 1 avec peu ou pas de variation d'enthalpie et une grande augmentation d'entropie. Les agonistes participeraient aux 2 réactions 1 et 2 induisant un changement de conformation du récepteur à R', cette réaction 2 aurait une enthalpie négative.

G) Interaction des récepteurs aux benzodiazépines périphériques avec le PK11195 .

Le Ro 5-4864 agit au niveau du myocarde de cobaye en provoquant un raccourcissement des durées du potentiel d'action et une diminution de l'amplitude de la force de contraction du muscle papillaire de cobaye. Ces effets sont antagonisés par un composé sans relation structurale avec les BDZ. Comme le PK11195 n'a aucun effet sur la restauration de l'activité électrique en milieu riche en potassium par un bêta-adrénergique et qu'à l'inverse il s'oppose aux effets du BAY K 8644, il est ainsi proposé que les canaux qui dépendent du potentiel sont concernés alors qu'un effet sur les canaux "récepteurs dépendants" est écarté.

II - LES CANAUX CALCIQUES.

Les travaux réalisés en voltage imposé sur des fibres de Purkinje (REUTER et al., 1967) et sur d'autres préparations (ROUGIER et al., 1969 ; BEELER et REUTER, 1970 ; NEW et TRAUTWEIN, 1972) ont montré l'existence d'un courant entrant lent de calcium appelé I_{si} ("slow inward current"). Ce courant est augmenté par l'élévation de la concentration extracellulaire en calcium et par les catécholamines, il est aboli en milieu sans Ca ou en présence de cations divalents tels que le Mn^{2+} , le Co^{2+} , le Ni^{2+} . Il est porté principalement par les ions Ca^{2+} et selon les préparations également par les ions Na^{+} . Le degré de cette participation sodique serait différent selon les régions myocardiques et les espèces animales. Le courant entrant lent de Ca ($I_{Ca^{2+}}$) est en grande partie responsable de la phase du plateau du potentiel d'action (Mc ALLISTER et al., 1975 ; BEELER et REUTER, 1977). Son rôle est fondamental dans la conduction de l'impulsion dans les tissus cardiaques nodaux (NOMA et al., 1977 ; BROWN et Di FRANCESCO, 1980). Cependant les mesures des seuils des constantes de vitesse d'activation et d'inactivation ont montré d'importantes variations selon les préparations et les conditions expérimentales.

Récemment l'affinement des méthodes de mesures et l'utilisation de préparations unicellulaires ont permis de mettre en évidence l'existence d'au moins deux types de canaux calciques permettant de mieux comprendre l'hétérogénéité des résultats concernant les mesures de $I_{Ca^{2+}}$. LEE et SPINDLER (1983) montrent sur des cellules isolées de ventricule de cobaye l'existence de 2 pics de courants entrants quand le courant de Na^{+} est bloqué par la tétrodotoxine (TTX). Plus récemment, BEAN (1985) rapporte l'existence de 2 courants entrants de Ca au niveau des cellules isolées

d'oreillette de chien : le premier s'active pour une valeur de potentiel de l'ordre de -40 mV et s'inactivant rapidement alors que le second plus lent s'active vers une valeur moindre de l'ordre de -20 mV, s'inactivant beaucoup plus lentement. Sur des myocytes ventriculaires de cobaye, NILIUS (1985) enregistre également 2 courants distincts ayant les mêmes caractéristiques que celles décrites par BEAN (1985), la composante lente étant préférentiellement bloquée par le Cd^{2+} (NILIUS, 1985).

Quant au courant calcique rapide, il est insensible à la TTX, aux dihydropyridines, et à l'isoprotérénol (BEAN, 1985). Il est par contre bloqué par les ions Co^{2+} (BEAN, 1985).

Quant au courant calcique lent, NILIUS et al. (1985) observent qu'il est plus ample lorsque les ions Ba^{2+} remplacent les ions Ca^{2+} comme transporteur de charges. De même il s'inactive pour des potentiels peu négatifs. Il est de plus bloqué par les dihydropyridines antagonistes et le Cd et augmenté par une dihydropyridine agoniste, le BAY K 8644. (Fig.4 et 5)

Rôle de chacune des composantes du courant entrant global de calcium dans le couplage excitation-contraction . (figure 3)

En étudiant l'effet de microinjections de calcium sur des fibres pelées de Purkinje, FABIATO (1985) montre que le Ca entrant dans la cellule par les canaux calciques rapides déclenche la contraction selon le mécanisme de " Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release" c'est-à-dire une libération de Ca par le réticulum sarcoplasmique (RS). Il montre en outre que le mécanisme de " calcium -induced calcium release" n'est pas dû à une variation en valeur absolue de la concentration de Ca extraréticulaire mais plutôt à

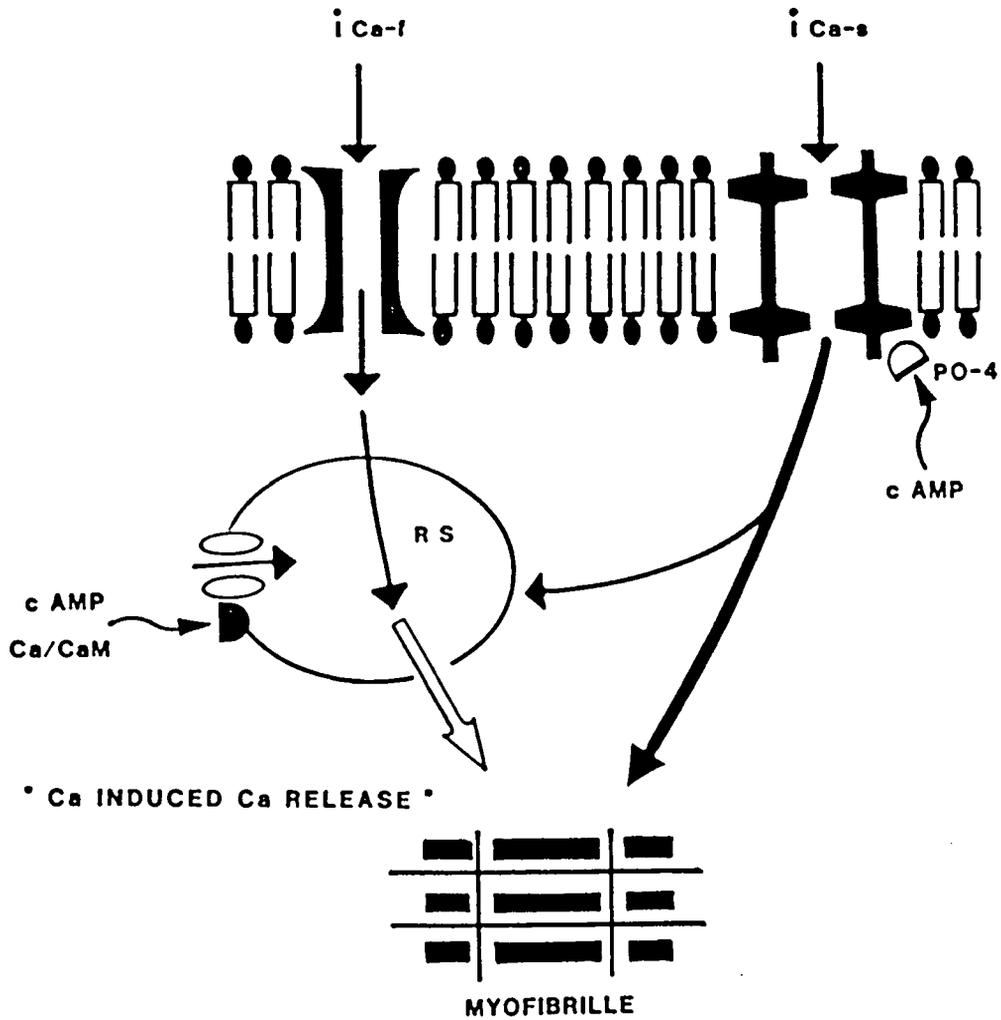


Figure 3 : Représentation schématique des deux types de courants de Ca^{2+} .
 I_{Ca-f} = courant rapide de Ca^{2+} , I_{Ca-s} = courant lent de Ca^{2+} , Ca-CaM =
Ca-calmoduline.

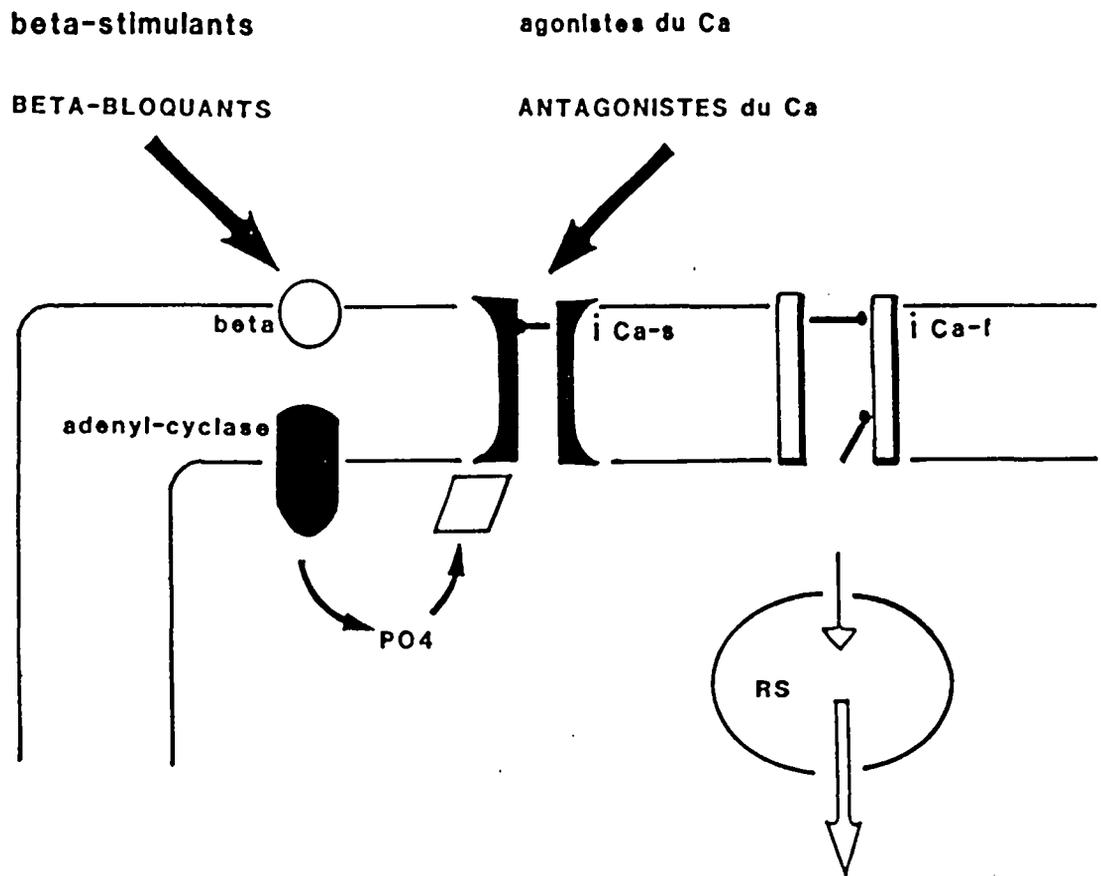


Figure 4 : Site d'action des substances pharmacologiques au niveau de récepteurs membranaires dont dépend le fonctionnement du canal calcique lent.

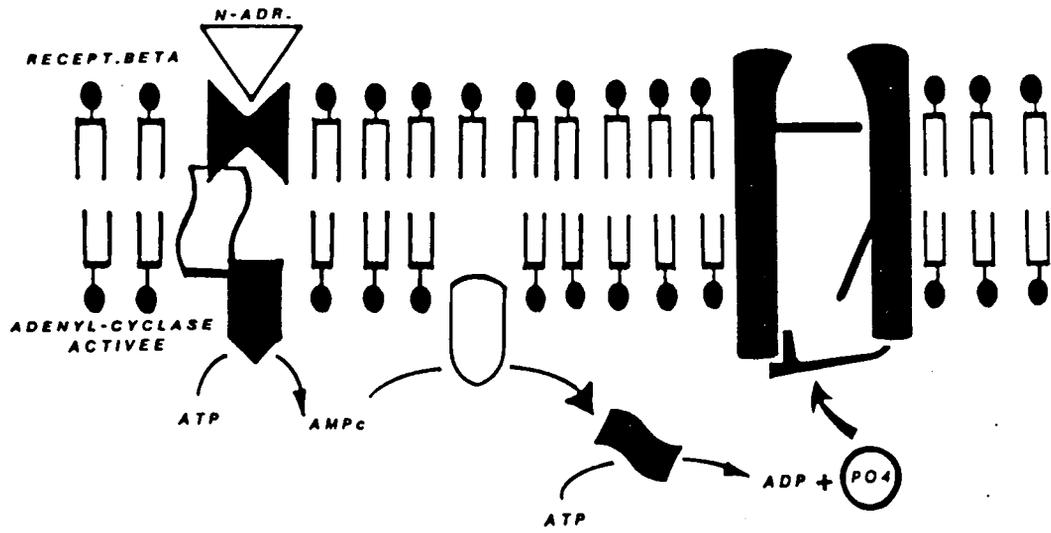
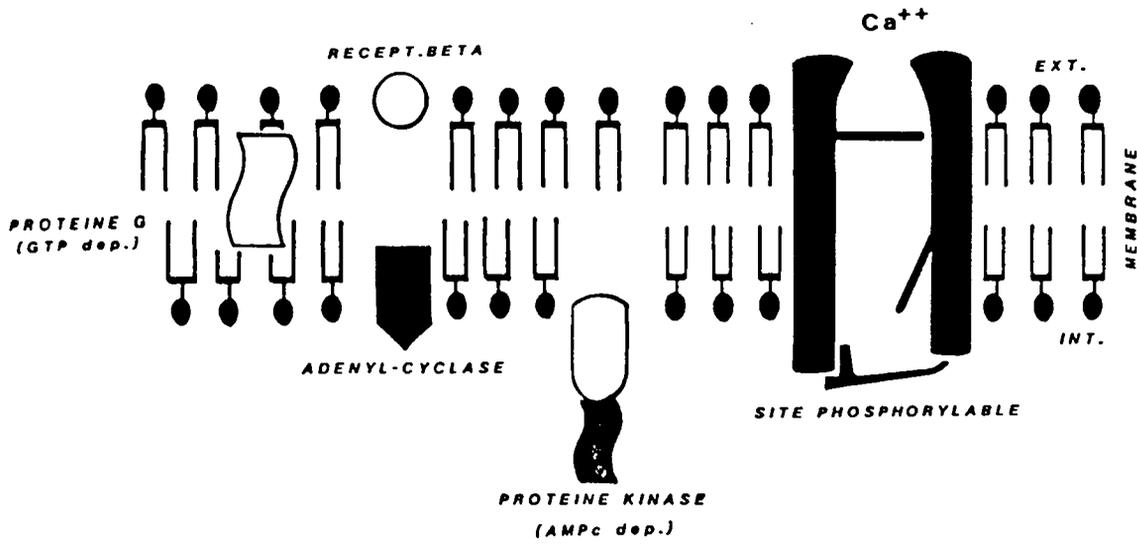


Figure 5 : Représentation schématique du mode de fonctionnement des canaux calciques.

la vitesse de cette variation. Ce dernier auteur montre que si le RS de ces fibres pelées est détruit, le courant entrant rapide ne produit plus aucune contraction, par contre le courant entrant lent produit encore une tension mécanique qui peut en plus être maintenue. Le Ca véhiculant le courant entrant lent peut donc provoquer une contraction par activation directe des protéines contractiles.

Récemment HONORE et CHALLICE (1985a, b) et HONORE et al. (1986a, b,) décrivent des contractions biphasiques sur le muscle papillaire de cobaye. Ils montrent que la première et la seconde composante de contraction présentent respectivement les mêmes sensibilités aux manoeuvres pharmacologiques que les courants entrants rapides et lents de Ca. De ce fait, ils imputent la première composante à l'entrée de Ca par le canal calcique rapide déclenchant une sortie de Ca réticulaire et la seconde composante à une entrée de Ca par le canal lent activant directement les protéines contractiles.

III - ISCHEMIE ET SURCHARGE CALCIQUE.

L'ischémie myocardique survient à la suite d'un déséquilibre entre la demande et les apports d'énergie. La protection du myocarde "ischémié" a donné lieu à un nombre important de travaux expérimentaux ou cliniques concernant des substances qui permettent soit de diminuer les besoins en particulier oxygénés du myocarde, soit de s'opposer à la diminution des apports. On sait que la surcharge calcique lors de l'ischémie est l'un des facteurs qui conduit à la nécrose cellulaire (FLECKENSTEIN, 1971). Les antagonistes du Ca (parmi les substances largement utilisées en thérapeutique) en s'opposant à la surcharge calcique, diminuent la fuite

enzymatique qui est un indice de nécrose tissulaire (LA DUE et al., 1955).

A - Les modifications intracellulaires de l'ischémie .

En aérobiose, le coeur utilise les acides gras libres (AGL) (OPIE, 1968, 1969). Cet emploi préférentiel des AGL est lié à l'activité de différents systèmes enzymatiques. Les AGL qui entrent dans la cellule sont incorporés aux triglycérides (TG) ou transformés en Acyl-CoA ; ces Acyl-CoA sont transférés du cytoplasme aux mitochondries par le système transporteur Acyl-CoA carnitine transférase où ils sont incorporés au cycle de Krebs. L'oxydation des AGL s'oppose à la glycolyse par inhibition de plusieurs enzymes dont la pyruvate déshydrogénase (CRASS et al., 1969). Ces régulations métaboliques privilégient l'utilisation des AGL aux dépens des substrats hydrocarbonés.

Lors de l'ischémie, l'oxydation des AGL et le système acyl-carnitine-transférase sont inhibés entraînant une accumulation de molécules d'Acyl-CoA (SOBEL et al., 1978 ; OPIE, 1979) qui diminue le métabolisme des AGL entrant dans la cellule et favorise la fuite des AGL dans le compartiment extracellulaire. Cette accumulation des AGL dans le liquide extracellulaire (COWAN et VAUGHAN-WILLIAMS, 1977 ; KARAGUEUZIAN et al., 1982) favorise la survenue d'arythmies et induit des altérations électrophysiologiques in vitro semblables à celles enregistrées in vivo (CORR et al., 1984 ; CLARKSON et TEN EICK, 1983).

En anoxie et partiellement en ischémie, le glucose ne subit plus son métabolisme oxydatif (SCHEUER, 1977) ; les mécanismes suivants signalent cette déviation métabolique :

- la quantité d'ATP synthétisée diminue en anoxie ainsi que la quantité

des dérivés phosphatés intermédiaires (le glucose-6-phosphate en particulier) (NEELY et al., 1970) entraînant de ce fait l'inhibition de l'hexokinase et favorisant le captage du glucose par la cellule, - les produits de la dégradation de l'ATP (ADP, AMP...) activent la phosphofructo-kinase qui est en outre non inhibée du fait de la diminution de la concentration d'ATP.

En ischémie, l'apport d'oxygène est non seulement réduit mais les catabolites sont en plus mal éliminés du fait d'un mauvais drainage du myocarde, ainsi l'acide lactique s'accumule et le pH diminue (COBBE et POOLE-WILSON, 1979, 1980), dans ces conditions l'inhibition de la phosphorylase-kinase diminue la glycogénolyse s'opposant à la transformation de la phosphorylase b en a. Le peu d'oxygène disponible est davantage utilisé pour l'oxydation du glucose que pour celle des AGL. Ce fonctionnement est l'inverse de celui observé dans des conditions physiologiques.

L'ischémie a donc pour effet immédiat de ralentir le métabolisme oxydatif et de diminuer la concentration en ATP intracellulaire. L'intensité de cette déplétion en ATP permet de discriminer les cellules qui sont encore dans la phase réversible de l'ischémie des cellules qui ont franchi ce cap pour passer dans la phase irréversible. Dans cette deuxième éventualité, elles sont vouées à la mort et aucune manoeuvre pharmacologique ou autre (reperfusion...) ne sera efficace. Ainsi REIMER et al. (1983) ont montré chez le chien soumis à un infarctus expérimental par la ligature d'une artère coronaire que cet état est atteint en 40 minutes environ la concentration en ATP intracellulaire diminue et est de l'ordre de 10% de la valeur physiologique.

B - Répercussions de l'ischémie sur les translocations du calcium.

Les modifications de translocation calcique intracellulaire seraient à l'origine de la perte de l'activité contractile. Les potentiels d'action des cellules ischémisées sont en effet plus courts à tous les niveaux de la repolarisation et notamment lors de la phase du plateau où le courant entrant lent de calcium est activé (CHESNAIS et al., 1975). La quantité de calcium qui entre dans la cellule par ces canaux "voltage-dépendants" est plus faible en ischémie et de ce fait insuffisante pour déclencher les processus biochimiques de la contraction. L'acidose entraînée par l'ischémie exerce un effet inotrope négatif (BROWN et al., 1952) en diminuant ICa^{2+} comme l'ont montré KOHLHARDT et al. (1976). D'autre part les ions H^+ qui s'accroissent dans les cellules ischémisées entrent en compétition avec cet élément au niveau de la troponine (KATZ, 1973 ; BRAUNWALD, 1976).

L'ischémie cardiaque entraîne une souffrance cellulaire qui augmente la perméabilité membranaire vis-à-vis des enzymes cytoplasmiques. La nécrose cellulaire libère instantanément ces enzymes dans l'espace extracellulaire ; elles diffusent alors dans le plasma. Lorsque l'on suspecte cliniquement un infarctus du myocarde, les enzymes cardiaques suivantes peuvent être dosées dans le plasma pour confirmer le diagnostic :

- CK = CPK : créatine kinase = créatine phosphokinase
- CK-MB : correspond à l'isoenzyme cardiaque de la CK
- GOT : Glutamate Oxalate Transaminase
- LDH : Lactate déshydrogénase
- HBDH : correspond surtout à l'isoenzyme 1 de la LDH, présente en

grande quantité dans le myocarde.

La diminution de l'activité créatine phosphokinasiqye myocardique est en rapport avec la taille de l'infarctus (KJEKSHUS et SOBEL, 1970 ; SHELL et al., 1971, 1972). L'intensité de la déplétion est de même en relation avec l'étendue de l'atteinte histologique (MAROKO et al., 1971 ; GINKS et al., 1972).

Pour HEARSE et HUMPHREY (1975), le début de la perte de CK coïncide avec l'instant où les dommages cellulaires deviennent irréversibles ; SHELL et SOBEL (1976) quant à eux, considèrent la fuite des CK hors des cellules comme un indice de mort cellulaire plutôt que de simple lésion membranaire. Par contre, WALDENSTROM et al. (1977) admettent que des cellules réversiblement lésées peuvent déjà laisser échapper des enzymes. WILKINSON et ROBINSON (1974) suggèrent que la baisse du taux d'ATP intracellulaire en hypoxie serait un élément du relargage enzymatique.

Les CK et les GOT sont les premières enzymes à apparaître dans le plasma. Au moment du pic, ces deux enzymes présentent une augmentation relative identique du taux de base, mais l'activité des CK y est de 350 mU/ml et celle des GOT de 100 mU/ml. Comme nos expériences sont limitées dans le temps et s'adressent à un fragment de myocarde de petite dimension, il nous à semblé plus judicieux de doser les CK comme marqueurs de l'atteinte ischémique.

C - La reperfusion des territoires ischémiés .

Le rétablissement de la perfusion coronaire a pour objectif de diminuer l'étendue de la nécrose tissulaire. Cependant les résultats sont contradictoires. Dans certains cas la reperfusion peut maintenir en vie des tissus modérément atteints et diminue la taille de l'infarctus, dans d'autres cas, on observe plutôt une augmentation de la zone nécrosée et l'aggravation des troubles du rythme dus à l'ischémie. Ce phénomène est voisin de "l'oxygen paradox" qui est lui même proche du "calcium paradox" (HEARSE et al., 1978).

D - Le PK11195 et l'ischémie myocardique.

MESTRE et al. (1985) montrent que le PK11195 exerce un effet protecteur vis-à-vis des arythmies ventriculaires des phases précoce et tardive suivant un infarctus expérimental vis-à-vis de la fibrillation ventriculaire consécutive à la reprise de l'irrigation coronaire. Par contre le PK11195 ne possède aucun effet antiarythmique ou vasodilatateur.

A partir de ces résultats, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet du PK11195 dans des situations où le fonctionnement des canaux calciques est impliqué et en particulier :

- en milieu standard,
- en milieu hyperpotassique : la dépolarisation du myocarde par une élévation de la concentration extracellulaire en K⁺ permet d'inactiver la conductance sodique et d'obtenir des activités électriques et mécaniques qui ne dépendent que de l'influx calcique transmembranaire. La mesure de certains paramètres

électriques du potentiel d'action et de la réponse mécanique permet d'estimer les modifications de l'influx de Ca^{2+} . Ainsi la vitesse maximale de dépolarisation et l'amplitude du potentiel d'action peuvent être prises comme indices représentatifs de l'intensité de l'influx de Ca^{2+} ,
- en milieu ischémique.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Les expériences sont réalisées sur des fragments de coeur de cobaye. Les animaux sont assommés puis saignés. Le coeur est rapidement prélevé et plongé dans une solution de Tyrode oxygénée par un mélange à 95% d'oxygène et 5% de dioxyde de carbone.

A - Etudes des activités électriques et mécaniques :

Un muscle papillaire de ventricule droit est prélevé avec soin puis transporté dans une cuve expérimentale où il est épinglé. La cuve comporte trois compartiments : un compartiment d'arrivée du liquide de perfusion, un compartiment central (3ml) où se trouve la préparation et un compartiment d'évacuation du liquide physiologique, relié à une trompe à vide. La cuve expérimentale est perfusée à débit constant ($4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) par une solution oxygénée de Tyrode dont la composition est donnée dans le tableau I. Le pH de cette solution est de $7,35 \pm 0,05$. En normoxie, la pO_2 a pour valeur 570 ± 10 mmHg et la pCO_2 34 ± 2 mmHg. La température est maintenue constante grâce à un système thermostatique à $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

- Stimulation électrique de la préparation

Les électrodes de stimulation sont constituées de 2 fils d'acier téflonnés de 0,1 mm de diamètre, isolés sauf à leur extrémité, appliqués au moyen d'un micromanipulateur à la surface de la préparation. Elles sont reliées à un stimulateur GPI-GE 219-CRE. La durée du choc est de 2 ms et l'intensité choisie est double de l'intensité seuil. La fréquence de stimulation dans les conditions standard de stabilisation est de 1 Hz.

	Na+	K+	Ca ²⁺	Cl ⁻	Mg ²⁺	H ₂ PO ₄ ⁻	HCO ₃ ⁻	Ba ²⁺	TEA	ISOPR	Glc
Solution de Tyrode Standard	135	4	1,8	117,8	1	1,8	25	0	0	0	11
Solution Hyperpotassique de PA dépolarisés (1)	135	22	1,8	117,8	1	1,8	25	0,2	0	0	11
Solution Hyperpotassique de contraction biphasique (2)	135	22	1,8	117,8	1	1,8	25	0	0	1.10 ⁻⁶ M	11
Solution Hyperpotassique de contraction biphasique (3)	135	22	1,8	117,8	1	1,8	25	0	5	3.10 ⁻⁸	11

Tableau I : Composition des solutions utilisées
(Donnée en mM)

- Recueil de l'activité mécanique

Le muscle papillaire est accroché par sa partie tendineuse à un transducteur (Bio Science, UF1) fixé à un micromanipulateur, relié à son amplificateur. La base du muscle est épinglée sur le fond de la cuve expérimentale.

Le muscle papillaire est étiré avec précaution grâce au micromanipulateur jusqu'à ce que soit atteinte la contraction d'amplitude maximale (maximum de la tension - longueur). Puis le muscle est stabilisé en solution de Tyrode pendant 60 minutes. Durant cette période, le muscle est stimulé électriquement à la fréquence de 1 Hz.

- Recueil de l'activité électrique

L'activité électrique est enregistrée à l'aide d'une microélectrode de verre étiré, remplie de KCl 3M, de résistance de pointe comprise entre 10 et 20 mégohms. La microélectrode est reliée à un adaptateur d'impédance (WPI, modèle 750). L'électrode indifférente impolarisable est constituée d'un fil d'argent chloruré, reliée à la cuve expérimentale par l'intermédiaire d'un pont de KCl 3M gélosé. Un amplificateur opérationnel est utilisé pour maintenir le potentiel extracellulaire au potentiel de terre. Le courant de stimulation mesuré par l'intermédiaire de la chute de tension qu'il provoque aux bornes d'une résistance est comparé à celui délivré par un générateur de tension rectangulaire par l'intermédiaire d'un 2ème amplificateur opérationnel.

- Enregistrement et mesure des paramètres

La contraction et l'activité électrique sont enregistrées simultanément sur un oscilloscope à mémoire Tektronix 5111 et sur un enregistreur à plume (GOULD, KEN28/216), à 2 voies. L'activité électrique est

en outre recueillie et traitée par un système d'acquisition et de traitement à haute résolution (AQUITEC SK64 Micromed). Un microprocesseur analyse les potentiels d'action (PA) de 10 en 10% de la phase de dépolarisation et calcule à chacun de ces niveaux de potentiel de membrane les vitesses de dépolarisation et de repolarisation et les durées de dépolarisation et de repolarisation.

- Mise en solution des substances étudiées

Le PK11195 se présente sous forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau, il est dissous dans une solution de diméthyl-sulfoxyde (DMSO), le pourcentage de DMSO dans le liquide de Tyrode est alors de 0,13 p 100.

Le vérapamil (Isoptine R, soluté injectable) est dilué dans le liquide de Tyrode.

La nifédipine (Adalat, soluté injectable) est diluée dans le liquide de Tyrode. Sensible à la lumière elle est protégée par un film de papier aluminium et conservée à l'abri de la lumière.

Le BAY K 8644 se présente sous forme d'une poudre jaune que l'on dissout dans du DMSO dilué initialement dans de l'eau distillée (0,1 p 100), le pourcentage final de DMSO dans le liquide de Tyrode est de 0,3 p 1000. La solution étant sensible à la lumière, elle est protégée de la même façon que la nifédipine.

Lors d'essais préliminaires, l'influence des effets du PK11195 sur l'action du vérapamil sur les cellules myocardiques de papillaire de cobaye a été recherchée soit en ajoutant au liquide de Tyrode le PK11195 avant le vérapamil (traitement préventif) soit en ajoutant le PK11195 après l'installation des effets du vérapamil (traitement curatif). Le PK11195 s'est avéré dépourvu d'effet vis-à-vis du vérapamil lors du traitement curatif alors

qu'en traitement préventif il s'oppose de façon notable aux effets du vérapamil.

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

L'étude des effets du PK11195, du vérapamil, de la nifédipine et du BAY K 8644 est réalisée sur des cellules normales et sur des cellules dépolarisées.

1) en milieu normal : après une durée de stabilisation de 60 minutes, la substance à étudier est perfusée pendant 60 minutes. Les activités électriques et mécaniques sont enregistrées toutes les 15 minutes. L'influence du PK11195 sur les effets du vérapamil, de la nifédipine et du BAY K 8644 est recherchée dans une autre série d'expériences. Le PK11195 est perfusé durant 60 minutes, puis une solution contenant à la fois le PK11195 et la substance à étudier est perfusée.

2) en milieu hyperpotassique : l'élévation de la concentration extracellulaire en potassium rend la préparation inexcitable du fait de l'inactivation de la conductance membranaire au sodium. L'excitabilité membranaire peut être restaurée de plusieurs manières. Nous avons choisi l'addition de baryum : INAZAWA et EHARA (1980) ont montré que l'addition de faibles concentrations de Ba^{2+} (0,2 mM) à des milieux riches en K^+ diminue le seuil d'excitation en réduisant la conductance membranaire au K^+ , et transforme la réponse graduée et décroissante en une réponse tout ou rien. A cette faible concentration, le Ba^{2+} ne participe pas au courant entrant de Ca^{2+} .

Dans une première série d'expériences, après une période de stabilisation de 60 minutes dans les conditions standard, les préparations sont perfusées par une solution hyperpotassique de type 2 (voir tableau I)

pendant 60 minutes. Elles sont stimulées à la fréquence de 0,5 Hz par des chocs dont la durée varie selon les préparations (entre 4 et 10 ms), l'intensité étant double de la valeur seuil. Le même protocole expérimental qu'en milieu normal est suivi pour l'étude des effets des substances testées (PK11195, vérapamil, nifédipine et BAY K 8644). Puis l'influence du PK11195 sur les effets du vérapamil, de la nifédipine et du BAY K 8644 est recherchée. Dans ce dernier cas le PK11195 est perfusé pendant 60 minutes, puis lui est associé le vérapamil, la nifédipine et le BAY K 8644 durant encore 60 minutes avant les enregistrements.

Dans une seconde série d'expériences, les préparations sont dépolarisées par une solution hyperpotassique de type 3 (voir tableau I), l'excitabilité membranaire étant restaurée par addition d'isoprotérénol à la concentration de $1.10^{-6}M$. Lors d'un récent travail réalisé en partie au Laboratoire, HONORE (1986) a montré que dans ces conditions particulières, la contraction du muscle papillaire de cobaye présente 2 pics de tension, pics reliés aux influx de Ca empruntant les canaux rapides et les canaux lents.

Le muscle papillaire de cobaye est stabilisé en solution de Tyrode standard durant 60 minutes, la fréquence de stimulation est de 1 Hz. La préparation est ensuite perfusée par une solution hyperpotassique de 17 mM de KCl pendant 15 minutes. La restauration de l'excitabilité en milieu hyperpotassique est rendue possible par adjonction d'isoprotérénol à la concentration de $1.10^{-6}M$. Après 60 minutes de stabilisation dans ce dernier milieu, des concentrations cumulées de PK11195 sont testées après là encore, 30 minutes chacune.

PARAMETRES MESURES

- le potentiel diastolique ou Er en millivolts (mV),
- l'amplitude du potentiel d'action ou APA en millivolts (mV),
- les durées du potentiel d'action mesurées à 30%, 50% et 90% de la repolarisation (DPA30, DPA50 et DPA90) en millisecondes (ms),
- la vitesse maximale de dépolarisation ou Vmax en Volts par seconde (V/s).
- l'amplitude de la tension en milligrammes (mg).

B - Etudes des préparations soumises à une "ischémie" in vitro .

Après prélèvement du coeur, un fragment de ventricule gauche (7 × 12) est disséqué puis transporté dans la cuve expérimentale équipée d'un compartiment central de 1,7 ml où il est épinglé. L'oxygénation de la préparation est assurée par un barbotage de carbogène (95% O₂, 5% CO₂). Les conditions d'"ischémie" sont réalisées en remplaçant le carbogène par un mélange à 95% N₂, 5% CO₂ (dans ce cas, la pO₂ est de 80 ± 10 mmHg, la pCO₂ est de 34 ± 2 mmHg) et en modifiant le liquide physiologique de la façon suivante :

- élévation de la concentration extracellulaire en K⁺ de 4 mM à 12 mM,
- abaissement du pH de 7,35 ± 0,05 à 7 ± 0,05 par abaissement de la concentration en HCO₃⁻ de 24 à 8 mM (la concentration en Na⁺ est compensée par addition de NaCl),
- diminution de la concentration en glucose de 11 mM à 2,2 mM,
- diminution du débit de perfusion de 4 à 0,15 ml.min⁻¹.

La préparation est stimulée électriquement comme précédemment au centre de la préparation à la fréquence de 1 Hz.

Protocole Experimental

Après 180 minutes de stabilisation en milieu standard, les

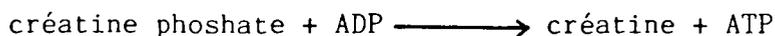
préparations sont soumises aux conditions ischémiques pendant 120 minutes. A l'issue de cette ischémie, les préparations sont replacées pendant 30 minutes dans le liquide physiologique standard, cette situation simulant la reperfusion d'un territoire ischémié. Les créatine kinases (CK) sont dosées toutes les 15 minutes pendant la dernière heure de stabilisation, pendant l'ischémie et la reperfusion. Le PK11195 ou le vérapamil est ajouté au liquide de Tyrode dès le prélèvement du coeur et maintenu pendant toute la durée de l'essai. Pour étudier l'influence du PK11195 sur les effets du vérapamil, le PK11195 est ajouté au liquide de Tyrode dès le prélèvement du coeur, le vérapamil est ajouté à la 60ème minute de stabilisation, puis les 2 substances sont maintenues dans les liquides de perfusion jusqu'à la fin de l'expérimentation.

A la fin de l'expérience, le fragment de myocarde est placé pendant 15 heures dans une étuve (70°C) en vue de sa dessiccation et de sa pesée.

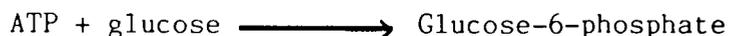
Recueil et dosage des CK dans le liquide effluent

Les CK sont dosées dans le liquide effluent qui est piégé et maintenu à une température de 4°C jusqu'au moment du dosage, pratiqué 30 minutes au plus tard après le dernier prélèvement. Le dosage est réalisé sur un analyseur centrifuge ROTOCHEM 2A36 selon la méthode de OLIVER et ROSALSKI, coffret CALBIOCHEM-BEHRING CPK-S.U.T.TM. Ce dosage est réalisé à 30°C.

Le détail de la réaction est le suivant :



Hexokinase



glucose-6-phosphate
déshydrogénase

L'appareil enregistre à 340 nm l'augmentation de densité optique qu'entraîne la formation de NADPH.

Le volume de prélèvement nécessaire à un dosage est de 10 mcl. Ce prélèvement est dilué par 40 mcl de sérum physiologique. Le volume de réactif est de 500 mcl. La mesure de l'évolution de densité optique commence après 180 secondes d'incubation ; les concentrations de substrats sont telles que l'enzyme (CK) travaille à vitesse maximale. 9 mesures de densité optique sont enregistrées toutes les 20 secondes.

La pente de la droite que forment ces différents points de mesure est proportionnelle à l'activité CKinasiqne du prélèvement. Cette activité est calculée à partir du coefficient d'extinction moléculaire de NADPH.

Les résultats sont donnés en milliunités internationales par millilitre (mUI/ml). L'activité CKinasiqne libérée est alors rapportée par gramme de myocarde sec. Le résultat est exprimé en unités internationales par gramme de myocarde sec (UI/g sec).

Le recueil de l'activité électrique

L'activité électrique est recueillie par microélectrode et analysée comme précédemment. La préparation est dite inexcitable lorsqu'elle ne répond plus à un stimulus de 11 mA, intensité au delà de laquelle il ne nous a pas semblé raisonnable de recourir.

Le temps pendant lequel l'activité électrique se maintient en ischémie (exprimé sous le terme de "persistance de l'activité électrique") est noté pour chaque préparation.

Expression des résultats

La moyenne et l'erreur standard à la moyenne sont calculées pour chacun des paramètres mesurés. Le test "t" de STUDENT en séries non appariées est utilisé comme test statistique de comparaison des moyennes. En ce qui concerne l'ensemble de notre experimentation, le seuil de signification est atteint lorsque $p < 0,05$.

RESULTS

RESULTATS

I - CELLULES NORMALES :

1) Effets sur les activités électrique et mécanique sur le muscle papillaire de cobaye du PK11195 (n = 5)

Le PK11195, étudié à la concentration de $3 \cdot 10^{-6}$ M, ne modifie pas significativement les paramètres du potentiel d'action et n'exerce donc vraisemblablement pas d'effet sur l'activité électrique des cellules myocardiques (figure 6), par contre, l'amplitude de la force de contraction est diminuée à l'issue des 60 minutes de perfusion du PK11195 (figure 6). Il s'agit bien d'un effet du PK11195 puisque la force contractile diminue en présence de son solvant (DMSO) de $10,3 \pm 3,6\%$. Le PK11195 exerce donc un effet propre inotrope négatif. Du fait de cet effet inotrope négatif, nous avons étudié dans une autre série d'expérience, l'effet de concentrations cumulées de PK11195 sur la contraction.

Le PK11195 diminue l'amplitude de la force de contraction significativement à partir de la concentration de $1 \cdot 10^{-6}$ M (figure 7), alors que l'amplitude de la contraction ne diminue sensiblement sous l'effet du DMSO qu'à la concentration de $1 \cdot 10^{-4}$ M. Ainsi, le PK11195 exercerait bien un effet inotrope négatif dont l'amplitude dépendant de sa concentration.

2) Influence du PK11195 sur les effets de deux antagonistes calciques (vérapamil et nifédipine) sur les activités électrique et mécanique.

a) Effets du vérapamil : (n = 5), (figures 8-A, 11, 14-A, tableau II)

	PK11195 30 min	PK11195 60 min
Er (mV)	86,4 ± 0,8	86,4 ± 0,5
APA	100,5 ± 0,4	100,2 ± 0,8
V _{max}	101,3 ± 3,5	101,0 ± 1,8
DPA30	99,4 ± 1,5	99,3 ± 1,0
DPA50	98,1 ± 3,1	101,6 ± 4,0
DPA90	98,6 ± 2,4	101,9 ± 3,6
INO	82,6 ± 3,2	69,0 ± 3,7

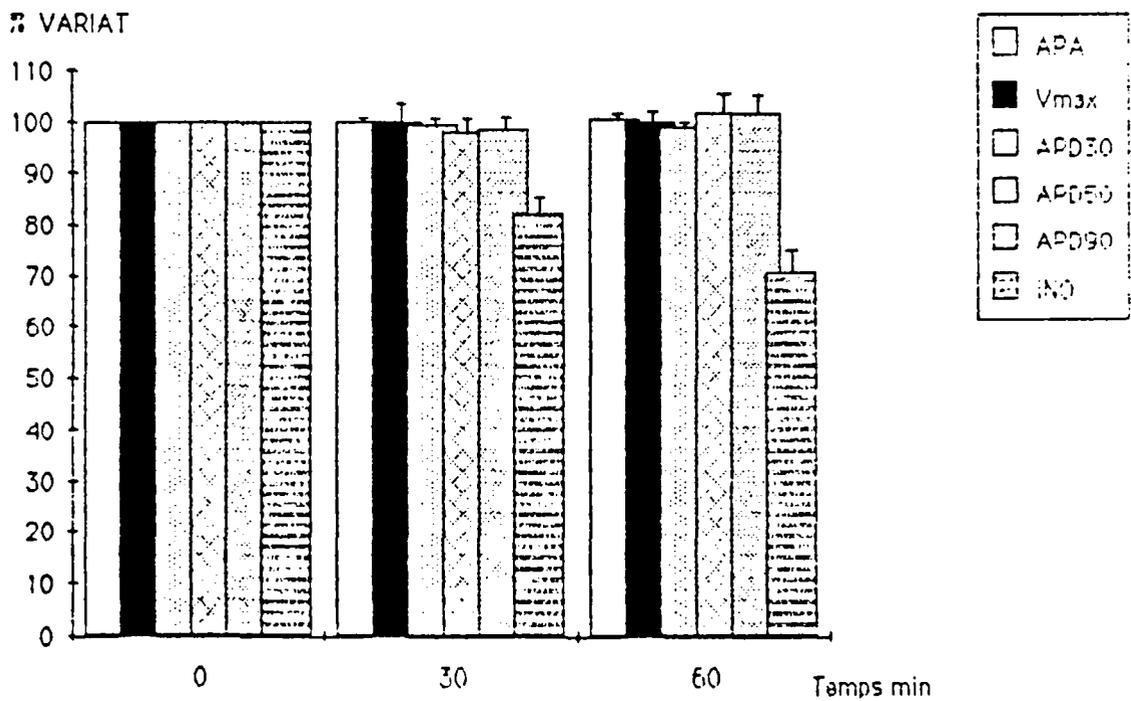


Figure 6 : Effets du PK11195 (3.10-6M) sur l'activité électrique et la force contractile (INO), représentés en pourcentages moyens de la valeur contrôle affectés de leur erreur standard, dans des conditions normales.

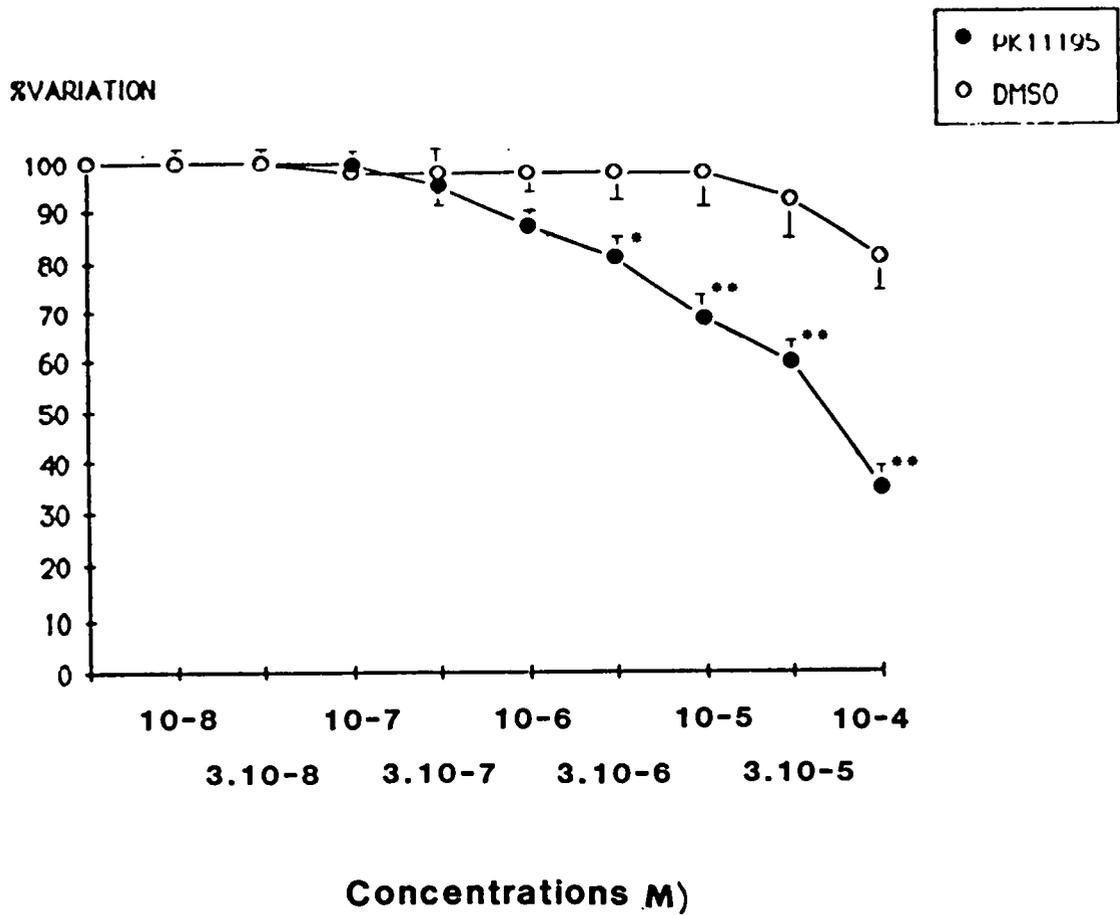


Figure 7 : Effets de concentrations cumulées de PK11195 et de son solvant (DMSO) sur l'activité mécanique du muscle papillaire de cobaye dans des conditions normales. * $p < 0,05$.

Sous l'influence du vérapamil ($1.10^{-6}M$), le potentiel membranaire de repos passe de $-85 \pm 0,5$ à $-83,3 \pm 0,8$ mV. L'amplitude du PA diminue de $4,2 \pm 1,6\%$, les durées des PA raccourcissent et de façon plus marquée à 30% et 50% ($8,3 \pm 1,9\%$ et $7,0 \pm 0,3\%$ respectivement). La vitesse maximale de dépolarisation ralentit de $3,1 \pm 1,6\%$.

Dans ces mêmes conditions, l'amplitude de la contraction est très diminuée, la diminution atteignant $71 \pm 2,9\%$ de sa valeur initiale après 60 minutes de perfusion (figures 8-A, 14-A).

b) Influence du PK11195 sur les effets du vérapamil (n = 5) (figures 8-B, 11, 14-A)

Lorsque le vérapamil est perfusé à la concentration de $1.10^{-6} M$ après la perfusion pendant 60 minutes de PK11195, l'amplitude du PA ne varie pas et demeure à sa valeur contrôle. Il est observé un léger allongement de la DPA50 de $3,1 \pm 1,2\%$ et de la DPA90 de $5,4 \pm 1,3\%$. Le potentiel membranaire de repos n'est pas modifié tandis qu'est observé un ralentissement de la vitesse de dépolarisation de l'ordre de $3,2 \pm 4,4\%$. Par contre, l'amplitude de la contraction ne diminue que de $53,2 \pm 3,5\%$, alors qu'en présence uniquement du vérapamil la chute atteignait $71 \pm 2,9\%$.

c) Effets de la nifédipine (n = 5), (figures 9-A, 12, 14-B, tableau II)

La nifédipine à la concentration de $3.10^{-7}M$ diminue l'amplitude du PA de $8,4 \pm 2,5\%$, ralentit la V_{max} de $16,7 \pm 5,4\%$ et raccourcit la DPA30, la DPA50 et la DPA90 respectivement de $17,3 \pm 4,8\%$, de $16,7 \pm 3,2\%$ et de $14,6 \pm 2,3\%$.

L'amplitude de la force de contraction est fortement réduite, la diminution étant de $80,7 \pm 2,5\%$.

d) Influence du PK11195 sur les effets de la nifédipine (n = 5) (figures 9-B, 12, 14-B)

Le prétraitement des préparations par le PK11195 à la concentration de 3.10-6M, ne modifie sensiblement pas les effets dépresseurs de la nifédipine sur les activités électrique et mécanique. Cependant une diminution plus ample de l'APA est enregistrée.

3) Influence du PK11195 sur les effets d'un agoniste calcique, le BAY K 8644,

a) Effets du BAY K 8644 seul (n = 5), (figures 10-A, 13, 14-C, tableau II)

Le BAY K 8644 à la concentration de 3.10-7M, augmente significativement l'amplitude du PA de $5,3 \pm 1\%$, allonge les durées du PA, DPA30, DPA50 et DPA90, respectivement de $24,4 \pm 4\%$, de $28,2 \pm 3,3\%$ et de $23,4 \pm 2,5\%$. Le potentiel membranaire de repos et la vitesse maximale de dépolarisation ne varient pas. Le BAY K 8644 exerce un effet inotrope positif puissant, l'amplitude de la contraction augmentant de $91 \pm 16,5\%$.

b) Influence du PK11195 sur les effets du BAY K 8644, (n = 5) (figures 10-B, 13, 14-C)

En présence de PK11195 (3.10-6M), les effets du BAY K 8644 (3.10-7M) sont moins marqués : l'amplitude du PA n'augmente plus que de $3,1 \pm 7,4\%$, et l'augmentation de la DPA30 n'est plus que de $13,3 \pm 1,9\%$, celle à 50% de la repolarisation de $16 \pm 2,1\%$ et celle à 90% de $16 \pm 1\%$.

Egalement l'amplitude de la contraction ne s'accroît que de $61 \pm 10,7\%$, cette atténuation étant juste à la limite de la signification.

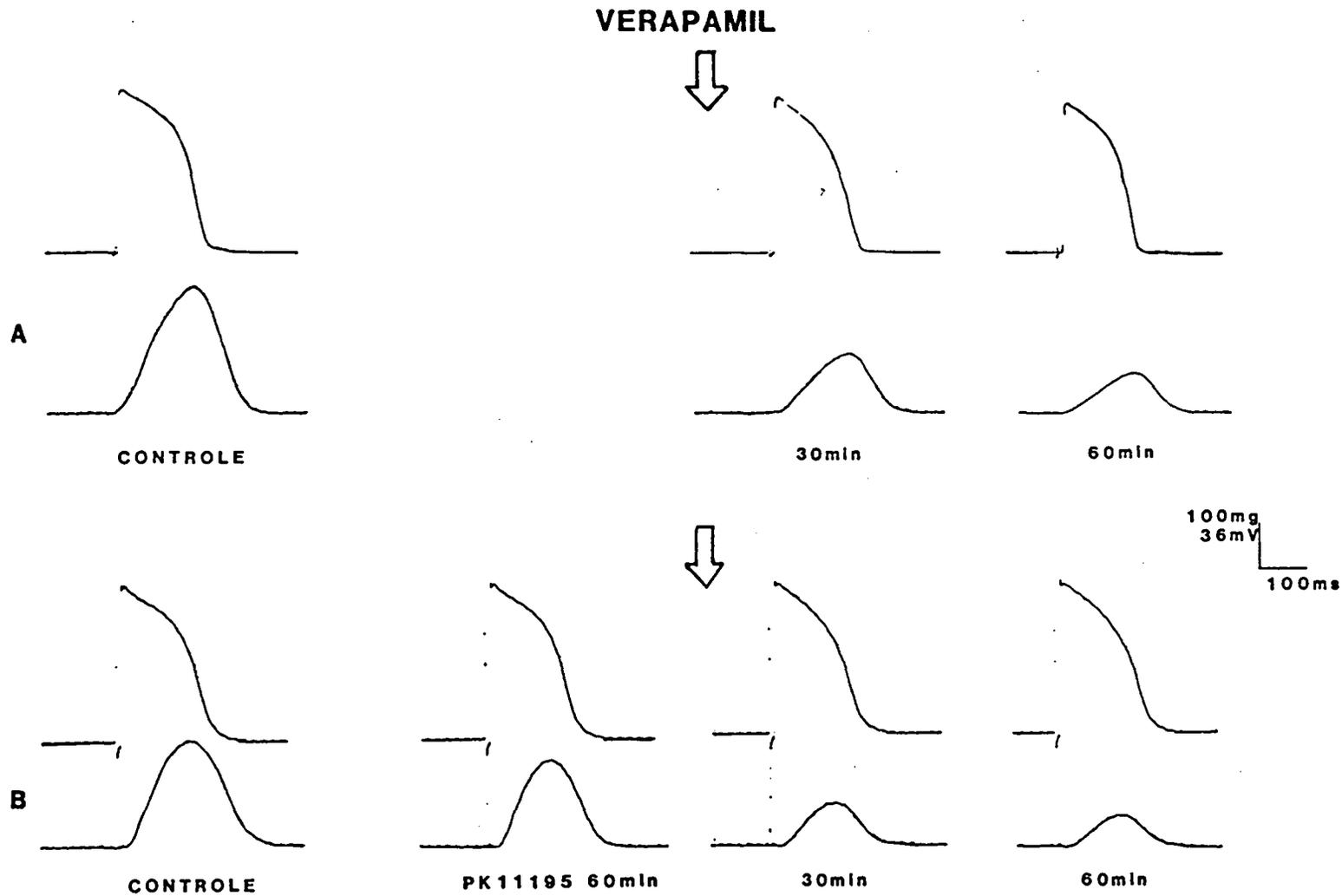


Figure 8 : Exemple de l'influence du PK11195 ($3 \cdot 10^{-6}M$) sur les effets du vérapamil sur l'activité électromécanique du muscle papillaire de cobaye dans les conditions normales,

A - effets du vérapamil seul ($1 \cdot 10^{-6}M$)

B - effets du prétraitement par le PK11195 vis-à-vis des effets du vérapamil.

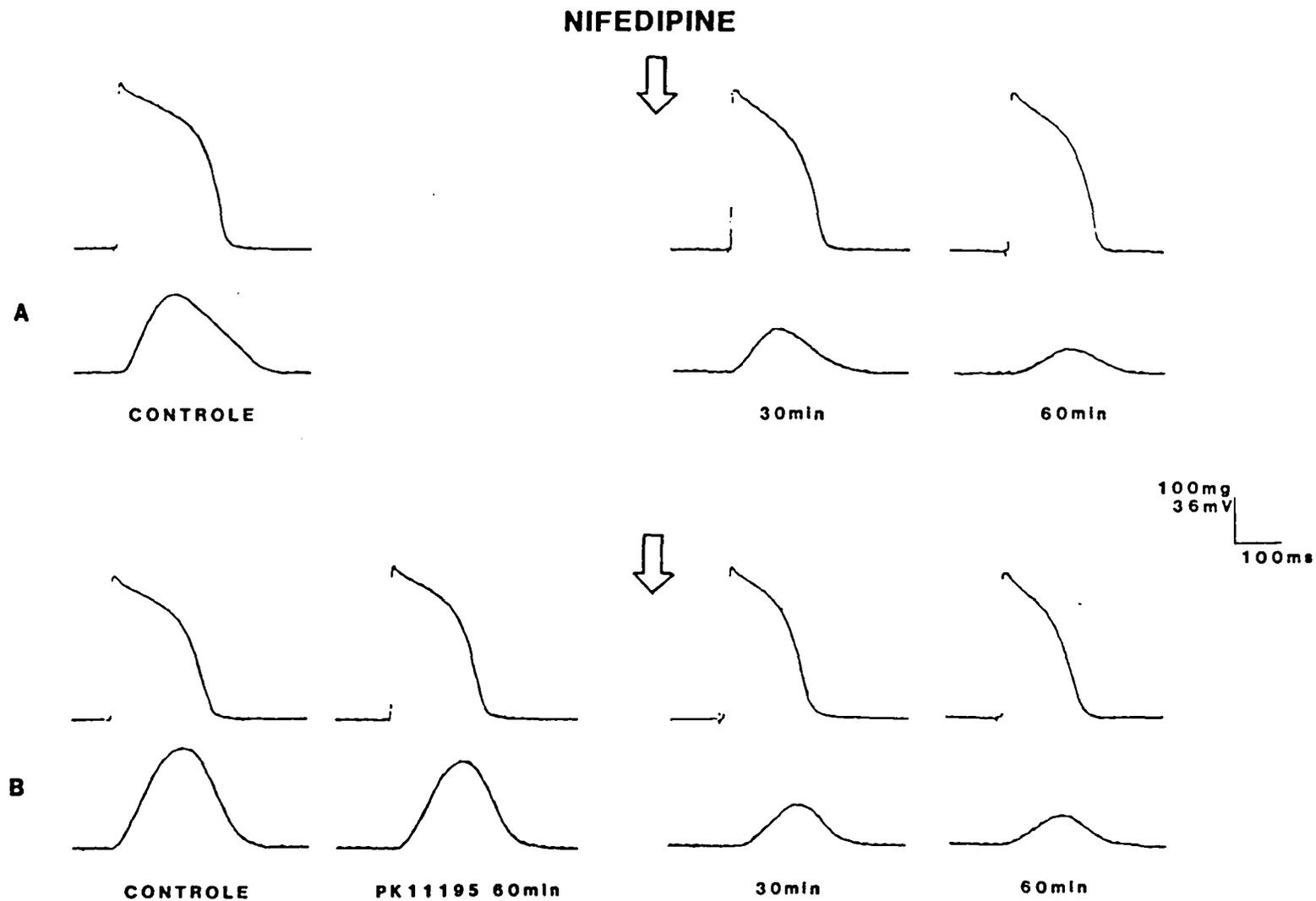


Figure 9 : Exemple de l'influence du PK11195 ($3.10^{-6}M$) sur les effets de la nifédipine sur l'activité électromécanique du muscle papillaire de cobaye,

A - effets de la nifédipine seule ($3.10^{-7}M$)

B - effets du prétraitement par le PK11195 vis-à-vis des effets de la nifédipine.

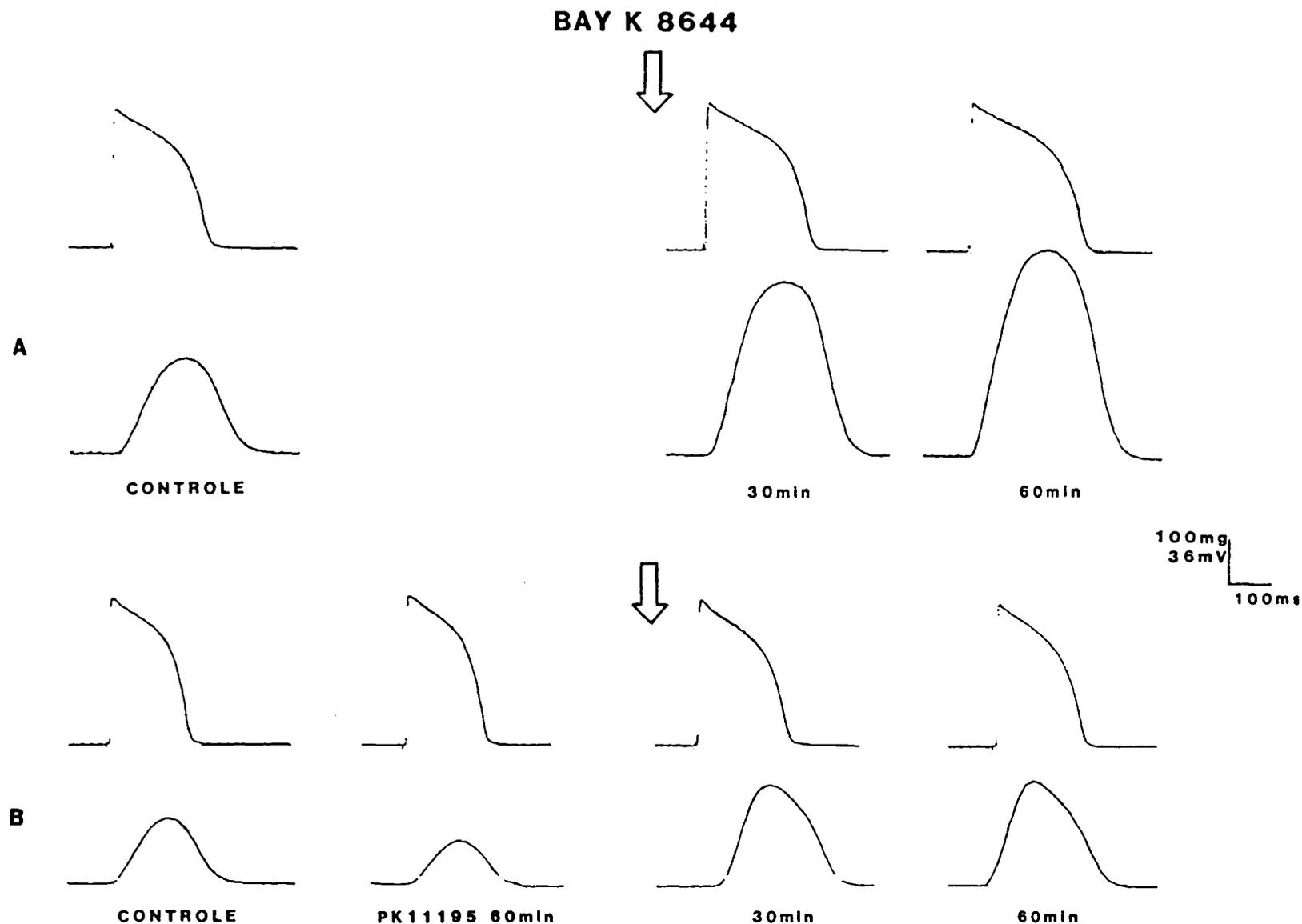


Figure 10 : Exemple de l'influence du PK11195 ($3.10^{-6}M$) sur les effets du BAY K 8644 sur l'activité électromécanique du muscle papillaire de cobaye,

A - effets du BAY K 8644 seul ($3.10^{-7}M$)

B - effets du prétraitement par le PK11195 vis-à-vis des effets du BAY K 8644.

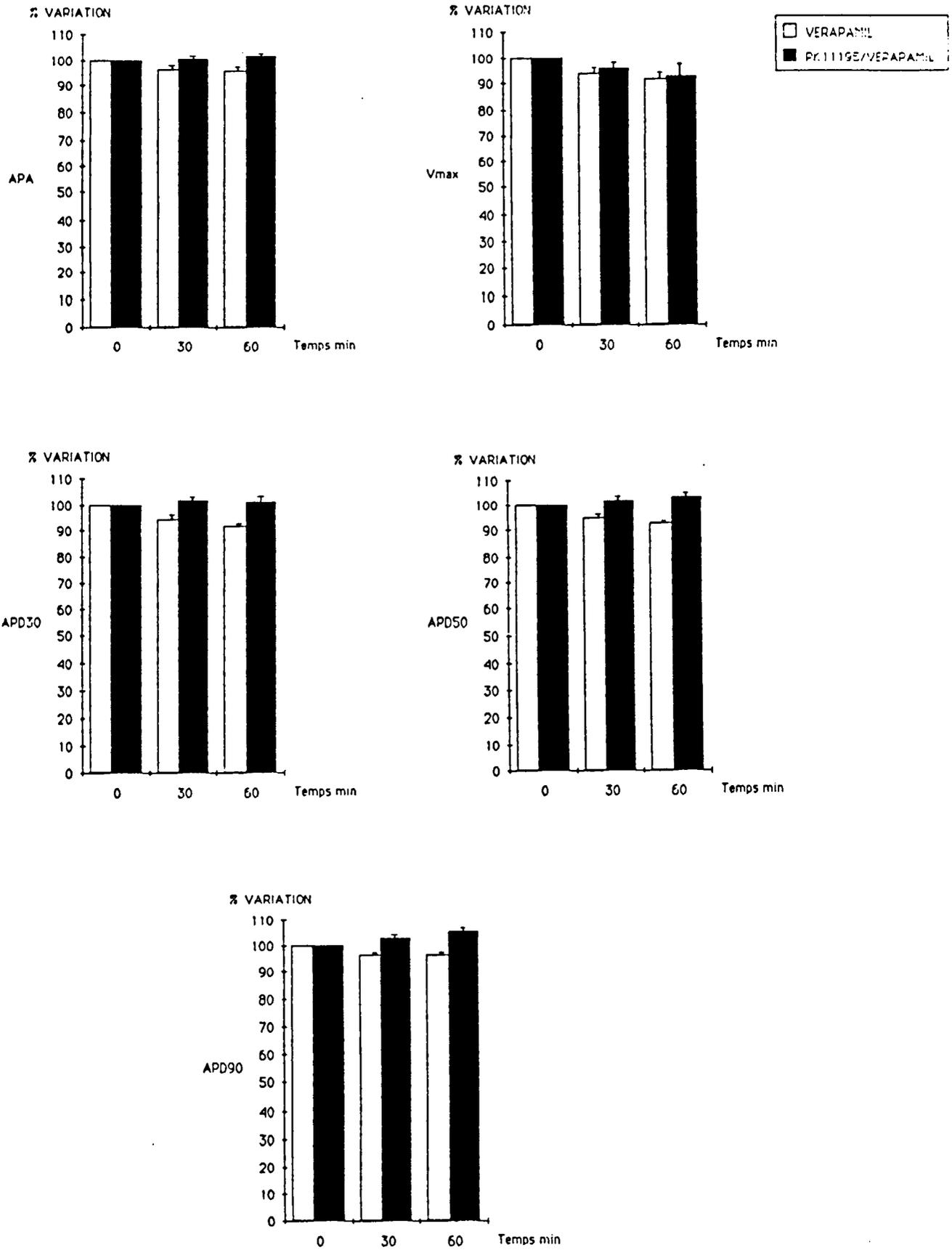


Figure 11 : Evolution comparée de l'effet du vérapamil ($1.10^{-6}M$) sur l'activité électrique des potentiels d'action en absence et en présence de PK11195 ($3.10^{-6}M$).

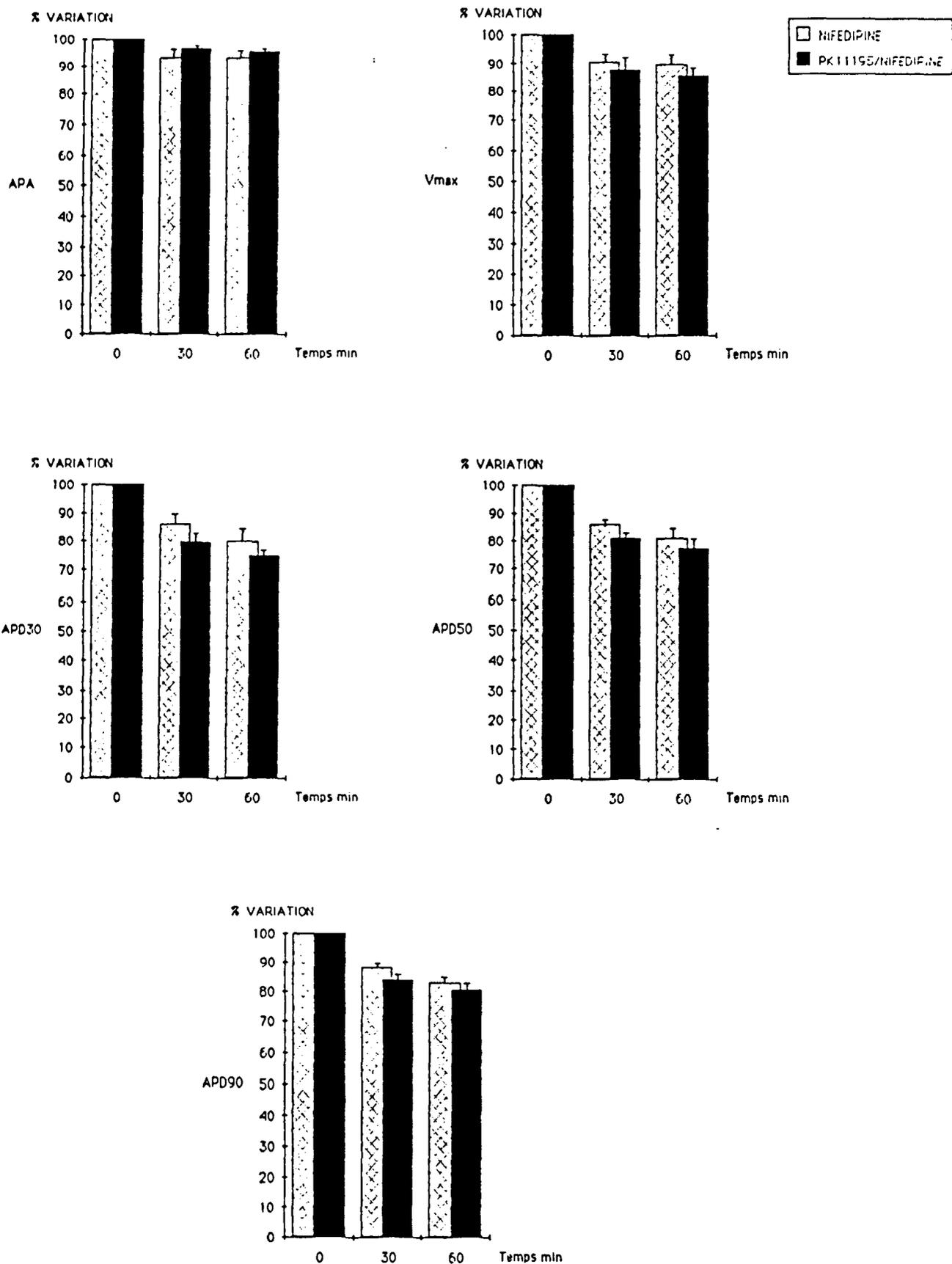


Figure 12 : Evolution comparée de l'effet de la nifédipine ($3.10^{-7}M$) sur l'activité électrique des potentiels d'action en absence et en présence de PK11195 ($3.10^{-6}M$).

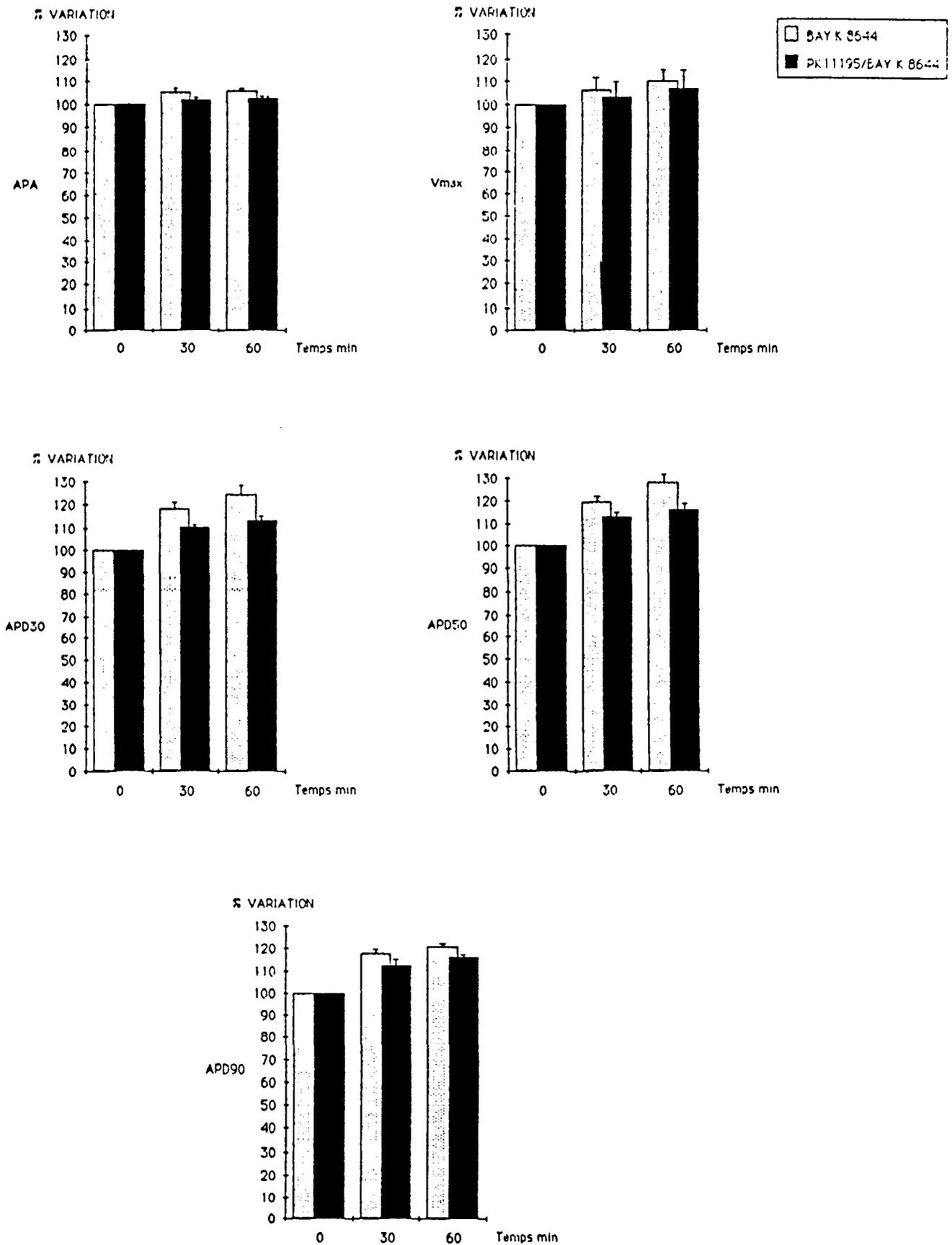


Figure 13 : Evolution comparée de l'effet du BAY K 8644 (3.10-7M) sur l'activité électrique des potentiels d'action en absence et en présence de PK11195 (3.10-6M).

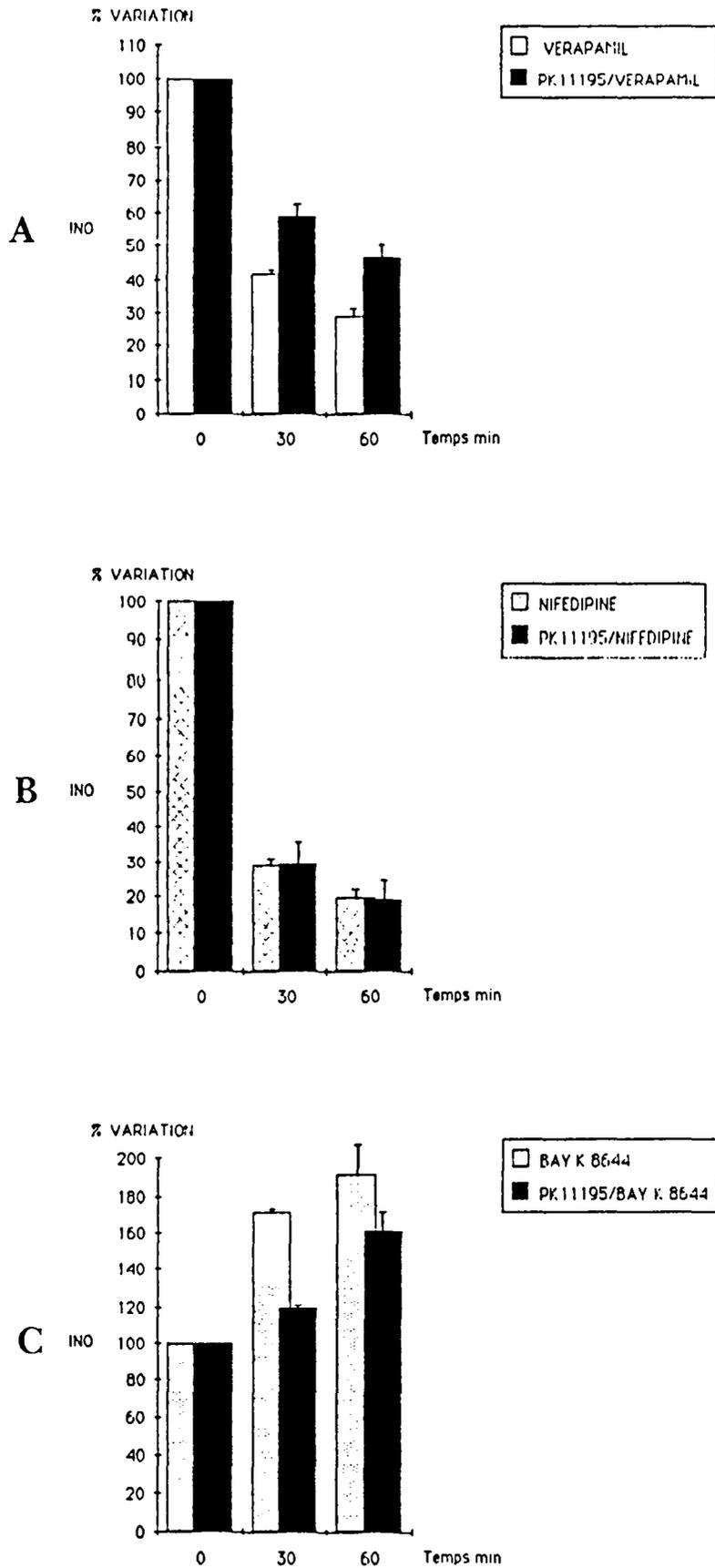


Figure 14 : Evolution comparée de l'effet du vérapamil (A), de la nifédipine (B) et du BAY K 8644 (C) sur la force contractile en absence et en présence de PK11195.

	Temps min	VERAPAMIL	PK11195/ VERAPAMIL	NIFEDIPINE	PK11195/ NIFEDIPINE	BAY K 8644	PK11195/ BAY K 8644
Er (mV)	30	85,0 ± 0,5	83,3 ± 2,3	86,0 ± 1,1	85,8 ± 1,2	86,3 ± 0,9	85,6 ± 0,4
	60	83,3 ± 0,8	84,3 ± 2,2	86,3 ± 0,6	85,8 ± 1,4	85,3 ± 1,2	85,8 ± 0,4
APA	30	-3,50 ± 1,7	-1,60 ± 2,2	-6,30 ± 2,9	-3,90 ± 2,7	+4,80 ± 0,9	+2,00 ± 0,4 ^{**}
	60	-4,20 ± 1,6	+1,50 ± 1,1 [*]	-8,40 ± 2,4	-3,90 ± 0,8	+4,80 ± 0,9	+2,30 ± 0,4 ^{**}
Vmax	30	-2,40 ± 1,2	-1,60 ± 2,3	-8,40 ± 4,1	-17,4 ± 4,3	+6,10 ± 5,3	+4,80 ± 6,6
	60	-3,10 ± 1,6	-3,20 ± 4,4	-16,3 ± 5,4	-19,0 ± 2,7	+5,40 ± 5,0	+3,10 ± 7,4
DPA30	30	-5,80 ± 1,2	+1,70 ± 2,1 ^{**}	-14,2 ± 3,1	-19,3 ± 3,0	+18,2 ± 2,3	+10,5 ± 0,9 ^{**}
	60	-8,40 ± 1,9	+1,00 ± 1,1 ^{**}	-17,3 ± 4,8	-25,0 ± 2,3	+24,4 ± 4,0	+13,3 ± 1,9 ^{**}
DPA50	30	-5,30 ± 0,9	+1,70 ± 1,6 [*]	-14,2 ± 1,8	-19,1 ± 1,7	+19,8 ± 2,8	+12,5 ± 1,3 [*]
	60	-7,00 ± 0,3	+3,10 ± 1,2 ^{**}	-16,4 ± 3,2	-21,5 ± 3,3	+28,2 ± 3,3	+16,0 ± 2,1 ^{**}
DPA90	30	-3,60 ± 0,7	+2,90 ± 1,3 ^{**}	-12,5 ± 1,2	-16,4 ± 2,2	+17,9 ± 1,8	+12,2 ± 2,5 [*]
	60	-3,50 ± 0,6	+5,40 ± 1,3 ^{**}	-14,6 ± 2,3	-16,8 ± 2,6	+23,4 ± 2,5	+16,0 ± 1,0 ^{**}
INO (P1)	30	-58,3 ± 3,1	-41,2 ± 3,8 ^{**}	-70,4 ± 1,9	-71,0 ± 6,7	+71,8 ± 10,0	+19,8 ± 13,1 [*]
	60	-71,0 ± 2,9	-53,2 ± 3,5 ^{**}	-80,7 ± 2,5	-80,3 ± 5,1	+91,1 ± 16,5	+60,8 ± 10,7

Tableau II : Influence du PK11195 (3.10-6M) sur les effets du vérapamil (1.10-6M), de la nifédipine (3.10-7M) et du BAY K 8644 (3.10-7M). Les résultats sont exprimés en pourcentages de variation affectés de leur erreur standard, dans des conditions normales. (INO = force contractile).

Discussion Partielle

Le vérapamil à la concentration de $1.10^{-6}M$ exerce des effets dépresseurs sur les divers paramètres électriques étudiés du potentiel d'action ; ces effets étant significatifs en ce qui concerne la durée du potentiel d'action et l'amplitude de la contraction. Les effets dépresseurs du vérapamil sont ainsi moins amples en présence du PK11195.

Les effets dépresseurs exercés par la nifédipine ($3.10^{-7}M$) sur les paramètres électriques du potentiel d'action et sur la contraction sont plus importants que ceux du vérapamil aux concentrations étudiées dans ce travail, par contre, ces effets ne sont pas antagonisés par le PK11195.

Quant au BAY K 8644 ($3.10^{-7}M$), il allonge la durée du potentiel d'action au différents niveaux de la repolarisation et augmente l'amplitude de la contraction. De plus, les effets électrophysiologiques et inotropes du BAY K 8644 sont diminués significativement par le PK11195. Cependant les effets inotropes du BAY K 8644 sont moins modifiés par le PK11195 puisque la diminution enregistrée atteint tout juste le seuil de signification.

D'une manière générale, le PK11195 est dépourvu d'effet propre sur l'activité électrique des cellules myocardiques mais il antagonise les effets dépresseurs du vérapamil et activateurs du BAY K 8644. Cependant, il est sans effet sur la dépression des activités électrique et mécanique induites par la nifédipine. Aussi l'appartenance de la nifédipine et du BAY K 8644 à la même famille chimique d'une part et les effets opposés du PK11195 tant sur les activités électrique que mécanique, d'autre part, paraissent difficilement explicables.

II - CELLULES DEPOLARISEES, (K⁺ 22 mM, Ba²⁺ 0,2 mM)

1) Effets du PK11195 (n = 5), (figure 15)

Le PK11195 à la concentration de 3.10⁻⁶M exerce comme en milieu normal, une diminution significative de l'amplitude de la contraction et ne modifie pas les autres paramètres électriques étudiés du potentiel d'action.

2) Effets du PK11195 vis-à-vis des effets du vérapamil (n = 5), (figures 16-A, 19, 22-A, tableau III)

a) Le vérapamil à la concentration de 3.10⁻⁷M, (n = 5), diminue l'amplitude du PA de $14,8 \pm 4,3\%$ et la vitesse maximale de dépolarisation de $62,3 \pm 4,2\%$. La DPA50 diminue de $44,2 \pm 9,4\%$ et la DPA90 de $45,3 \pm 2,1\%$. Quant à l'amplitude de la contraction, elle décroît de $63,8 \pm 6\%$.

b) Après prétraitement par le PK11195 à la concentration de 3.10⁻⁶M, le vérapamil (3.10⁻⁷M) diminue l'amplitude du PA de $13,7 \pm 3,5\%$. La Vmax ne diminue plus que de $33,9 \pm 8,8\%$, la DPA50 de $22,0 \pm 2\%$ et la DPA90 de $18,0 \pm 2,4\%$. La réduction de l'amplitude de la contraction est moins ample, la diminution n'étant que de $53,4 \pm 3\%$.

3) Effets du PK11195 vis-à-vis de la nifédipine, (n = 5) (figures 17-A, 20, 22-B, tableau III)

a) La nifédipine à la concentration de 3.10⁻⁷M, (n = 5), diminue l'amplitude du PA de $17 \pm 3,5\%$, la Vmax de $68,6 \pm 21,4\%$, la réduction de la DPA50 est de $44,5 \pm 15\%$ et la DPA90 de $36,3 \pm 16,4\%$. Sur les cellules dépolarisées, la nifédipine exerce un effet inotrope négatif important puisque l'amplitude de la contraction diminue de $75,5 \pm 2,9\%$.

b) Lorsque les préparations sont prétraitées pendant 60 minutes par le PK11195 à la concentration de 3.10⁻⁶M, la nifédipine (3.10⁻⁷M) ne diminue

	PK11195 30 min	PK11195 60 min
Er(mV)	45,2 ± 0,5	46,0 ± 1,1
APA	99,3 ± 0,9	99,3 ± 0,8
Vmax	97,6 ± 5,3	98,5 ± 5,8
DPA30	99,7 ± 3,4	102,4 ± 4,2
DPA50	99,3 ± 3,0	101,7 ± 2,6
DPA90	98,3 ± 2,8	100,2 ± 1,9
INO	83,7 ± 2,5	75,4 ± 4,5

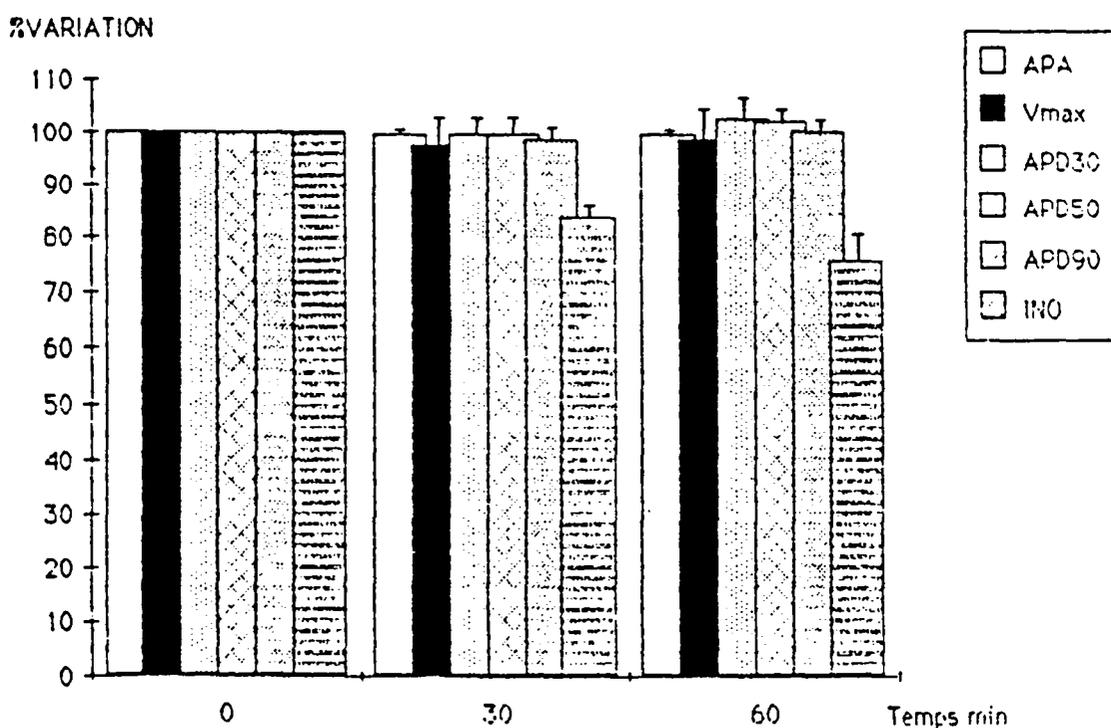


Figure 15 : Effets du PK11195 ($3 \cdot 10^{-6}M$) sur les activités électrique et mécanique de muscle papillaire de cobaye en milieu dépolarisant ($K^+ = 22$ mM, $Ba^{2+} = 0,2$ mM).

l'amplitude du PA que de $7,0 \pm 0,9\%$, la V_{max} de $58,9 \pm 4,8\%$, la DPA50 est réduite de $39,1 \pm 5,2\%$ et la DPA90 de $32,2 \pm 4,3\%$. L'effet inotrope négatif de la nifédipine n'est pas modifié par le PK11195 puisque l'amplitude de la contraction diminue de $75,5 \pm 1,7\%$.

4) Effets du PK11195 vis-à-vis du BAY K 8644 (n = 5), (figures 18-A, 21, 22-C, tableau III)

a) Le BAY K8644 à la concentration de $3.10^{-7}M$, (n = 5), augmente très significativement l'amplitude du PA de $10,4 \pm 1,1\%$, la V_{max} de $122,5 \pm 16,5\%$ et les DPA50 et DPA90 de $62,0 \pm 12,3\%$ et $55,3 \pm 10,8$ respectivement.

En présence du BAY K 8644 il se développe deux composantes de contraction qui peuvent être rapprochées de celles décrites en solution hyperpotassique ($K^+ = 17mM$) et en présence d'isoprotérénol (HONORE et al., 1986a). Dans nos essais le BAY K 8644 a un effet plus marqué sur la seconde composante de contraction (augmentation de $293,8 \pm 23,7\%$) que sur la première composante (augmentation de $128,5 \pm 9,7\%$).

b) Le prétraitement par le PK11195 ($3.10^{-6}M$) modifie l'ampleur des variations entraînées par le BAY K 8644. C'est ainsi que les durées du PA mesurées à 30, 50 et 90% de la repolarisation ne s'accroissent respectivement que de $33,4 \pm 7,9\%$, de $35,6 \pm 2,3\%$, et de $32,1 \pm 1,2\%$. Par contre, aucun changement de l'amplitude du PA et de la V_{max} n'apparaît. De même, l'amplitude de la seconde composante de la contraction n'augmente que de $108,2 \pm 63,3\%$, tandis que l'amplitude de la première composante est réduite de $14,3 \pm 8,4\%$.

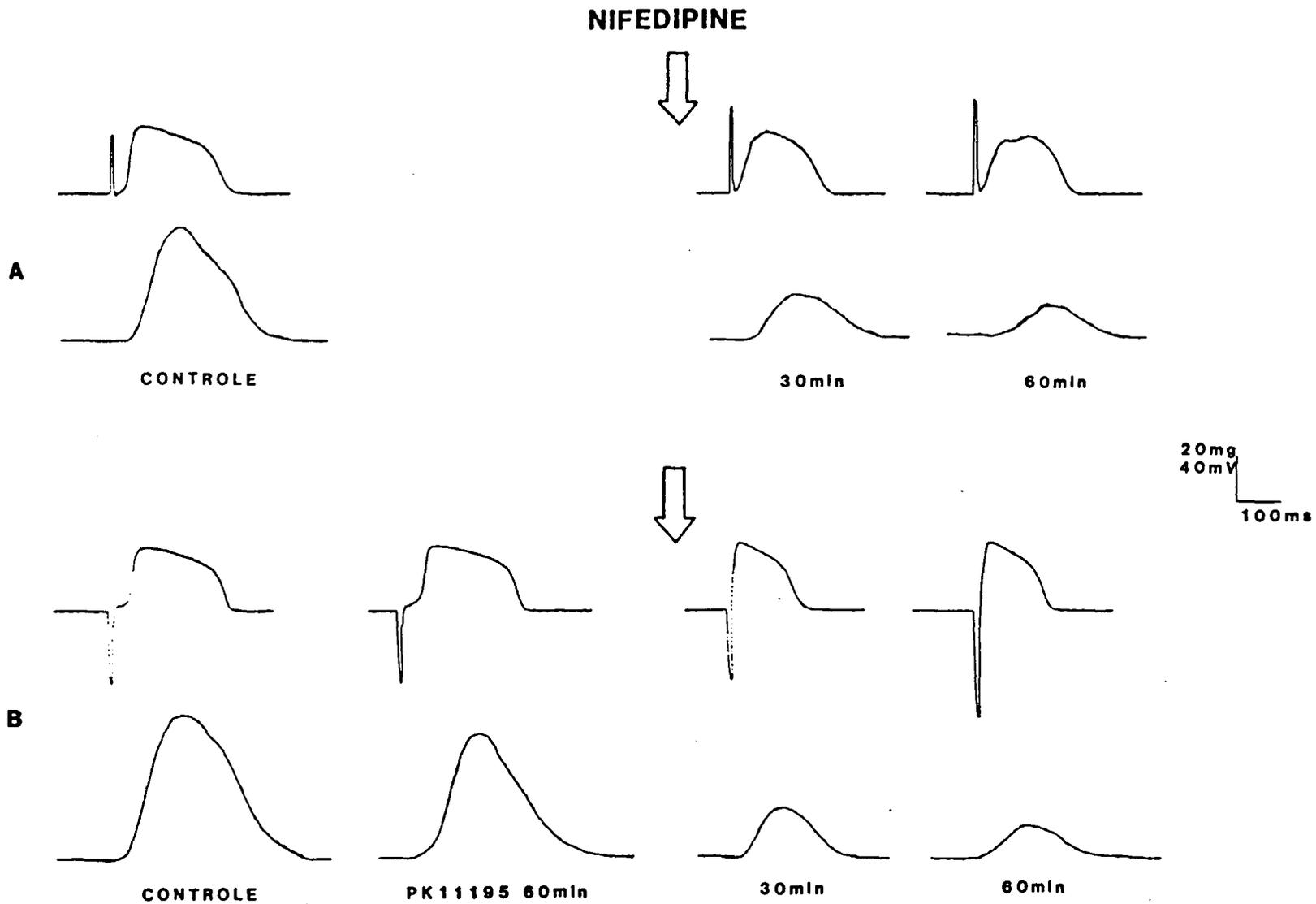


Figure 17 : Exemple de l'influence du PK11195 ($3.10^{-6}M$) sur les effets de la nifédipine sur les activités électrique et mécanique du muscle papillaire de cobaye,

A - effets de la nifédipine seule ($3.10^{-7}M$)

B - effets du prétraitement par le PK11195 vis-à-vis des effets de la nifédipine.

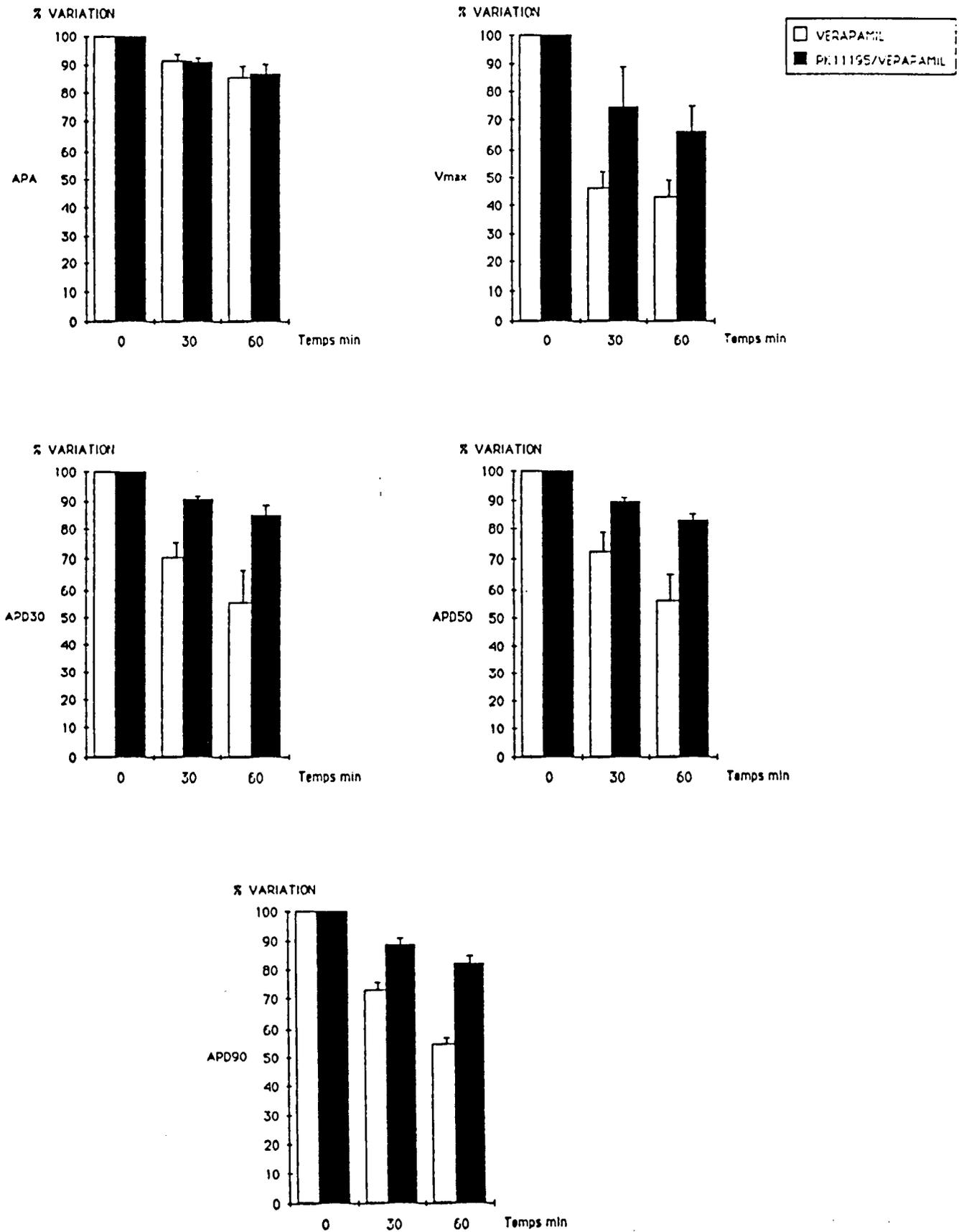


Figure 19 : Evolution comparée de l'effet du vérapamil (3.10-7M) sur l'activité électrique des potentiels d'action en absence et en présence de PK11195 (3.10-6M) en milieu dépolarisant.

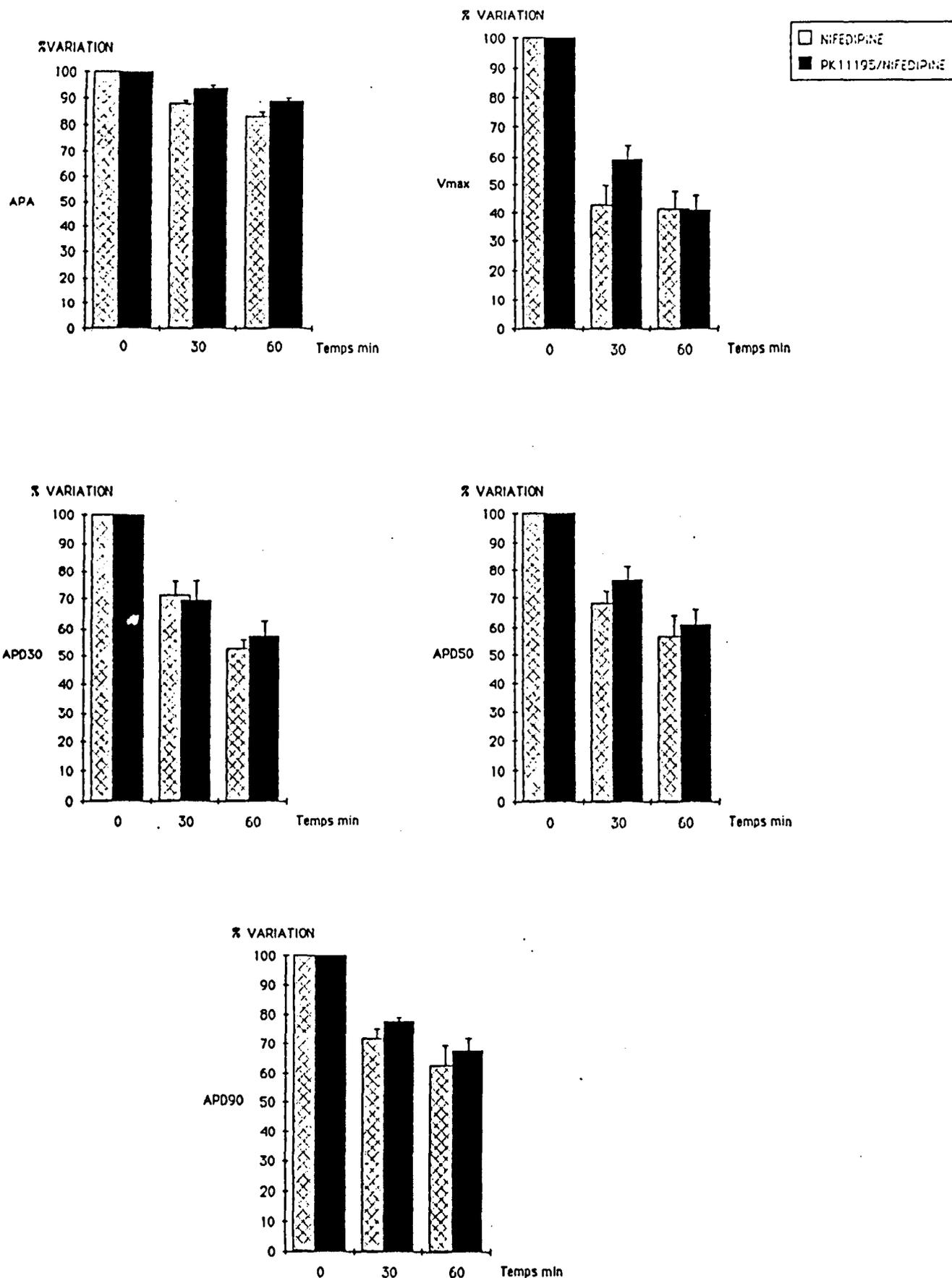


Figure 20 : Evolution comparée de l'effet de la nifédipine (3.10-7M) sur l'activité électrique des potentiels d'action en absence et en présence de PK11195 (3.10-6M) en milieu dépolarisant.

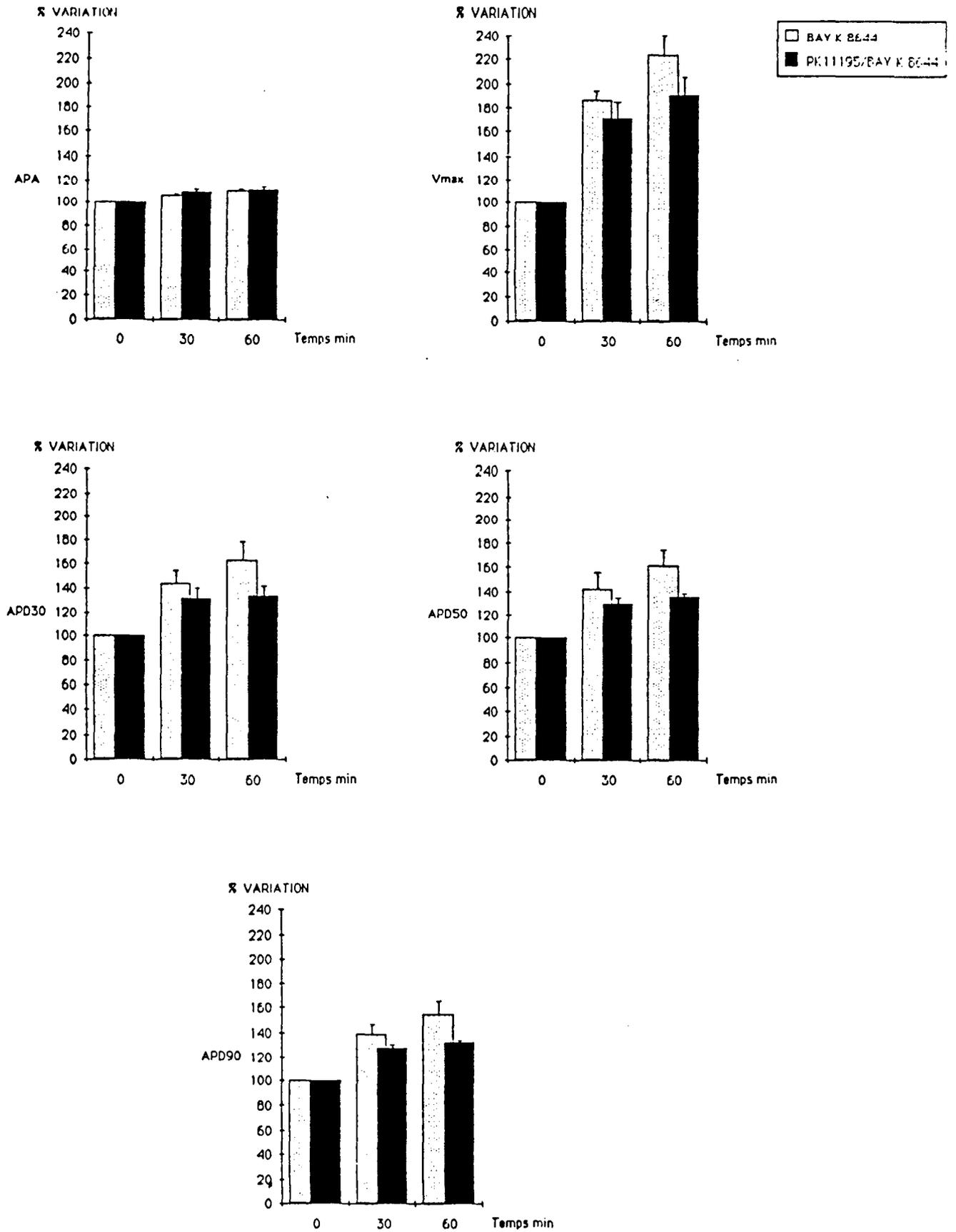


Figure 21 : Evolution comparée de l'effet du BAY K 8644 (3.10-7M) sur l'activité électrique des potentiels d'action en absence et en présence de PK11195 (3.10-6M) en milieu dépolarisant.

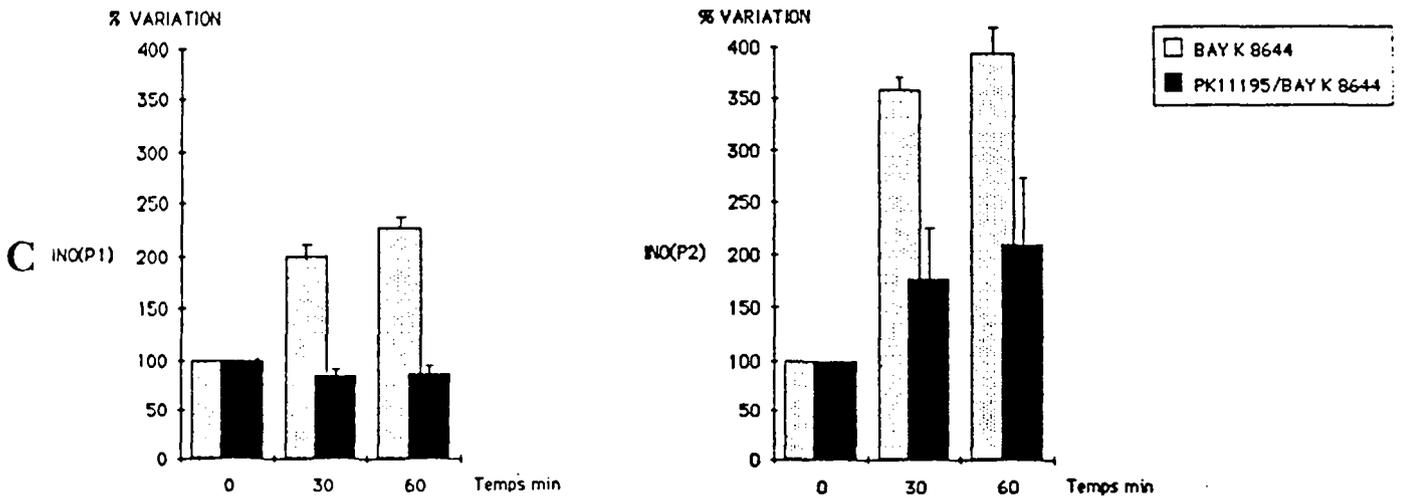
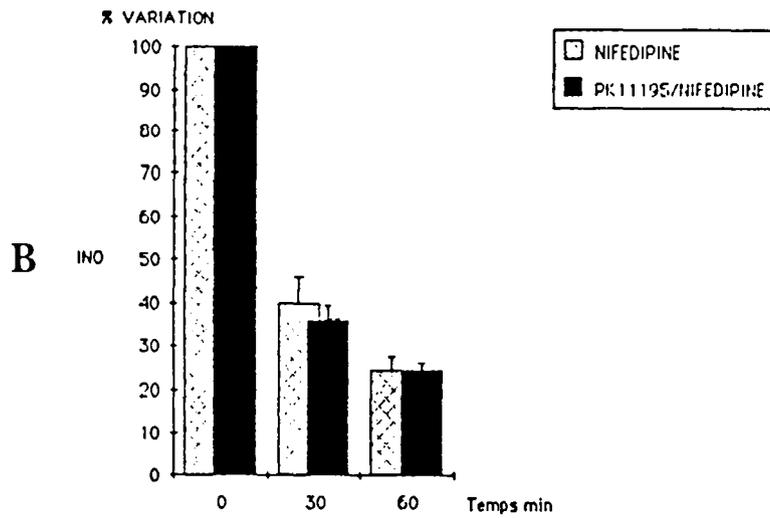
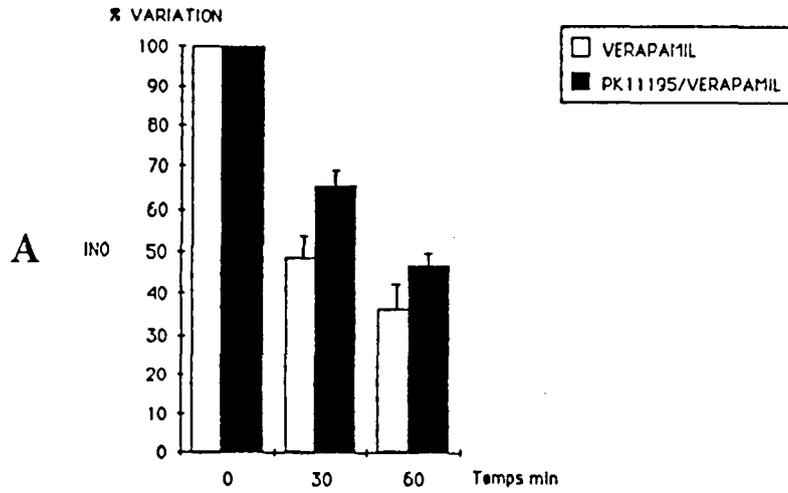


Figure 22 : Evolution comparée de l'effet du vérapamil (A), de la nifédipine (B) et du BAY K 8644 (C) sur la force contractile (INO) en absence et en présence de PK11195 en milieu dépolarisant.

	Temps min	VERAPAMIL	PK11195/ VERAPAMIL	NIFEDIPINE	PK11195/ NIFEDIPINE	BAY K 8644	PK11195/ BAY K 8644
Er (mV)	30	42,0 ± 1,5	44,3 ± 0,6	44,7 ± 0,3	43,7 ± 0,3	45,4 ± 0,9	44,3 ± 0,9
	60	42,0 ± 1,5	43,8 ± 1,0	43,3 ± 1,2	43,7 ± 0,3	45,6 ± 0,9	44,3 ± 0,9
APA	30	-8,4 ± 2,2	-9,1 ± 1,2	-12,4 ± 0,7	-4,0 ± 1,3 *	+6,2 ± 1,1	+9,3 ± 2,9
	60	-14,8 ± 4,3	-13,1 ± 3,5	-18,5 ± 1,1	-6,0 ± 0,9 *	+10,4 ± 1,1	+11,4 ± 2,2
Vmax	30	-54,0 ± 6,1	-25,5 ± 14,8	-57,1 ± 6,7	-41,1 ± 4,8	+86,4 ± 9,0	+71,2 ± 15,0
	60	-57,1 ± 5,9	-33,8 ± 8,8	-58,5 ± 5,8	-58,9 ± 4,8	+126,5 ± 16,5	+91,0 ± 14,3
DPA30	30	-29,1 ± 4,7	-9,1 ± 0,4 *	-28,4 ± 5,0	-30,2 ± 6,8	+43,0 ± 10,0	+31,0 ± 9,4
	60	-44,4 ± 11,1	-14,2 ± 3,6 *	-47,6 ± 3,3	-42,7 ± 5,6	+63,0 ± 13,5	+33,4 ± 7,9
DPA50	30	-27,2 ± 5,6	-10,2 ± 1,1 *	-31,9 ± 4,1	-23,7 ± 4,5	+41,8 ± 9,7	+29,6 ± 4,8
	60	-45,2 ± 9,4	-16,8 ± 2,0 *	-43,5 ± 7,5	-39,1 ± 5,2	+62,0 ± 12,3	+35,6 ± 2,3 *
DPA90	30	-27,0 ± 2,6	-11,2 ± 1,9	-27,9 ± 2,6	-22,2 ± 1,2	+38,9 ± 9,5	+28,0 ± 2,3
	60	-45,3 ± 2,1	-18,0 ± 2,4 **	-37,4 ± 7,1	-32,2 ± 4,3	+55,3 ± 10,8	+32,1 ± 1,2 *
INO (P1)	30	-51,5 ± 5,4	-34,3 ± 3,6 *	-60,1 ± 6,2	-64,0 ± 3,5	+100,4 ± 12,0	-16,0 ± 5,9 **
	60	-63,8 ± 6,0	-53,4 ± 3,0	-75,5 ± 2,9	-75,5 ± 1,7	+128,5 ± 9,7	-14,3 ± 8,4 **
INO (P2)	30					+258,3 ± 12,0	+76,8 ± 48,3 *
	60					+293,8 ± 23,7	+108,2 ± 63,3 *

Tableau III : Influence du PK11195 (3.10-6M) sur les effets du vérapamil (3.10-7M), de la nifédipine (3.10-7M) et du BAY K 8644 (3.10-7M). Les résultats sont exprimés en pourcentages de variation moyens affectés de leur erreur standard, en milieu dépolarisant.

Discussion Partielle

Le PK11195 à la concentration de $3.10^{-6}M$ exerce en milieu dépolarisant ($K^+ = 22mM$ et $17mM$) comme en milieu standard, un effet inotrope négatif. L'amplitude de la contraction diminue, tandis qu'il n'est pas observé de modification de l'activité électrique.

Le PK11195 s'oppose aux effets dépresseurs du vérapamil sur le potentiel d'action et sur l'amplitude de la contraction. Il minimise en effet de façon significative la diminution de la DPA50 et de la DPA90 induites par le vérapamil. Son effet au niveau de la V_{max} est à la limite de la signification.

Quant à la réduction par le PK11195 des effets inotropes négatifs du vérapamil ($3.10^{-7}M$), elle est à la limite de signification après 60 minutes de perfusion du vérapamil. Cependant il faut noter qu'à la 30ème minute, l'effet du PK11195 était plus manifeste et significatif.

Comme en milieu standard, le PK11195 ne s'oppose pas, en milieu hyperpotassique aux effets inhibiteurs de la nifédipine ni sur les potentiels d'action ni sur l'amplitude de la contraction. On observe seulement un effet antagoniste significatif sur la diminution de l'amplitude du PA. Par contre, le PK11195 atténue les effets du BAY K 8644 sur la durée du PA et la contraction. Cet effet antagoniste s'exerce davantage au niveau de la force contractile puisque la réduction des effets inotropes positifs du BAY K 8644 sont très significatifs. Par contre il n'est observé aucune modification dans l'évolution de l'amplitude du PA ni de la V_{max} .

L'absence d'effet antagoniste du PK11195 vis-à-vis de la nifédipine est surprenant dans la mesure où le PK11195 montre un effet antagoniste manifeste vis-à-vis du vérapamil, mais surtout vis-à-vis d'une autre dihydropyridine (bien qu'agoniste) le BAY K 8644. Par ailleurs, MESTRE et al. (1985) rapportent un effet antagoniste du PK11195 vis-à-vis de l'effet de la nitrendipine, un analogue de la nifédipine.

Cependant, nos résultats vont dans le sens d'un effet du PK11195 sur les

canaux calciques.

Ainsi, pour approfondir l'étude des effets du PK11195 au niveau des canaux calciques, il est apparu intéressant d'examiner son interaction dans une situation particulière : lors de l'obtention d'une contraction biphasique permettant ainsi indirectement d'appréhender les modifications sur les deux types de courants calciques : le courant calcique rapide et le courant calcique lent (HONORE et al., 1986a).

III - CELLULES DEPOLARISEES (17 mM).

1) Effets du PK11195 (figure 23)

La figure 23 montre l'effet de concentrations croissantes de PK11195 sur les 2 composantes P1 et P2 de la contraction biphasique dans les mêmes conditions de temps et de dilution en comparaison avec l'effet du solvant du PK11195.

Le PK11195 semble diminuer l'amplitude de contraction. Ainsi à la concentration de 1.10^{-5} M, l'amplitude de la première composante de contraction ainsi que celle de la seconde diminuent de façon très marquée.

Comme le montre la figure 23, le PK11195 exerce un effet inotrope négatif propre aussi bien sur la 1ère que sur la 2de composante de contraction.

2) Effets de 3.10^{-6} M de PK11195 sur la contraction biphasique en milieu modifié.

Pour confirmer cet effet du PK11195, les effets sont étudiés en présence de tétraéthylammonium (TEA) à la concentration de 5 mM. En effet, le TEA a pour effet de prolonger la durée du potentiel d'action en bloquant le courant sortant potassique retardé, cela permet ainsi de mieux séparer la seconde composante de contraction de la première. Dans cette situation expérimentale, la concentration en isoprotérénol est de 3.10^{-8} M.

Comme en donne un exemple la figure 24, le PK11195 à la concentration de 3.10^{-6} M diminue significativement l'amplitude de la seconde composante de contraction de $34,6 \pm 2,7\%$ en moyenne, alors que la première composante n'est abaissée que de $20,9 \pm 1,0\%$.

Il ressort de ces résultats que le PK11195 semble bien exercer un effet inotrope négatif, plus marqué sur la seconde composante de contraction

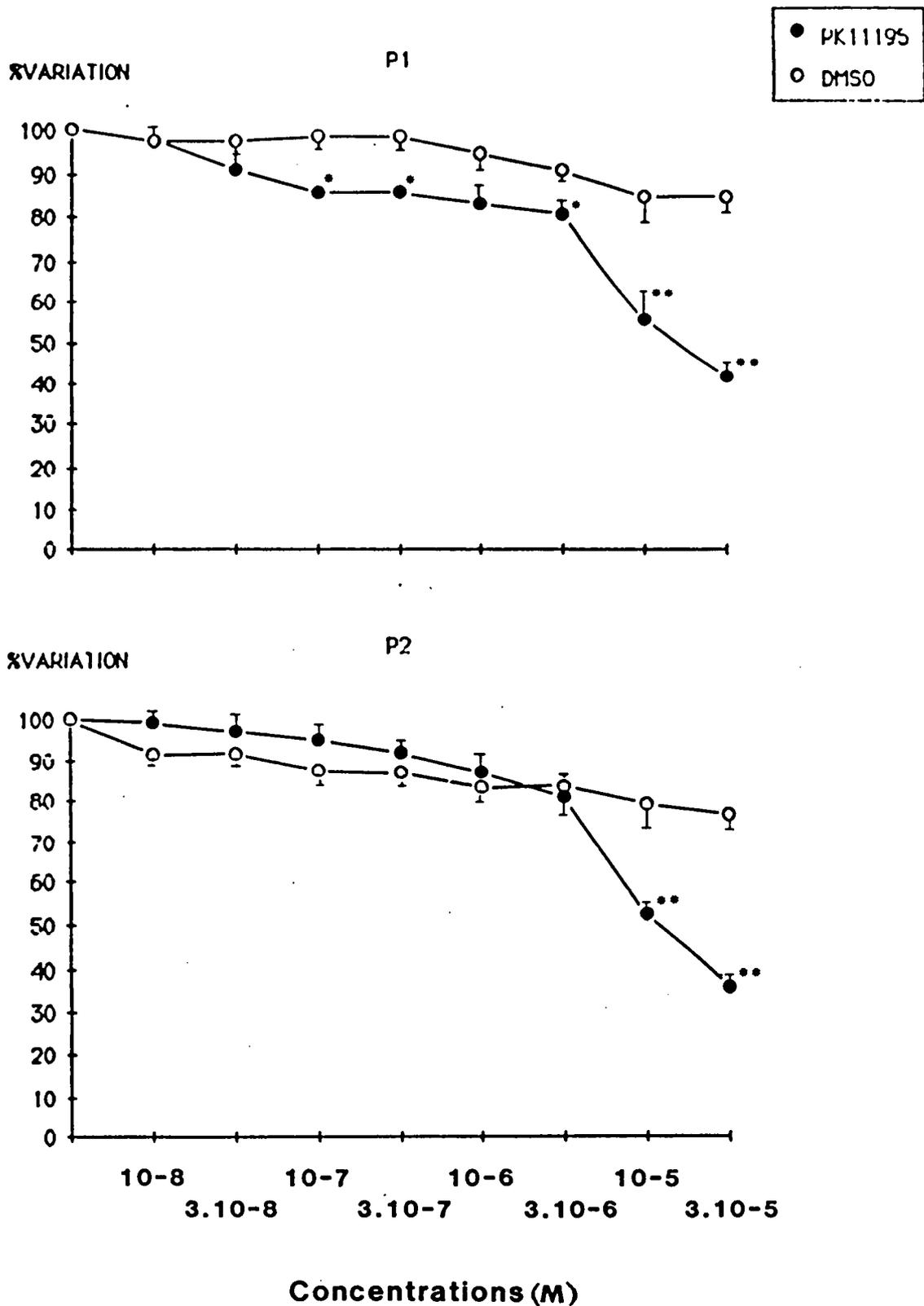


Figure 23 : Effets de concentrations cumulées de PK11195 en milieu dépolarisant ($K^+ = 17 \text{ mM}$, Isoprotérénol = 1.10^{-6}M) sur les deux composantes de la contraction biphasique du muscle papillaire de cobaye.

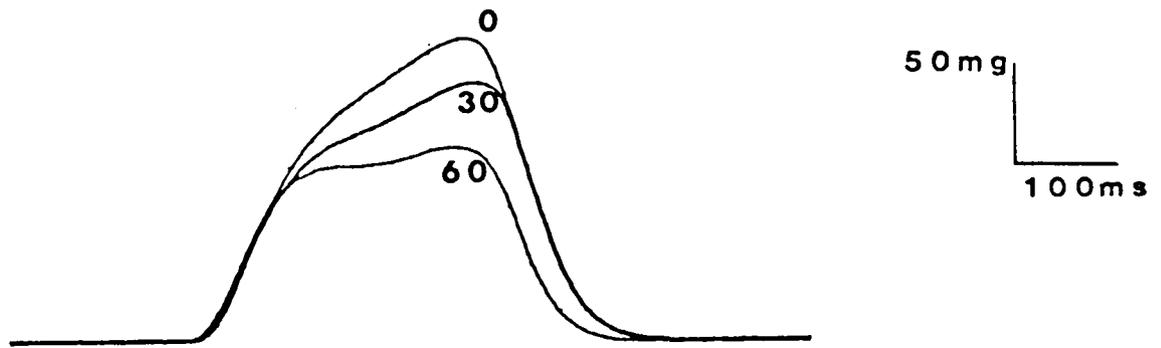


Figure 24 : Exemple de l'effet du PK11195 ($3 \cdot 10^{-6}M$) sur les deux composantes de contraction en milieu dépolarisant modifié ($K^+ = 17 \text{ mM}$, Isoprotérénol = $3 \cdot 10^{-8}M$, TEA = 5 mM) après 30 et 60 minutes.

que sur la première, c'est-à-dire sur le courant entrant lent de Ca^{2+} . dans le cas de l'expérience précédente (figure 23) la briéveté du PA empêchant le plein développement du courant entrant lent avait pour conséquence de réduire l'amplitude de la seconde composante de contraction.

IV - CELLULES "ISCHEMIEES".

A) Effets de l'ischémie (n = 10)

Le résumé des effets électrophysiologiques de l'ischémie sont donnés dans le tableau IV et les modifications du PA dans la figure 25.

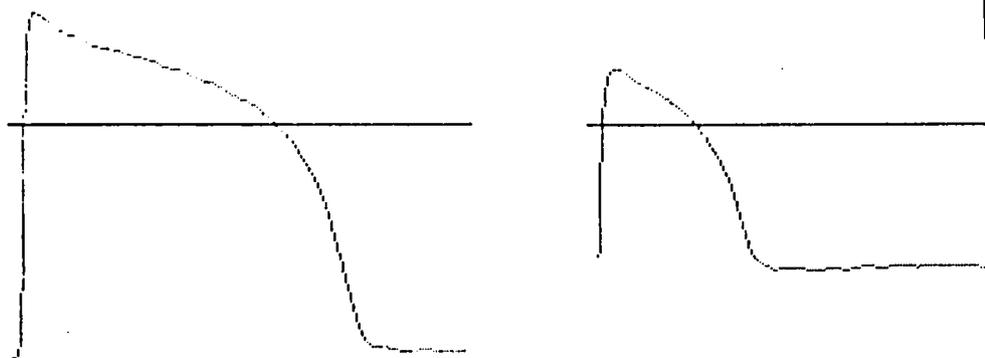
L'ischémie entraîne une dépolarisation membranaire, une diminution de l'amplitude des potentiels d'action et de la vitesse maximale de dépolarisation, ainsi que les DPA50 et DPA90. Pendant 12 minutes en moyenne, les préparations répondent à chaque stimulation. Après ce temps, certaines (5 sur 10) deviennent définitivement inexcitables, les autres continuent de répondre à des trains de stimuli de forte intensité (11 mA). Comme le montre la figure 26, les réponses obtenues présentent un aspect de type décrementiel avec une très faible vitesse de dépolarisation. Cette activité électrique cesse à partir du 5ème ou du 6ème stimulus. Ces réponses décrementielles persistent en moyenne pendant 20 minutes. Après 32 minutes, les préparations deviennent définitivement inexcitables.

Lors de la reperfusion une seule préparation sur 10 récupère une activité électrique, son potentiel d'action enregistré est très court et présente un aspect de "spike" (figure 25).

La figure 34 représente la libération de CK en situation contrôle et en ischémie expérimentale. Dès la 15ème minute d'ischémie, la libération de CK est plus forte en "ischémie" que dans la situation contrôle. Le seuil de signification est atteint à la 45ème minute. A la fin de l'ischémie, la libération de CK atteint 79 ± 10 UI/g, alors qu'elle n'est que de 14 ± 4 UI/g en situation physiologique contrôle.

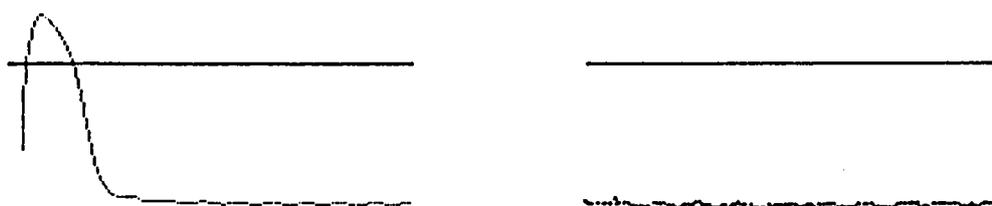
La libération de CK se maintient à un niveau élevé au cours des 30 minutes de reperfusion ; en effet, elle est de $28,2 \pm 9,1$ UI/g pendant les 30

15 mV
40.00 ms



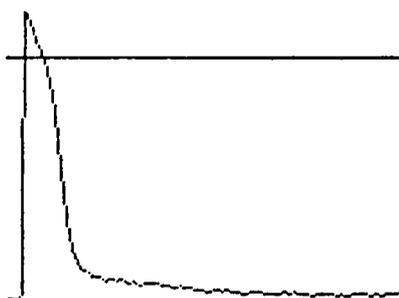
STABILISATION

ISCHEMIE 5min



ISCHEMIE 10min

ISCHEMIE 15min



REPERFUSION

Figure 25 : Exemple des effets de l'ischémie et de la reperfusion sur l'activité électrique de cellules myocardiques de ventricule gauche de cobaye.

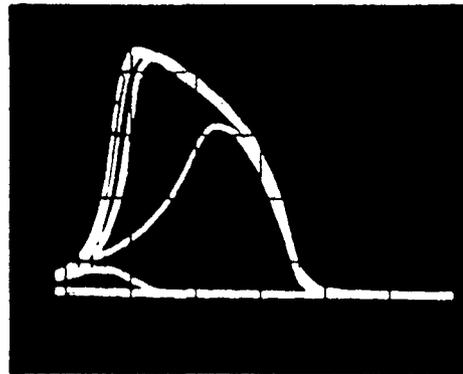
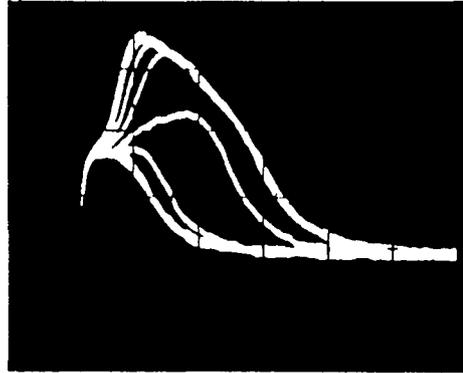


Figure 26 : Deux exemples d'activités décrementielles enregistrées après 23 min et 17 min respectivement en situation d'ischémie.

- moyenne (-)erreur standard à la moyenne	Em (mV)	. APA (mV)	Vmax (V/s)	DPA 50 (ms)	DPA 90 (ms)
Stabilisation	79,11 (1,51)	105,70 (3,48)	144,20 (12,22)	109,50 10,22	148,80 (11,56)
Ischémie 5 min	54,80 (1,57)	58,85 (5,53)	35,00 (12,19)	47,74 (8,29)	68,37 (9,27)
15 min	54,80 (2,81)	38,20 (11,47)	7,00 (7)	52,00 (19,69)	70,40 (22,60)
30 min	54,00 (2,34)	41,60 (13,74)	2,80 (1,71)	72,20 (24,70)	84,80 (26,72)
45 min	52,75 (2,17)	59,00 (8,31)	1,75 (1,75)	49,25 (25,66)	66,25 (28,03)
60 min	57,00 (1,52)	37,00 (13,89)	9,33 (9,33)	29,00 (9,50)	61,66 518,55

	Em (mV)	APA (mV)	Vmax (V/s)	DPA 50 (ms)	DPA 90 (ms)
Reperfusion 15 min	74,00	80,00	154,00	19,00	19,00
30 min	74,00	80,00	154,00	19,00	19,00

Tableau IV : Evolution des paramètres électriques des potentiels d'action pendant l'ischémie et à la reperfusion (série témoin). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de leur erreur standard indiquée entre parenthèses.

minutes de reperfusion alors qu'elle n'était que de $3,8 \pm 1,4$ UI/g dans les conditions standard.

La diminution du débit de perfusion de 4 ml. min^{-1} à $0,15 \text{ ml. min}^{-1}$ ne modifiant pas l'électrogénèse en situation standard accélère par contre considérablement sa dégradation lors de l'ischémie.

La libération des CK augmente considérablement pendant l'ischémie et la reperfusion ce qui témoigne d'une atteinte métabolique sévère confirmée par la non reprise d'une électrogénèse satisfaisante pendant la reperfusion.

B) Effets du PK11195 (n = 5) (Tableau V, VI)

Le PK11195 ne modifie pas les paramètres électriques du potentiel d'action à l'issue des 3 heures de stabilisation (figure 27, Tableau VII-A)

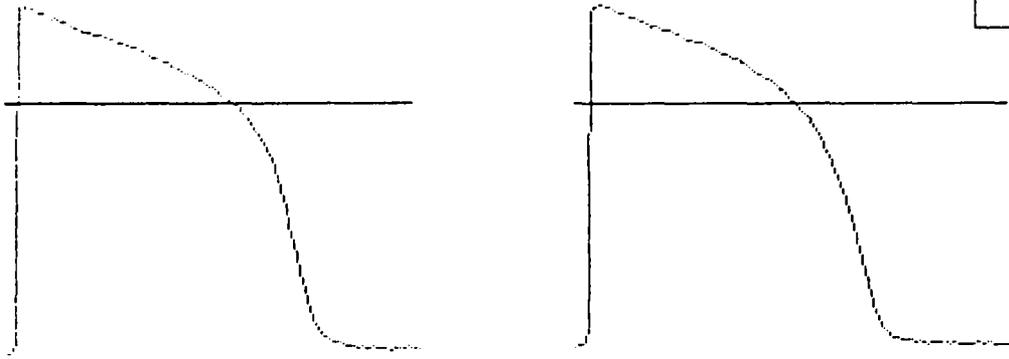
Pendant l'ischémie on observe que dans toutes les préparations, l'inexcitabilité survient vers la 5ème minute (figure 27, Tableaux VII-A, C). Aucune activité décrémenteille n'a pu être enregistrée.

A la reperfusion, toutes les préparations ont recouvré une excitabilité (figure 33-B, tableau VII-C). Cependant le potentiel d'action ne retrouve pas son déroulé contrôlé et présente des durées de potentiel d'action mesurées à tous les niveaux de repolarisation très inhomogènes. Certains potentiels d'action possèdent un petit plateau "calcique" et d'autres en sont dépourvus (figure 27)

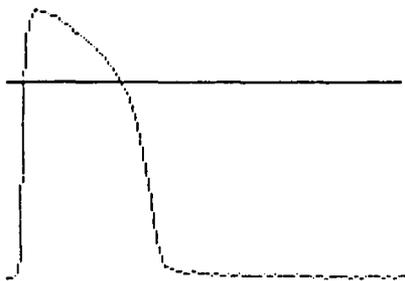
La fuite enzymatique n'est pas modifiée par le PK11195 à la concentration de 3.10^{-6}M et évolue donc de façon identique à celle de l'ischémie témoin. A l'issue des 120 minutes d'ischémie la fuite des CK atteint $73,1 \pm 8,8$ UI/g (figure 35, tableau VIII).

Pendant les 30 minutes de reperfusion, la fuite des CK est accentuée ($74,1 \pm 15,7$ UI/g) par rapport à la reperfusion en série témoin ($28,2 \pm 9,1$ UI/g) (figure 35).

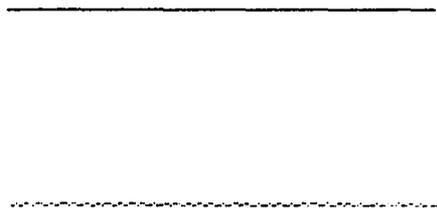
15 mV
40.000 ms



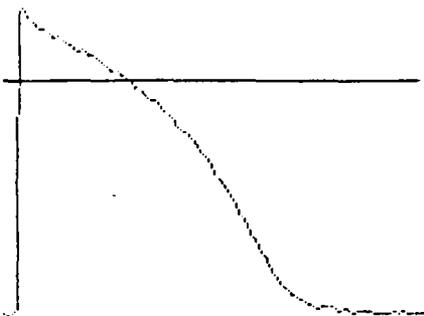
STABILISATION



ISCHEMIE 5min



ISCHEMIE 10min



REPERFUSION

Figure 27 : Exemple de l'effet du PK11195 ($3 \cdot 10^{-6}M$) sur l'activité électrique de cellules myocardiques de ventricule gauche de cobaye en situation d'ischémie et à la reperfusion.

En résumé, il semble que le PK11195 ne manifeste aucun effet protecteur sur la fuite enzymatique pendant l'ischémie. La perte d'excitabilité précoce ne semble pas en relation avec la protection enzymatique. Bien que la fuite enzymatique soit accentuée lors de la reperfusion, la récupération de l'excitabilité est bien supérieure (100%) à celle qui est observée en série "ischémie" témoin (figure 33-B).

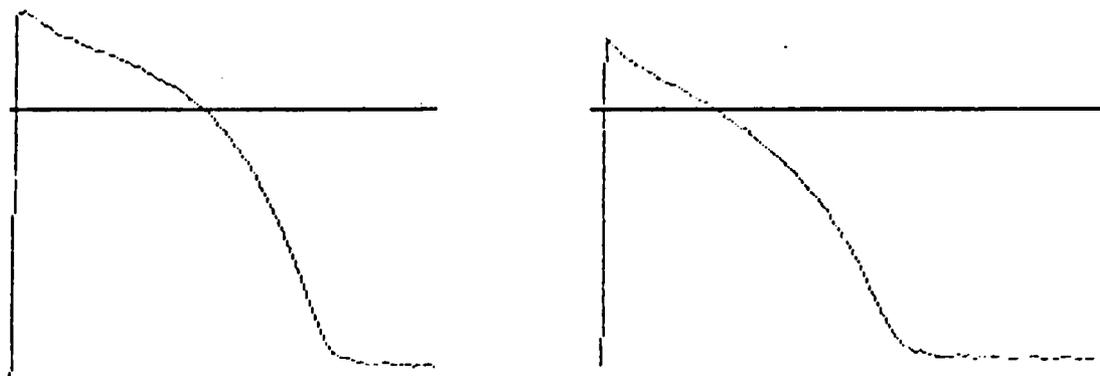
C) Effets du vérapamil (n = 7), (figure 28)

Le vérapamil est étudié à la concentration de $1.10^{-5}M$. Pendant la stabilisation, le vérapamil entraîne un raccourcissement de la durée des potentiels d'action. En fin d'épreuve la diminution de la DPA50 est de $23,8 \pm 5,1$ ms et celle de la DPA90 de $18 \pm 0,7$ ms, la vitesse maximale de dépolarisation diminuant de 17 V/s.

Pendant l'ischémie, est observé le même type de modifications des paramètres électriques que dans la série ischémie témoin (tableau V). La réponse électrique 1/1 (coup pour coup) à la stimulation cesse avant la 7ème minute. Cependant deux préparations ont maintenu une activité décrémenteille jusqu'à la 10ème minute, et 2 autres jusqu'à la 25ème minute et 1 jusqu'à la 35ème minute (figures 31 et 32, tableau VII-C).

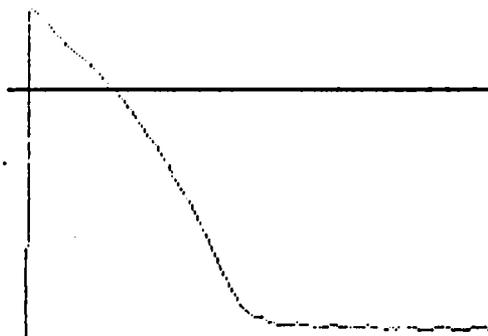
A la reperfusion 6 préparations sur 7 ont retrouvé une activité électrique (figure 28, tableau VI, VII-C) mais la durée des PA demeure brève à tous les niveaux de la repolarisation par exemple la DPA90 n'est que de 37 ms en moyenne.

Dès la 15ème minute d'ischémie, la libération des CK (figure 35, tableau VIII) est plus faible que dans la série "ischémie" témoin. Cette moindre libération de CK est significative dès la 30ème minute. A l'issue de l'ischémie, la libération des CK atteint la valeur de $40,7 \pm 5,9$ UI/g. Ainsi



STABILISATION

10 mV
400 msec



REPERFUSION

Figure 28 : Exemple de l'effet du vérapamil ($1.10^{-5}M$) pendant la stabilisation et à la reperfusion sur des cellules myocardiques de ventricule gauche de cobaye.

Le vérapamil diminue significativement la libération des CK pendant l'ischémie.

Le vérapamil à la concentration de $1.10^{-5}M$ exerce un effet cardioprotecteur sur les cellules soumises à une ischémie expérimentale.

Il a été montré que les inhibiteurs du canal lent de Ca^{2+} comme le diltiazem, le vérapamil et la nicardipine (DURIEZ et al., 1984) diminuent la fuite enzymatique. A la reperfusion, seul le vérapamil également limitait la fuite enzymatique.

Le mécanisme cardioprotecteur des inhibiteurs du canal lent n'est cependant pas clarifié. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : une diminution de la surcharge calcique pendant l'ischémie, une diminution de l'inotropisme donc de la consommation d'énergie, une amélioration de la perfusion coronaire dans la zone ischémiée et de ce fait la préservation des réserves en ATP. En effet, le maintien de la structure membranaire (BRICKNELL et OPIE, 1978) et d'une électrogénèse satisfaisante pendant l'hypoxie (Mc DONALD et al., 1971) dépendraient d'un pool d'ATP glycolytique.

En présence de vérapamil ($1.10^{-5}M$), l'activité électrique disparaît plus précocément qu'en situation "ischémie" témoin ; cela peut être lié à la diminution de la conductance sodique rapide qu'induit le vérapamil à cette forte concentration (GAUTIER, 1980). En comparant la série vérapamil à la série témoin, il pourrait être suggéré que la perte rapide de l'excitabilité en ischémie limitant la fuite enzymatique des CK protège les cellules ischémiées ; cependant, cette hypothèse ne peut être retenue puisque DURIEZ et al. (1983) ont montré qu'en présence d'un bêta-bloqueur, le propranolol, l'inexcitabilité survient dans les 5 minutes suivant l'installation de l'ischémie sans qu'aucune protection enzymatique ne soit observée.

D) Influence des effets du PK11195 sur l'effet cardioprotecteur du vérapamil
: (n = 5), (figure 29, tableaux V, VI)

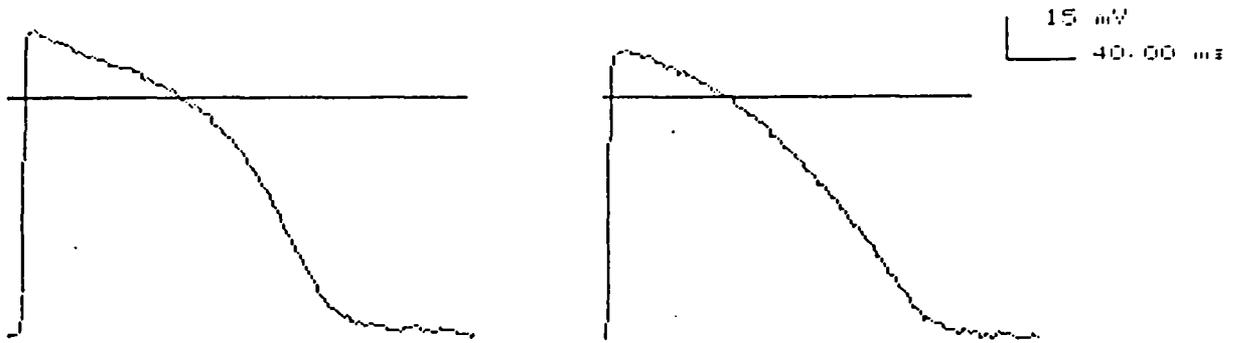
Pendant la stabilisation (figure 29, tableau VII-B), l'effet dépresseur du vérapamil est antagonisé par le prétraitement au PK11195. Ainsi la diminution de la DPA50 obtenue sous l'influence du vérapamil ($-23 \pm 5,1\%$) n'est que de $-5,1 \pm 0,9\%$ après prétraitement par le PK11195. La DPA90 n'est plus diminuée, alors qu'elle s'abaisse de $-12,2 \pm 0,7\%$ en présence de vérapamil seul.

En ischémie l'activité électrique cesse dans les 5 minutes qui suivent l'installation de l'ischémie dans toutes les préparations. On n'observe pas de réponse décrémenteielle (tableau VII-A).

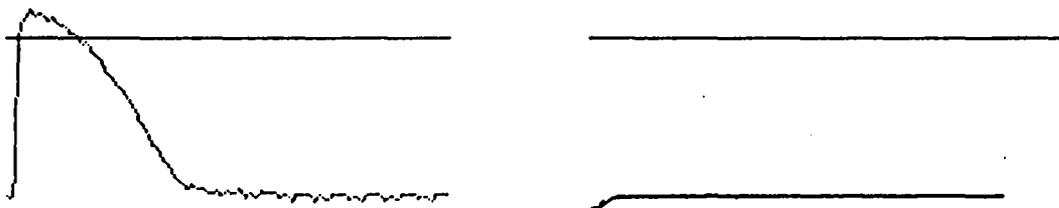
A l'issue des 120 minutes d'ischémie, la libération des CK est de $75,5 \pm 6,4$ UI/g, semblable à celle de l'ischémie témoin qui est de $79,8 \pm 10,3$ UI/g (figure 35).

A la reperfusion, toutes les préparations retrouvent une activité électrique (figure 33-B, tableau VII-C). Les potentiels d'action enregistrés recouvrent une durée proche de celle enregistrée lors de la situation contrôle (figures 31 et 32).

A la fin de la reperfusion, la fuite enzymatique est de $33,6 \pm 7,6$ UI/g, peu différente de celle observée dans la série ischémie témoin.

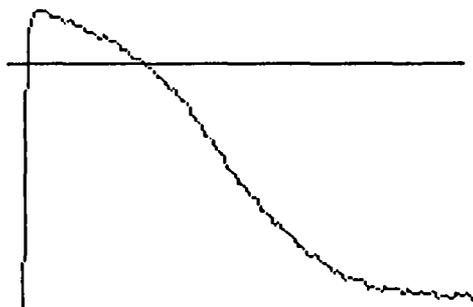


STABILISATION



ISCHEMIE 5min

ISCHEMIE 10min



REPERFUSION

Figure 29 : Exemple de l'effet de l'influence du PK11195 ($3 \cdot 10^{-6}M$) sur les effets du vérapamil ($1 \cdot 10^{-5}M$) sur des cellules myocardiques de ventricule gauche de cobaye en ischémie et à la reperfusion.

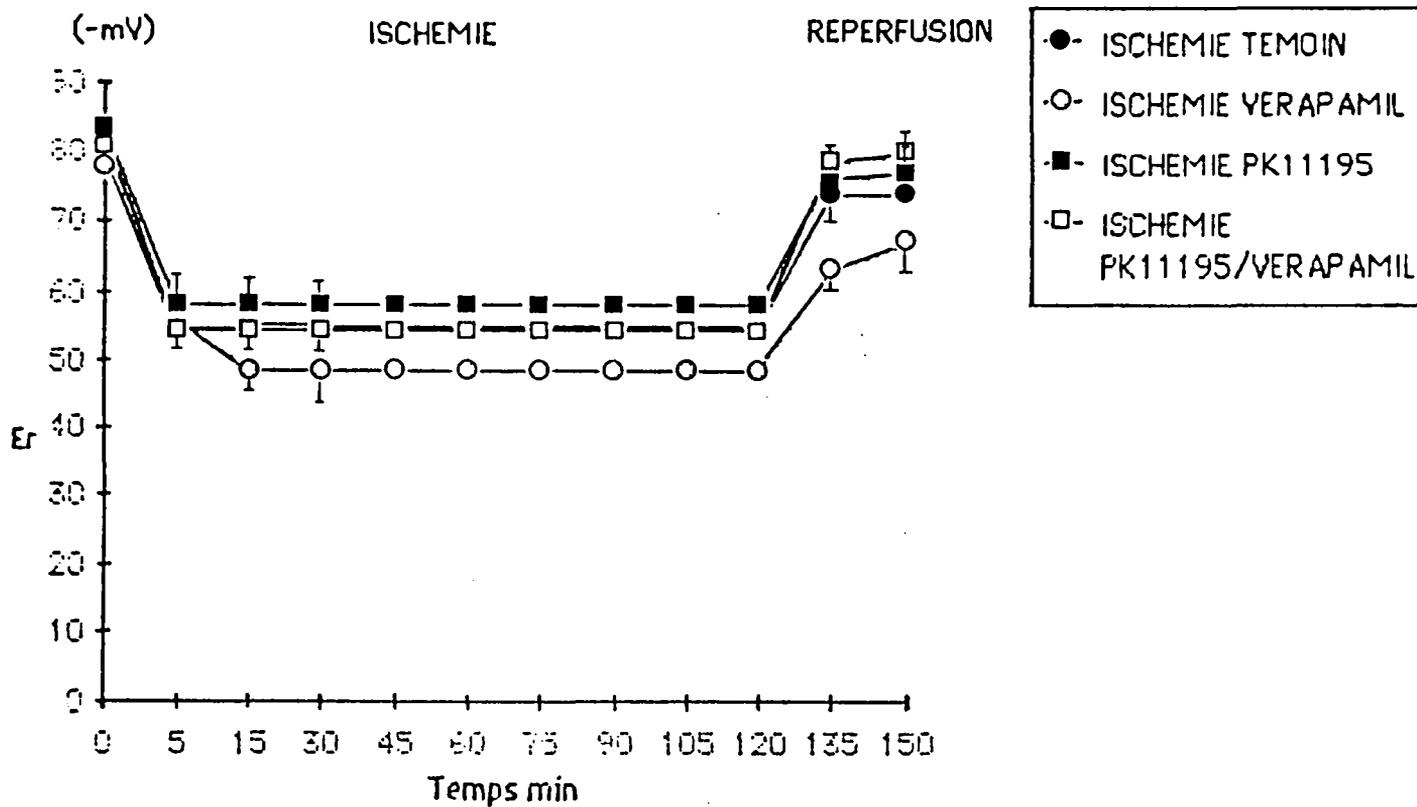
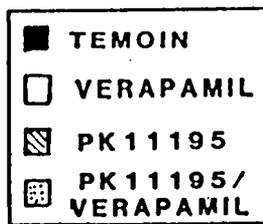
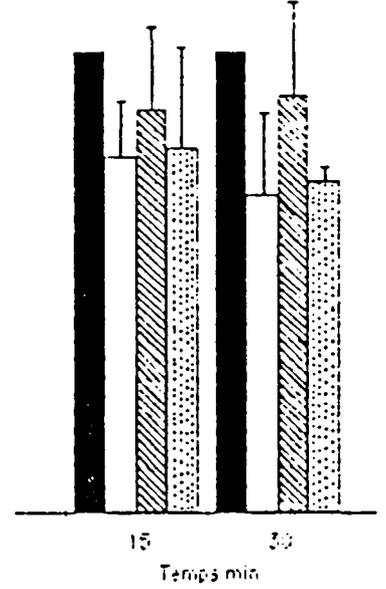
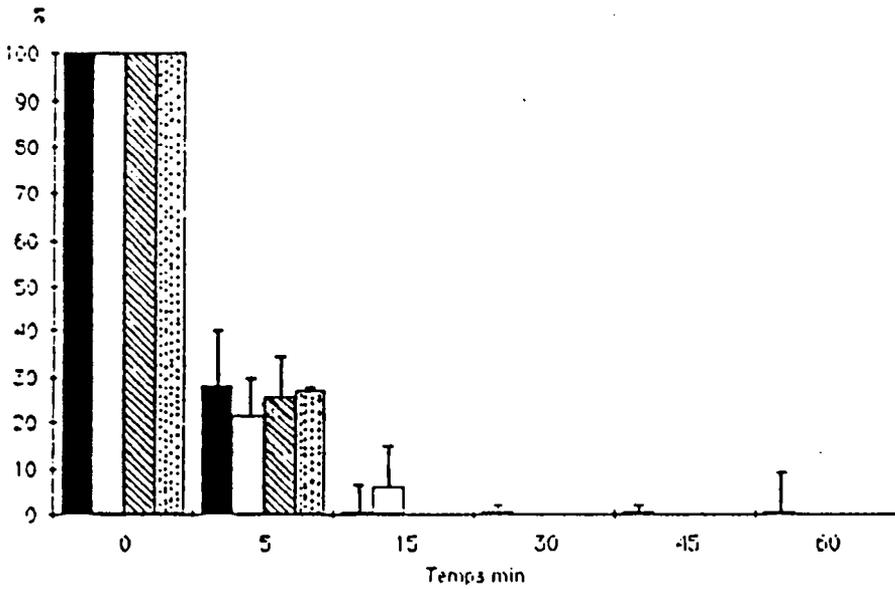


Figure 30 : Evolution du potentiel de repos membranaire (Er) pendant l'ischémie et à la reperfusion en absence et en présence de vérapamil seul, de PK11195 seul et de l'association de PK11195/vérapamil.

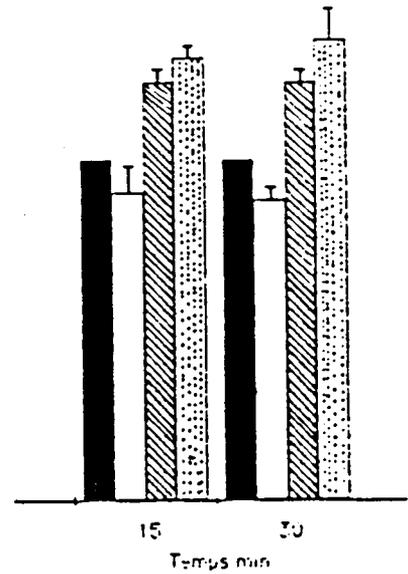
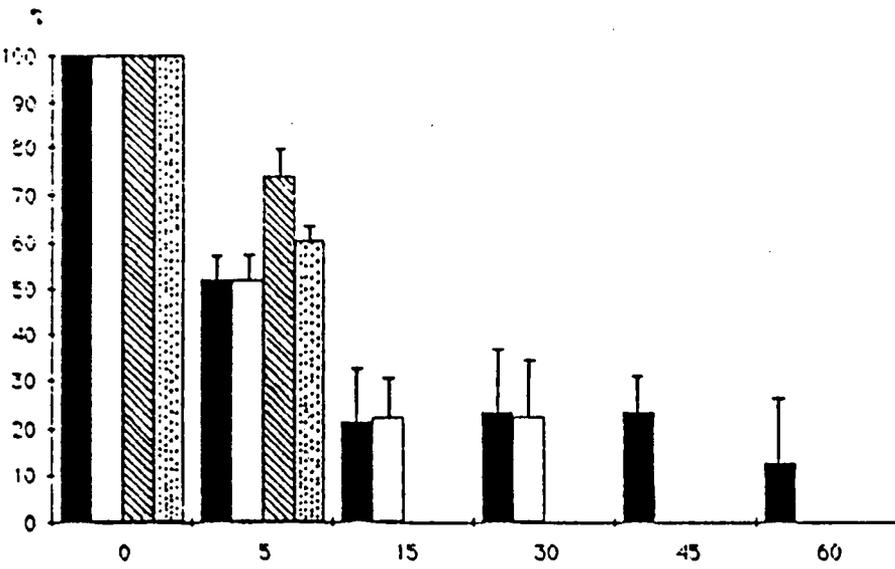


ISCHEMIE

REPERFUSION



Vmax



APA

Figure 31 : Evolution comparée de la vitesse maximale de dépolarisation (A) et de l'amplitude du potentiel d'action (B) pendant l'ischémie et à la reperfusion en absence et en présence de vérapamil seul, de PK11195 seul et de l'association PK11195/vérapamil.

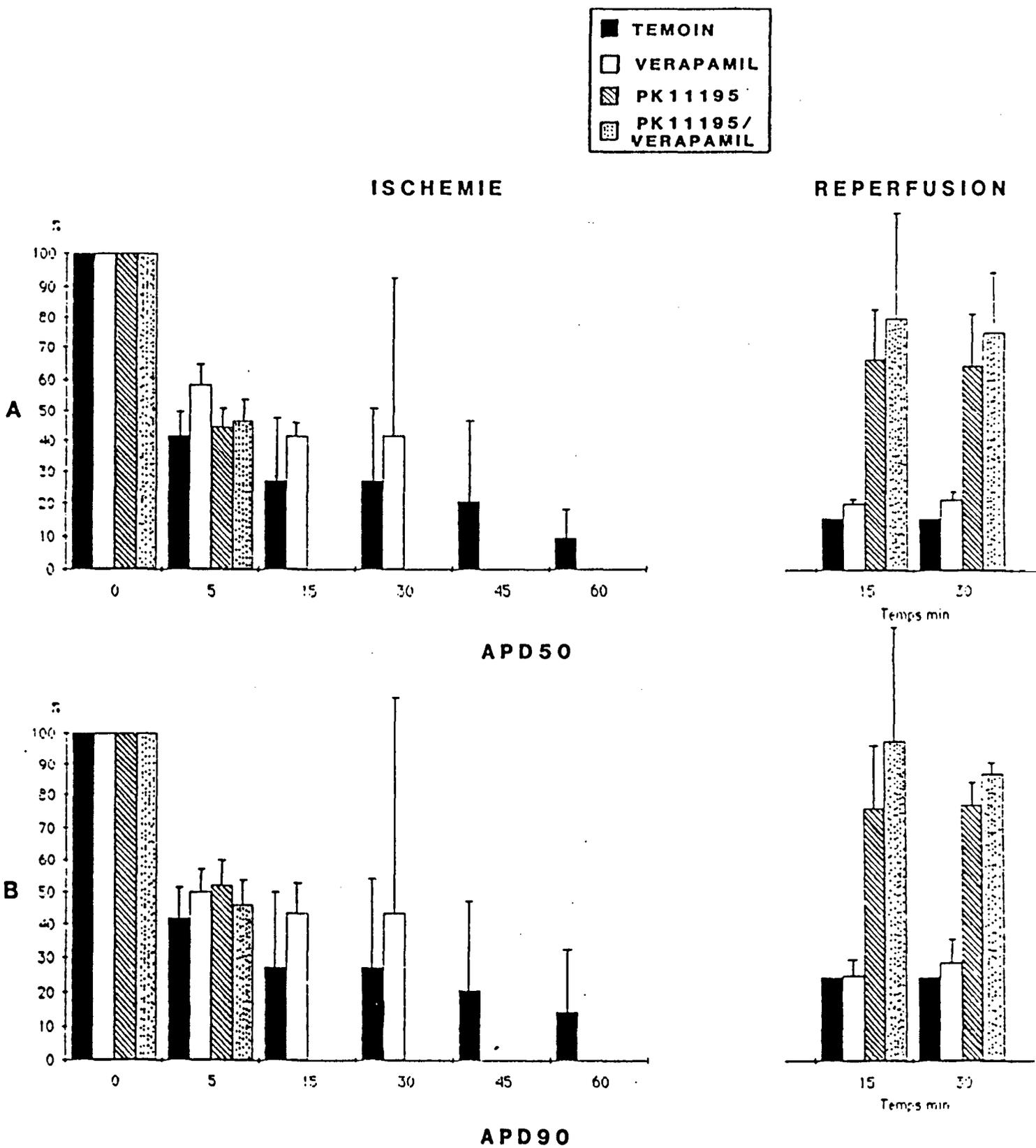
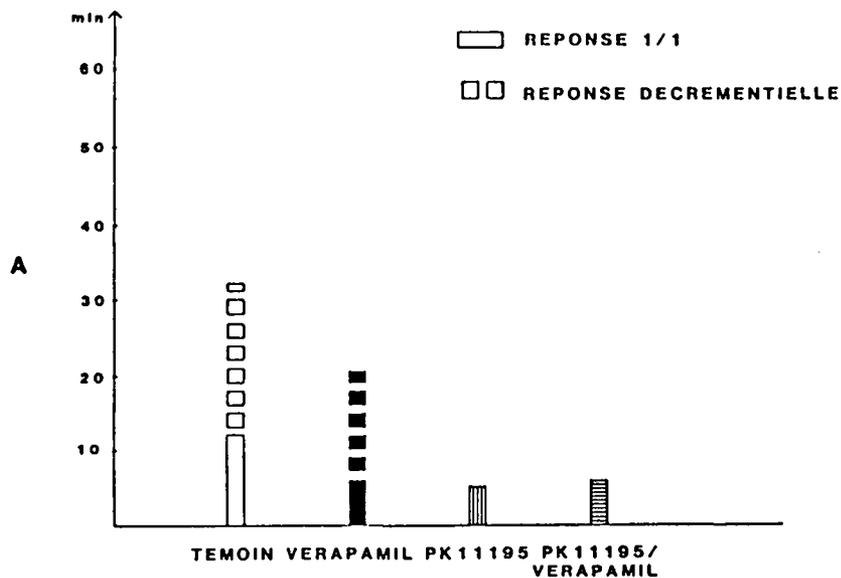


Figure 32 : Evolution comparée de la durée à 50% (A) et à 90% de la repolarisation (B) pendant l'ischémie et à la reperfusion en absence et en présence de vérapamil seul, de PK11195 seul et de l'association PK11195/vérapamil.



**PERSISTANCE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE
PENDANT L'ISCHEMIE**

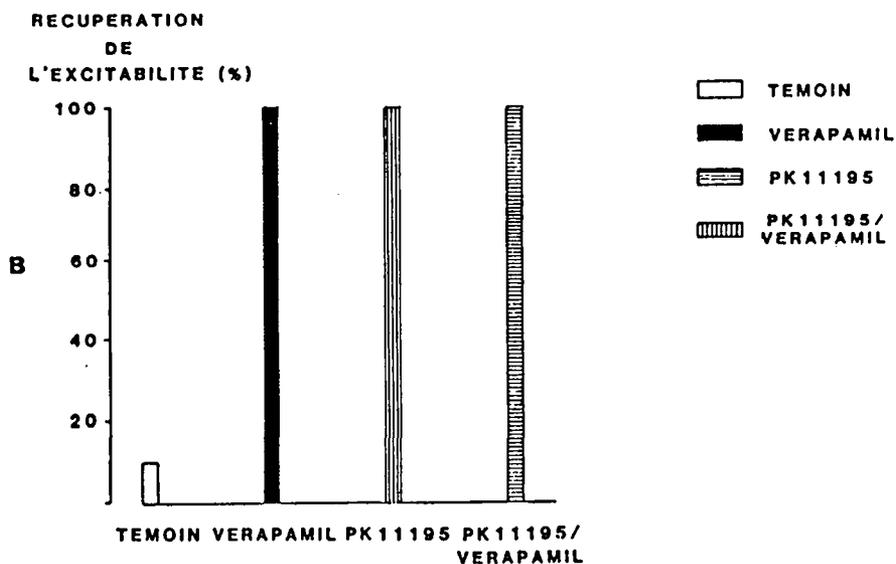


Figure 33 : A - Persistance de l'activité électrique pendant l'ischémie témoin seule et en présence de vérapamil seul, de PK11195 seul et de l'association PK11195/vérapamil.

B - Fréquence de récupération d'une activité électrique à la reperfusion seule et en présence du vérapamil seul, du PK11195 seul et de l'association PK11195/vérapamil.

t 5min	"ISCHEMIE"	"ISCHEMIE" VERAPAMIL 10-5M	"ISCHEMIE" PK 11195,3.10-6M	"ISCHEMIE" PK/VERAP
Em mV	54,8±1,6	55,8 ± 1,3	58,0 ± 2,8	54,0 ± 2,0
APA mV	58,8±5,5	51,8 ± 5,7	84,7 ± 6,2	63,7 ± 3,4
DPA 50 msec	47,7±8,3	46,8 ± 5,5	48,3 ± 6,1	65,0 ± 6,7
DPA 90 msec	68,4±9,3	64,7 ± 7,2	71,8 ± 8,4	86,7 ± 7,9
Vmax V/s	35± 12,2	30,3 ± 8,8	36,5 ± 9,1	27,0 ± 0,6

t 15min	"ISCHEMIE"	"ISCHEMIE" VERAPAMIL 10-5M	"ISCHEMIE" PK 11195,3.10-6M	"ISCHEMIE" PK/VERAP
Em mV	54,8±1,6	55,8 ± 1,3	58,0 ± 2,8	54,0 ± 2,0
APA mV	38,2 ± 11,5	22,2 ± 8,7		
DPA 50 msec	52,0±20	33,2 ± 4,6		
DPA 90 msec	70,4 ± 22,6	56,5 ± 9,4		
Vmax V/s	7,0±7,0	30,3 ± 8,8		

t 30min	"ISCHEMIE"	"ISCHEMIE" VERAPAMIL 10-5M	"ISCHEMIE" PK 11195,3.10-6M	"ISCHEMIE" PK/VERAP
Em mV	54,0±2,3	48,5 ± 3,5		
APA mV	41,6±13,7	56,5 ± 11,9		
DPA 50 msec	72,2±24,3	73,0 ± 55,0		
DPA 90 msec	84,8±26,7	100,0 ± 70,0		
Vmax V/s	2,8±1,7	2		

t 45min	"ISCHEMIE"	"ISCHEMIE" VERAPAMIL 10-5M	"ISCHEMIE" PK 11195,3.10-6M	"ISCHEMIE" PK/VERAP
Em mV	52,7±2,2			
APA mV	59,0±8,3			
DPA 50 msec	49,2 ± 25,7			
DPA 90 msec	66,2±28,0			
Vmax V/s	1,7± 1,7			

t 60min	"ISCHEMIE"	"ISCHEMIE" VERAPAMIL 10-5M	"ISCHEMIE" PK 11195,3.10-6M	"ISCHEMIE" PK/VERAP
Em mV	57,0±1,5			
APA mV	37,0±11,9			
DPA 50 msec	29,0±9,5			
DPA 90 msec	61,7±18,6			
Vmax V/s	9,3±9,3			

Tableau V : Evolution des paramètres électriques des potentiels d'action pendant l'ischémie témoin, exprimés en pourcentages de la valeur contrôle affectés de leur erreur standard et en présence du vérapamil seul, du PK11195 seul et de l'association PK11195/vérapamil.

t 15min	"ISCHEMIE"	"ISCHEMIE" VERAPAMIL 10-5M	"ISCHEMIE" PK11195.3.10-6M	"ISCHEMIE" PK/VERAP
Em mV	74,0	63,3 ± 1,6	76,4 ± 2,7	78,7 ± 0,9
APA mV	80,0	65,2 ± 5,7	101,3 ± 3,2	99,3 ± 2,4
DPA 50 msec	19,0	16,6 ± 2,5	72,5 ± 18,2	112,3 ± 31,2
DPA 90 msec	39,0	32,1 ± 5,1	105,5 ± 20,4	181,7 ± 44,7
Vmax V/s	154,0	110,4 ± 12,8	123,3 ± 18,8	78,7 ± 22,3

t 30min	"ISCHEMIE"	"ISCHEMIE" VERAPAMIL 10-5M	"ISCHEMIE" PK11195.3.10-6M	"ISCHEMIE" PK/VERAP
Em mV	74,0	67,0 ± 2,9	77,1 ± 2,8	80,0 ± 1
APA mV	80,0	63,7 ± 2,9	101,4 ± 3,1	103,0 ± 7
DPA 50 msec	19,0	18,0 ± 2,9	70,5 ± 17,7	106,0 ± 19
DPA 90 msec	39,0	37,5 ± 7,1	107,0 ± 7,1	162,0 ± 3,5
Vmax V/s	154,0	97,1 ± 19,9	127,6 ± 21	71,5 ± 3,5

Tableau VI : Evolution des paramètres électriques des potentiels d'action à la reperfusion témoin, exprimés en pourcentages de la valeur contrôle affectés de leur erreur standard et en présence du vérapamil seul, du PK11195 seul et de l'association PK11195/vérapamil.

	ISCHEMIE	VERAPAMIL 10-5M	PK11195 3.10-6M	PK11195/ VERAPAMIL
Réponse 1/1 min	12,1 ± 2,56	5,57 ± 0,37	5 ± 0	5,75 ± 0,75
Réponse déc rémentielle	20 ± 7,34	15 ± 5,12	0	0
Total min	32,1 ± 7,53	20,57 ± 5,4	5 ± 0	5,75 ± 0,75

A

	n	Em mV	APA mV	Vmax V/s	APD50 ms	APD90 ms
Témoin VERAPAMIL	7	80(1) 78(2)	102(1) 100(2)	159(13) 142(3)	104(1) 80(10)	148(15) 130(15)
Témoin PK11195	10	84,6(0,8) 84,4(0,6)	121,2(2,2) 121,5(2,3)	145,5(9,9) 133(10,5)	113(1,9) 117,6(8,5)	143,6(2,4) 149,8(6)
Témoin PK11195/ VERAPAMIL	5	80(1) 80(0)	109(5) 103(5)	147,5(7,5) 147,5(7,5)	138(1) 131(3)	180(3) 179(1)

B

Temps min	0	5	15	30	45	60	75 - 120	135	150
Témoin ischémie	10	8	5	5	4	3	0	1	1
VERAPAMIL	7	6	5	3	0	0	0	6	6
PK11195 3.10-6M	10	10	0	0	0	0	0	10	10
PK11195/ VERAPAMIL	5	5	0	0	0	0	0	4	4

C

Tableau VII : A - Persistance de l'activité électrique (moyenne ± erreur standard) pendant l'ischémie témoin et sous l'influence du vérapamil seul, du PK11195 seul et de l'association PK11195/vérapamil.

B - Effets du vérapamil seul, du PK11195 seul et de l'association PK11195/vérapamil, sur l'activité électrique des potentiels d'action à l'issue des 180 min de stabilisation (n = nombre d'expériences).

C - Maintien de l'activité électrique pendant l'ischémie et récupération à la reperfusion. Les chiffres représentent le nombre de préparations présentant une activité électrique.

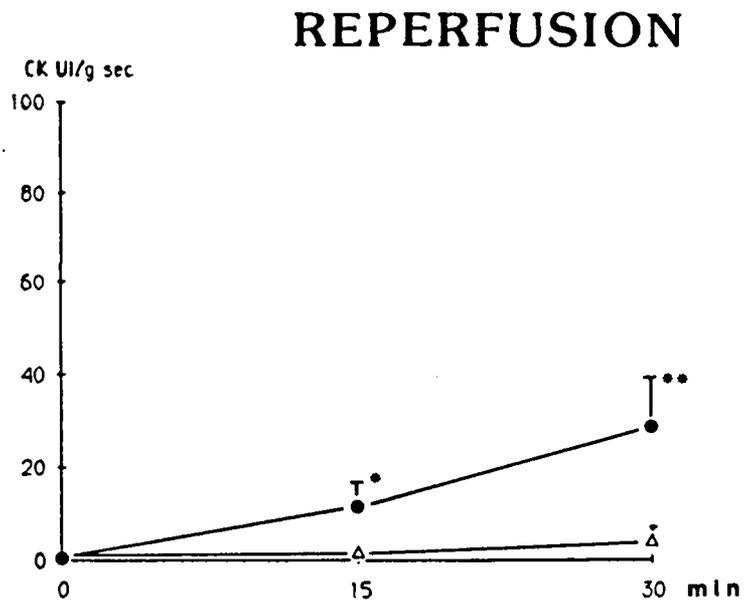
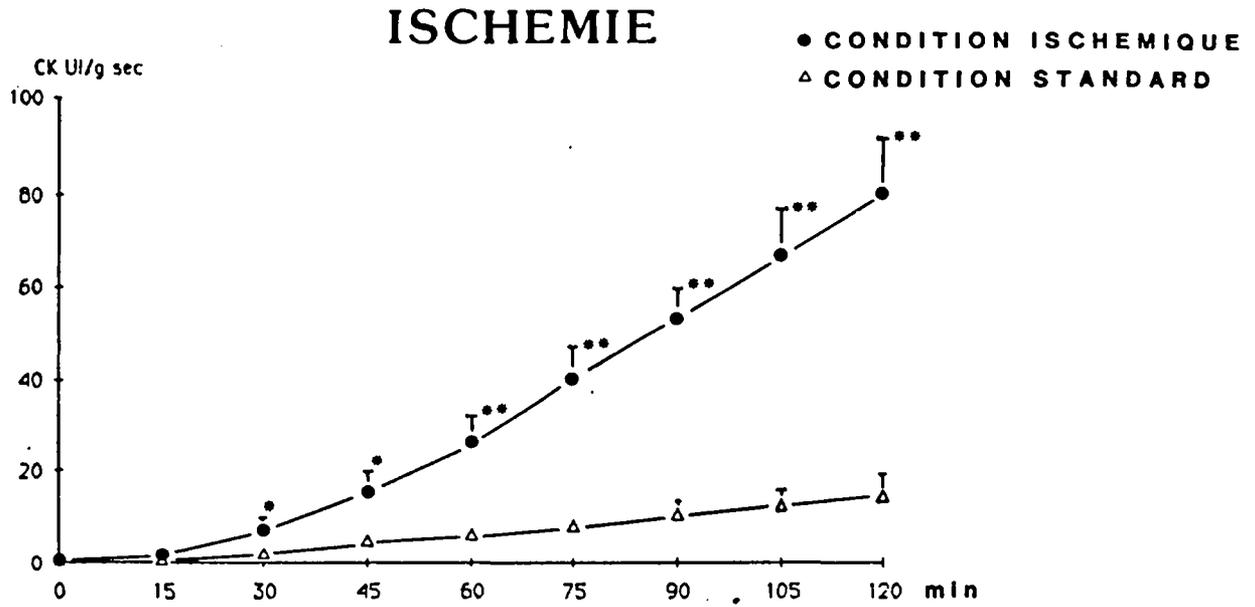


Figure 34 : Libération des Créatine-Kinases pendant l'ischémie et à la reperfusion comparée à celle observée en situation standard.

	"ISCHEMIE"	"ISCHEMIE" VERAPAMIL 10-5M	"ISCHEMIE" PK11195,3.10-6M	"ISCHEMIE" PK/VERAP
n=	10	7	5	5
15min	1,5 ± 0,4	0,6 ± 0,1	2,6 ± 0,7	1,8 ± 0,3
30	7,1 ± 1,5	3,4 ± 0,4	6,9 ± 1,5	6,3 ± 0,3
45	15,1 ± 3,3	7,2 ± 0,9	16,8 ± 3,1	13,8 ± 0,9
60	26,2 ± 4,7	12,8 ± 1,6	25,4 ± 4,2	23,9 ± 1,9
75	40,4 ± 5,7	18,8 ± 2,9	35,9 ± 5,3	35,4 ± 2,9
90	53,0 ± 6,2	26,0 ± 4,2	47,4 ± 6,5	47,9 ± 3,9
105	66,7 ± 8,7	33,1 ± 5,1	59,4 ± 7,8	61,3 ± 5,1
120	79,8 ± 10,3	40,7 ± 5,9	73,1 ± 8,8	75,5 ± 6,4
REPERFUSION				
15	11,1 ± 3,4	2,8 ± 0,5	48,1 ± 13,1	18,2 ± 3,1
30	28,2 ± 9,1	5,2 ± 1,1	74,1 ± 15,7	33,6 ± 7,8

Tableau VIII: Libération des Créatine-Kinases (UI/g sec) pendant l'ischémie et à la reperfusion témoins et en présence de vérapamil seul, de PK11195 seul et de l'association PK11195/vérapamil.

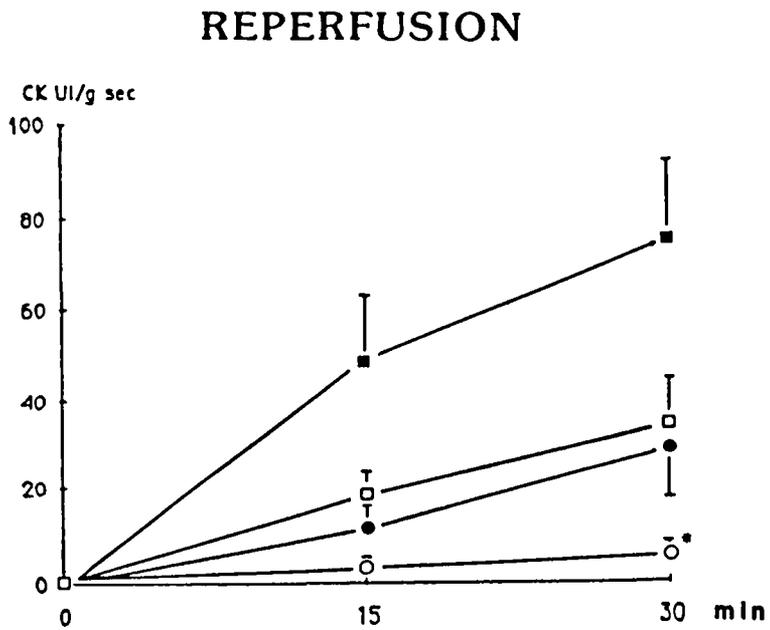
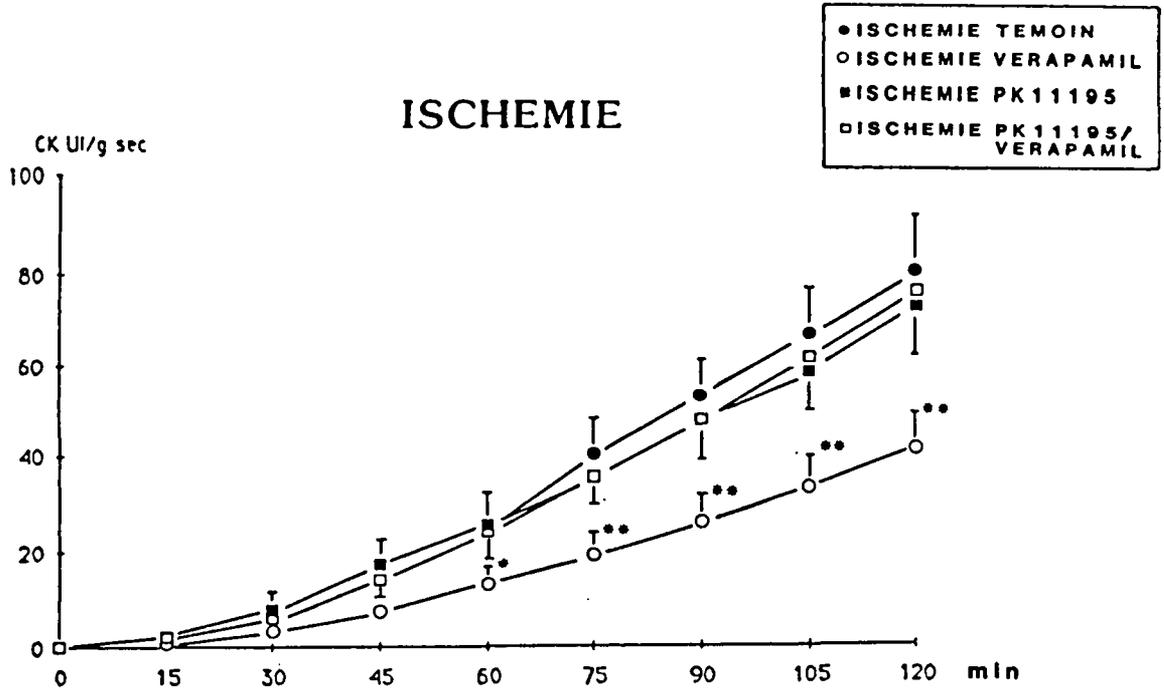


Figure 35 : Evolution comparée de la libération des Créatine-Kinases pendant l'ischémie et à la reperfusion témoins et en présence du verapamil, du PK11195 et de l'association PK11195/verapamil.

Discussion Partielle

Lorsque les préparations sont prétraitées avec le PK11195 puis soumises à l'effet du vérapamil, on n'observe pas de réponse décrémenteille pendant l'ischémie. A la reperfusion la récupération d'une activité électrique est de meilleure qualité (les caractéristiques du potentiel d'action retrouvent des valeurs proches des valeurs contrôles) que celle obtenue en présence de vérapamil seul ou de PK11195 seul.

La fuite enzymatique observée lors de l'association PK11195-vérapamil n'est significativement pas modifiée. Cela semble prouver que la protection observée sous l'influence du vérapamil serait antagonisée par le prétraitement au PK11195, aussi bien pendant l'ischémie qu'à la reperfusion.

Les réponses décrémenteilles étant habituellement considérées comme dépendantes d'une activation exclusive de la conductance calcique leur suppression en présence du PK11195, pourrait indiquer que cette substance agirait en déplaçant le seuil d'activation de la conductance calcique dans le sens des dépolarisations.

Enfin, il est rapporté par l'équipe de MESTRE que le PK11195 possède des effets anti-ischémiques ; en effet, sur des coeurs isolés de cobaye, ce PK11195 améliore la contractilité et le tonus de repos lors de la reperfusion. Dans une série d'expériences où les coeurs sont entraînés à une fréquence très élevée afin d'éliminer toute interférence avec l'activité du noeud sinusal, cette substance améliore la contractilité et le tonus de base pendant l'ischémie et accélère la récupération d'une force contractile normale sans altérer le tonus de base.

Ces derniers résultats vont dans le sens de l'hypothèse ci-dessus concernant le déplacement du seuil d'activation de la conductance calcique par le PK11195 vers la dépolarisation.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Le PK11195, antagoniste des sites périphériques aux BDZ (Le FUR et al., 1983), n'entraîne aucun effet notable sur l'activité électrique des cellules myocardiques de cobaye. Cependant, il possède un effet inotrope négatif "concentration-dépendant".

Sur des cellules soumises à une ischémie expérimentale, le PK11195 ne limite pas la fuite enzymatique lors de l'ischémie, mais accélère cette libération lors de la reperfusion. Par conséquent, il n'a aucun effet protecteur sur la libération des enzymes, indice d'une nécrose cellulaire. Cependant, il accélère la survenue de l'inexcitabilité cellulaire et supprime les réponses décrementielles. Ces réponses décrementielles sont imputées à une activation exclusive de la conductance calcique, et par conséquent la suppression rapide de ces activités pourrait signifier qu'au niveau de cellules dépolarisées, le PK11195 pourrait moduler les canaux calciques.

Le PK11195 permet de récupérer une activité électrique d'assez bonne qualité à la reperfusion, avec une fréquence de récupération de 100%.

Le prétraitement des cellules myocardiques par le PK11195 s'oppose aux effets dépresseurs d'un antagoniste du calcium, le vérapamil, sur les potentiels d'action et de façon plus marquée que sur l'activité contractile. Il s'oppose également aux effets activateurs du BAY K 8644. Ces effets sont retrouvés autant sur des cellules normales que sur des cellules dépolarisées soit par un milieu enrichi en K⁺ soit par une situation "mimant" l'ischémie myocardique. Cependant aucun effet antagoniste n'est observé vis-à-vis de la nifédipine.

On peut se demander si cette dissociation peut être reliée au mode d'action de ces substances ou à la localisation des sites d'action de ces substances et des sites périphériques aux benzodiazépines dans la mosaïque membranaire.

Le vérapamil se fixe sur les canaux quand ils se trouvent à l'état inactivé, c'est-à-dire que ses effets sont tributaires du fonctionnement du canal ("use-dépendance"). A l'inverse la nifédipine se fixe aux canaux dans leur conformation de repos, c'est-à-dire qu'elle est capable d'exercer son effet maximal sur des préparations quiescentes.

Quant au PK11195, il antagonise les effets du BAY K 8644 un agoniste de la série des dihydropyridines. Or celui-ci interagit avec le même site d'action que celui de la nifédipine (FINET et al., 1985). Ceci est confirmé par des études de liaison avec des dihydropyridines tritiées et indirectement par des expériences de déplacements avec des antagonistes (SCHWARTZ et al., 1984 ; GREENBERG et al., 1984). Cependant, le BAY K 8644 augmente l'influx de Ca^{2+} en stabilisant le mode 2 (longue ouverture) alors que les antagonistes favorisent le mode 0 (canal fermé) (HESS et al., 1984).

Ceci pourrait nous permettre d'interpréter le mode d'interaction du PK11195. En effet, comme le PK11195 n'antagonise pas l'action de la nifédipine, on peut penser qu'il stabilise les canaux à l'état de repos et s'oppose à l'accès du vérapamil à son site récepteur.

Cette suggestion n'explique pas la totalité des phénomènes observés avec le PK11195, comme par exemple l'antagonisme manifesté vis-à-vis de la nitrendipine rapporté par MESTRE et al. (1985).

D'autre part, l'effet inotrope négatif du PK11195 pourrait être interprété par le fait qu'il stabiliserait les canaux voltage-dépendants à

l'état de repos. En tenant compte des travaux de De LORENZO (1981) et prenant en compte l'absence d'influence du PK11195 sur l'activité électrique d'une part et d'autre part son effet inotrope négatif, on ne peut éliminer une éventuelle interférence du PK11195 avec la Ca^{2+} -calmoduline. Il faut rappeler que sur les fonctions cardiovasculaires, les benzodiazépines ne sont pas inertes : dépression modérée de la contractilité, élévation du flux sanguin coronaire.

La liaison du diazépam, du chlordiazépoxyde et du Ro 5-4864 au niveau de préparations membranaires cérébrales modulent stéréospécifiquement l'activité du système Ca^{2+} -calmoduline. Il est suggéré que le site membranaire médiant les effets des benzodiazépines sur la phosphorylation des protéines au niveau de la synapse peut représenter une entité identifiable de façon biochimique et régulée par un récepteur aux benzodiazépines stéréospécifique (De LORENZO, 1981).

L'association des sites périphériques aux benzodiazépines avec les canaux calciques est remise en question par OSTERRIEDER et son équipe. En effet, HOLCK et OSTERRIEDER (1985) montrent que le Ro 5-4864, l'agoniste des récepteurs périphériques aux BDZ, raccourcit les durées du potentiel d'action et diminue la force contractile, comme l'ont montré MESTRE et al., (1984), mais que le courant entrant de Ca^{2+} ne diminue que pour des concentrations supérieures à $1.10^{-6}M$ du Ro 5-4864. Pour les concentrations inférieures, il diminue le courant sortant repolarisant de K^{+} .

Ces données sont en faveur de l'existence possible de sites récepteurs aux BDZ plutôt à faible affinité qu'à haute affinité, sites en association avec les canaux calciques.

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE ET RESUME.

La synthèse d'un agoniste le Ro 5-4864 a permis d'identifier des sites aux benzodiazépines au niveau périphérique. Cet agoniste possède un effet inotrope négatif dès 3.10^{-9} M concentration dépendant et entraîne un raccourcissement de la durée du potentiel d'action myocardique. Ces effets sont inversés par l'élévation de la concentration extracellulaire en Ca^{2+} . Les courants impliqués ne sont pas encore élucidés. MESTRE et al. proposent un "couplage entre les sites périphériques aux benzodiazépines et les canaux calciques. Ceci a été contesté par OSTERRIEDER au moins pour les concentrations inférieures à 1.10^{-6} M, concentration qui n'influenceraient que le courant sortant potassique repolarisant.

Le PK11195, sans relation structurale avec les benzodiazépines :

- antagonise l'action du Ro 5-4864,
- est inotrope négatif,
- ne modifie pas le décours des potentiels d'action cardiaques.

Dans ce travail, il nous a semblé intéressant d'étudier les éventuelles interactions entre le PK11195 et deux antagonistes du Ca^{2+} , le vérapamil et la nifédipine, et d'un agoniste, le BAY K 8644.

Nos résultats montrent que le PK11195 s'oppose aux effets électrophysiologiques et mécaniques du vérapamil et du BAY K 8644, en milieu normal et hyperpotassique.

Un tel antagonisme n'est pas retrouvé vis-à-vis de la nifédipine.

Si nos résultats sont relativement voisins de ceux de MESTRE et al., nous ne retrouvons pas l'antagonisme PK11195-nifédipine. En l'état

actuel de notre travail, il nous est difficile de proposer une interprétation à cette divergence puisqu'il est établi que le site de liaison des 1,4-dihydropyridines est unique, que le composé soit agoniste ou antagoniste.

BIBLIOGRAPHIE

ANHOLT, R.R.H., MURPHY, K.M.M., MARCK, G.E. and SNYDER, S.H.

Peripheral-type benzodiazepine receptors in the central nervous system : localization to olfactory nerves. J. Neurosci., 4 : 593-603, 1984.

ANHOLT, R.R.H., DE SOUZA, E.B., OSTER-GRANITE, M.L., SNYDER, S.H.

Peripheral-type benzodiazepine receptors : autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 233 : 517-526, 1985.

BEAN, B.

Two kinds of Ca channels in canine atrial cells. J. Gen. Physiol., 86 : 1-30, 1985.

BEEELER, G.H. and REUTER, H.

Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. J. Physiol., 207 : 165-170, 1970.

BEEELER, G.H. and REUTER, H.

Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. J. Physiol., 207 : 165-209, 1977.

BENAVIDES, J., MALGOURIS, C., IMBAULT, F., BEGASSAT, F., UZAN, A.,

RENAULT, C., DUBROEUCQ, M.C., GUEREMY, C. et Le FUR, G.

Peripheral-type benzodiazepine binding sites in rat adrenals : binding studies with H³-PK11195 and autoradiographic localization. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 266 : 38-49, 1983a.

BENAVIDES, J., QUATERONET, D., IMBAULT, F., MALGOURIS, C., UZAN, AA.,
RENAULT, C., DUBROEUCQ, M.C., GUEREMY, C., et Le FUR, G.

Labelling of peripheral-type benzodiazepine binding sites in the rat brain
by using H3-PK11195, an isoquinoline carboxamide derivative kinetic
studies and autoradiographic localization. J. Neurochem., 41 : 1744-1750,
1983b.

BRAESTRUP, C., ALBERECHTSEN, E. and SQUIRES, R.F.

High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas.
Nature, Lond., 269 : 702-704, 1977.

BRAESTRUP, C. and NIELSEN, M.

H3-Propyl beta-carboline 3-carboxylate as a selective radioligand for the
BZ1 benzodiazepine receptor subclass. J. Neurochem., 37 : 333-341, 1981.

BRAESTRUP, C. and SQUIRES, R.F.

Benzodiazepine receptors in rat brain. Nature, Lond., 266 : 732-734, 1977.

BRAESTRUP, C. and SQUIRES, R.F.

Brain specific benzodiazepine receptors. Brit. J. Psychit., 133 : 249-260,
1978.

BRAUNWALD, E., ROSS, J.J. and SONNENBLICK, E.H.

Mechanisms of contraction of the normal and failing heart. 2nd. Ed. Boston
: Little Brown, 357-397, 1976.

BRICKNELL, O.L. and OPIE, L.H.

Effects of substrates on tissue metabolic changes in the isolated rat

heart during underperfusion and on release of lactate dehydrogenase and arrhythmias during reperfusion. *Circ. Res.* 43 : 1, 102-115, 1978.

BROWN, F.B. and MILLER, F.

Tolerance of the dog heart to carbon dioxide. *Am. J. Physiol.*, 170 : 550-554, 1952.

BROWN, H.F., Di FRANCESCO, D., NOBLE, D. and NOBLE, S.J.

The contribution of potassium accumulation to outward current in frog atrium. *J. Physiol., Lond.*, 306 : 127-149, 1980.

BUTLEN, D.

Benzodiazepine receptors along the nephron : H³-PK11195 binding in rat tubules. *Febs Lett.*, 169 : 138-142, 1984.

CHESNAIS, J.M., CORABOEUF, E., SAUVIAT, M.P. and VASSAS, J.M.

Sensitivity to H, Li and Mg ions of slow inward sodium current in frog atrial fibres. *J. Mol. Cell. Cardio.*, 7 : 627-642, 1975.

CHIU, T.H., DRYDEN, D.M. and ROSENBERG, H.C.

Kinetics of H³-flunitrazepam binding to membrane bound benzodiazepine receptors. *Mol. Pharmacol.*, 21 : 57-65, 1982.

CHIU, T.H. and ROSENBERG, H.C.

Multiple conformational states of benzodiazepine receptors. *Tips*, 348-350, 1983.

CLARCKSON, C.W. and TENEICK, R.E.

On the mechanism of lysophosphatidylcholine induced depolarization of cat ventricular myocardium. *Circ. Res.*, 52 : 543-556, 1983.

COBBE, S.M. and POOLE-WILSON, P.A.

Myocardial tissue pH in respiratory acidosis and ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11 supp : 2-7, 1979.

COBBE, S.M. and POOLE-WILSON, P.A.

The time course of onset and severity of acidosis in myocardial ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12 : 745-760, 1980.

CORR, P.B., CROSS, R.W., SOBEL, B.E.

Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. *Circ. Res.*, 55 : 135-154, 1984.

COSTA, E., GUIDOTTI, A., MAO, C.C.

Evidence for involvement of GABA in action of benzodiazepines. Studies in rat cerebellum. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 14 : 113-130, 1975.

COSTA, E., GUIDOTTI, A., MAO, C.C., SURIA, A.

New concepts on the mechanism of action benzodiazepine. *Life Sci.*, 17 : 167-186, 1975.

COWAN, J.C. and VAUGHAN-WILLIAMS, E.M.

The effects of palmitate on intracellular potentials recorded from Langendorff-perfused guinea-pig hearts in normoxia and hypoxia and during perfusion at reduced rate flow. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 9 : 327-342, 1977.

CRASS, M.F., Mc CASKILL, E.S., SHIPP, J.L.

Glucose-free fatty acid interactions in the working heart. *J. Appl. Physiol.*, 29 : 87-91, 1970.

CURTIS , D.R. and JOHNSON, G.A.R.

Amino-acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Rev. Physiol. Biochem. Exp. Pharmacol.*, 69 : 97-188, 1974.

DAVIES, L.P. and HUSTON, V.

Peripheral benzodiazepine binding sites in heart and their interaction with Dipyridamole. *Eur. J. Pharmacol.*, 73 : 209-211, 1981.

DE LORENZO, R.J., BURDETTE, S. and HOLDENESS, J.

Benzodiazepine inhibition of calcium-calmoduline protein kinase system in brain membrane. *Science (Wash DC)*, 213 : 546-549, 1981.

DEL ZOMPO, M., SAAVEDRA, A.M., CHEVILLARD, V., POST, R.M. et TALLMAN, J.F.

Peripheral benzodiazepine binding sites in kidney : modifications by diabets insipidus. *Life Sci.*, 35 : 2095, 1984.

DE SOUZA, E.B., ANHOLT, R.R.H., MURPHY, K.M.M, SNYDER, S.H. and KUCHAR, M.J.

Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrin organs : autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal and testis. *Endocrinology*, 116 : 567-573, 1985.

DURIEZ, P.

Modèle d'ischémie myocardique in vitro, étude de substances proposées.

comme "cardioprotectrices". Thèse de 3ème cycle. Lille, 1982.

DURIEZ, P., ADAMANTIDIS, M.M., LIBERSA, C., ROUET, R., ANIQ FILALI, O.
Inhibiteurs du canal lent et cardioprotection. Etude électrophysiologique
et enzymatique in vitro. Réunion Franco-Italienne des Pharmacologistes,
Paris, 7-9 Juin, 1984.

EHARA, T. and INAZAWA, M.

Calcium-dependent slow action potentials in potassium-depolarized
guinea-pig ventricular myocardium enhanced by Barium ions.
Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol., 315 : 47-54, 1980.

EHLERT, F.J., ROESKE, W.R. and YAMAMURA, H.I.

Multiple benzodiazepine receptors and their regulation by
gamma-aminobutyric acid. Life Sci., 29 : 235-248, 1981a.

EHLERT, F.J., ROESKE, W.R., BRAESTRUP, C. YAMAMURA, S.H. and YAMAMURA, H.I.

Gamma-aminobutyric acid regulation of the benzodiazepine receptor ;
biochemical evidence for pharmacologically different effects of
benzodiazepine and propyl-beta-carboline-3-carboxylate. Eur. J.
Pharmacol., 70 : 593-601, 1981b.

EHLERT, F.J., ROESKE, W.R., GEE, K.W., YAMAMURA, H.I.

An allosteric model for benzodiazepine receptor function.
Biochem. Pharmacol., 32 : 2375-2383, 1983.

FABIATO, A.

Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger

calcium release from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac purkinje cell. J. Gen. Physiol., 85 : 291-320, 1985.

FINET, M., GODFRAIND, T. and KHOURY, G.

The positive inotropic action of the nifedipine analogue, BAY K 8644, in guinea pig and rat isolated cardiac preparations. Eur. J. Pharmacol., 86 N°1 : 27-32, 1985.

FLECKENSTEIN, A.

Specific inhibitors and promoters of calcium action on the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions. In : Calcium and the heart, edited by P. HARRIS and L. OPIE. London : Academic, 1971, p. 135-188.

GALLAGER, D.W., MALLORGA, P., OERTEL, W., HENNEBERRY, R. and TALLMAN, J.F.
H3-diazepam binding in mammalian central nervous system : a pharmacological characterization. J. Neurosci., 1 : 218-225, 1981.

GAUTIER, P.

Mécanismes d'action des substances antiarythmiques - étude électrophysiologique
cardiaque de l'automatisme, de la conduction et des transports actifs.
Thèse, Université de Paris-Sud, ORSAY, 1980.

GEHLERT, D.R., YAMAMURA, H.I. and WAMSLEY, J.K.

Autoradiographic localization of peripheral benzodiazepine binding sites in the rat brain and kidney using H3-Ro 5-4864. Eur. J. Pharmacol., 95 : 329-330, 1983.

GINKS, W.R., SYBERS, H.O., MAROKO, P.R., COWELL, J.W., SOBEL, B.E. and ROSS, J. Coronary artery reperfusion occlusion. *J. Clin. Invest.*, 51 : 2717, 1972.

GREENBERG, D.A., COOPER, E. and CARPENTER, C.
Calcium channel agonist BAY K8644 inhibits calcium antagonist binding to brain and PC12 cell membranes. *Brain Res.*, 305 : 365-368, 1984.

GUIDOTTI, A., TOFFANO, G. and COSTA, E.
An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature*, 275 : 553-555, 1978.

HAEFELY, W., KULCSAR, A., MOHLER, H., PIERI, L. and SCHAFFNER, R.
Possible involvement of GABA in the central actions of the benzodiazepines. *Adv. Biochem. Psycho-Pharmacol.*, 14 : 131-152, 1975.

HEARSE, D.J., HUMPHREY, S.M., FEUVRAY, D., DE LEIRIS, J.
A biochemical and ultrastructural study of the species variation in myocardial cell damage. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 8 : 759-778, 1975.

HEARSE, D.J., HUMPHREY, S.M. and BULLOCK, G.R.
The oxygen paradox and the calcium paradox : two facets of the same problem?
J. Mol. Cell. Cardiol., 10 : 641-668, 1978.

HESS, P., LANSMAN, J.B. and TSIEN, R.W.
Different modes of Ca channels gating behaviour favoured by

dihydropyridines Ca agonists and antagonists. *Nature*, 311 : 538-544, 1984.

HOLCK, M. and OSTERRIEDER, W.

The peripheral, high affinity benzodiazepine binding site is not coupled to the cardiac Ca²⁺ channel. *Eur. J. Pharmacol.*, 118 : 293-301, 1985.

HONORE, E. and CHALLICE, C.E.

The origin of two components of contraction in guinea pig papillary muscle. *IRCS Mes. Sci.*, 13 : 707-708, 1985a.

HONORE, E. and CHALLICE, C.E.

The two componenets of contraction in guinea pig papillary muscle : a study using a potassium rich solution with isoproterenol. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 17 : 26, 1985b.

HONORE, E., ADAMANTIDIS, M., CHALLICE, C.E., DUPUIS, B. and GUILBAULT, P. Ca channels and excitation-contraction coupling in cardiac cells. I) Two components of contraction in giunea pig papillary muscle and relationship with two transmembrane calcium currents. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, in press, 1986a.

HONORE, E., ADAMANTIDIS, M., CHALLICE, C.E., DUPUIS, B. and GUILBAULT, P. Calcium channels and excitation-contraction coupling in cardiac cells. II) A pharmacological study of biphasic contractions in guinea pig papillary muscle. *Can. J. Physiol. Phamacol.*, in press, 1986b.

KARAGUEUZIAN, H., PERMEL, J.P., DEROUBAIX, DE LEIRIS, J. and CORABOEUF, E.

Effects of excess free fatty acids on the electrophysiological properties of ventricular specialised conductivity tissue : a comparative study between the sheep and the dog. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 4 : 462-468, 1982.

KATZ, A.M.

Effects of ischemia on the contractile processes of heart muscle. *Am. J. Cardiol.*, 32 : 456-460, 1973.

KJEKSHUS, J.K. and SOBEL, B.E.

Depressed myocardial creatine phosphokinase activity following experimental myocardial infarction in rabbit. *Circ. Res.*, 27 : 403, 1970.

KOHLHARDT, M., KRAUSE, H., KUBLER, M. and HERDEY, A.

Kinetics of inactivation and recovery of the slow inward current in mammalian ventricular myocardium. *Pflügers Arch.*, 355 : 1-17, 1975.

La DUE, J.S, WROBLEMSKI, F.

The significance of serum glutamic oxalo acetic transaminase activity following acute myocardial infarction. *Circulation*, 11 : 871-877, 1955.

LEE, E., NOBLE, D. and SPINDLER, A.J.

A very slow inward current in single ventricular cells. *J. Physiol.*, Lond., 345, 6P, 1983.

LEE, K.S., NOBLE, D., LEE, F.R.S.E. and SPINDLER, J.

A new calcium current underlying the plateau of the cardiac action potential. *Proc. R. Soc. Lond.*, B223 : 35-48, 1984.

Le FUR, G., GUILLOUX, F., RUFAT, P., BENAVIDES, J., UZAN, A., RENAULT, C.,
DUBROEUCQ, M.C. and GUEREMY, C.

Peripheral benzodiazepine binding sites : effect of PK11195,
1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide.
II. In vivo studies. Life Sci., 32 : 1849-1856, 1983a.

Le FUR, G., PERRIER, M.L., VAUCHER, N., IMBAULT, T., FLAMIER, A.,
BENAVIDES, J., UZAN, A., RENAULT, C., DUBROEUCQ, M.C., GUEREMY, C.
Peripheral benzodiazepine binding sites : effect of PK11195,
1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide.
I. In vitro studies. Life Sci., 32 : 1839-1847, 1983b.

Le FUR, G., VAUCHER, N., PERRIER, M.L., FLAMIER, A., BENAVIDES, J.,
RENAULT, C., DUBROEUCQ, M.C., GUEREMY, C. and UZAN, A.
Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding
sites, H3-Ro 5-4864 and H3-PK11195, by thermodynamic studies. Life Sci.,
33 : 449-457, 1983c.

MACKERER, C.R., KOCHMAN, R.C., BIERSCHENK, B.A and BREMMER, S?S
The binding of H3-diazepam to rat brain homogenates. J. Pharmacol. Exp.
Ther., 206 : 405-431, 1978.

MARANGOS, P.J., PATEL, J., BOULANGER, J.P. and CLARCK-ROSENBERG, R.
Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain
using H3-Ro 5-4864. Mol.Pharmacol., 22 : 26-32, 1982.

MAROKO, P.R., LIBBY, P., BLOOR, C.M., SOBEL, B.E. and BRAUNWALD, E.

Reduction by hyaluronidase of myocardial necrosis following coronary occlusion.

Circulation, 46 : 430-437, 1972.

MARTIN, I.L. and CANDY, J.M.

Facilitation of benzodiazepine binding by sodium chloride and GABA.

Neuropharmacology, 17 : 993-998, 1978.

Mc ALLISTER, R.E., NOBLE, D. and TSIEN, R.W.

Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres. J.

Physiol., 251 : 1-59, 1975.

Mc DONALD, R.L. and BARKER, J.L.

Enhancement of GABA mediated postsynaptic inhibition in culture mammalian

spinal cord nervous : a common mode of anticonvulsant action. Brain Res.,

167 : 323-336, 1979.

Mc DONALD, T.F.

Adenosine triphosphate partition in cardiac metabolism with respect

transmembrane electrical activity. Pflugers Arch., 322 : 95, 1971.

MESTRE, M., CARRIOT, C., BELIN, C., UZNA, A., RENAULT, C., DUBROEUCQ,

M.C., GUEREMY, C. and Le FUR, G.

Electrophysiological and pharmacological characterization of peripheral

benzodiazepine receptors in guinea-pig heart preparation. Life Sci., 35 :

953-962, 1984.

MESTRE, M., BONETARD, G., UZAN, A., GUEREMY, C., RENAULT, C. et DUBROEUCQ,

M.C.

PK11195, an antagonist of peripheral benzodiazepine receptors, reduces ventricular arrhythmias during myocardial ischemia and reperfusion in the dog.

Eur. J. Pharmacol., 112 N°2 : 257-260, 1985.

MESTRE, M., CARRIOT, T., BELIN, C., UZAN, A., RENAULT, C., DUBROEUCQ, M.C., GUEREMY, C., DOBLE, A. and Le FUR, G.

Electrophysiological and pharmacological evidence that peripheral type benzodiazepine receptors are coupled to calcium channels in the heart. Life Sci., 36 : 391-400, 1985.

MOHLER, H. and OKADA, T.C.

Benzodiazepine receptor : demonstration in the central nervous system. Science (Wash.DC), 198 : 849-851, 1977.

MOHLER, H. and OKADA, T.C.

Properties of H³-diazepam binding receptors in rat cerebral cortex. Life Sci., 20 : 2101-2110, 1977.

MOHLER, H. and RICHARDS, J.G.

Agonist and antagonist benzodiazepine receptor interaction in vitro. Nature, 294 : 763-764, 1981.

NEELY, J.R., WHITEFIELD, C.F. and MORGAN, H.E.

Regulation of glycogenesis in heart : effects of pressure development, glucose and FFA. Am. J. Physiol., Heart Circ. Physiol., 219 : 1083-1087, 1970.

NEW, W. and TRAUTWEIN, W.

The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction.
Pflügers Arch., 334 : 24-38, 1972.

NICOLL, R.A. and ALGER, B.E.

Presynaptic inhibition : transmitter and ionic mechanisms. Int. Rev.
Neurobiol., 21 : 217-258, 1979.

NILIUS, B., HESS, P., LANSMAN, J.B. and TSIEN, R.W.

A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. Nature, 316
: 443-446, 1985.

NOMA, A., YATAGIHARA, K., OROSAWA, H.

INWARD CURRENT OF THE RBBIT SINOATRIAL NODE CELL. PFLÜGERS ARCH., 372 :
43-51, 1977.

OLSEN, R.W.

GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. J. Neurochem., 37 :
1-13, 1981.

OPIE, L.H.

Metabolism of the heart in health and disease. Part I - Amer. Heart J., 76
(5) : 685-698, 1968.

OPIE, L.H.

Metabolism of the heart in health and disease. Am. Heart J., 76 (5) : Part
II, 1969.

OPIE, L.H.

Role of carnitine in fatty acid metabolism of normal and ischemic myocardium. Am. Heart J., 97 : 375-383, 1979.

POLC, P. and HAEFELY, W.

The bicuculline sensitive part of recurrent Renshaw inhibition of the cat spinal cord. Neurosci. Lett., 28 : 193-197, 1982.

POLC, P., MOHLER, H. and HAEFELY, W.

The effect of dizepam on spinal cord activities : possible sites and mechanisms of action. Naunyn-Sch. Arch. Pharmacol., 284 : 319-337, 1974.

REGAN, J.W., YAMAMURA, H.I., YAMAMURA, S., ROESKE, W.R.

High affinity renal H³-flunitrazepam binding : characterization, localization, and alteration in hypertension. Life Sci., 28 : 991-998, 1981.

REIMER, M.L., JENNINGS, R.B. and TATUM, A.H.

Physiopathology of acute myocardial ischemia : metabolic functional and ultrastructural studies. Am. J. Cardiol., 52, 1983.

REUTER, H.

The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium concentrations. J. Physiol., 192 : 479-492, 1967.

REUTER, H. and SCHOLZ, H.

The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline.

J. Physiol. (Lond), 264 : 49-62, 1977.

RICHARDS, J.G., MOHLER, H., and HAEFELY, W.

Benzodiazepine binding sites receptors or acceptors? Trends Pharmacol. Sci., 3 : 233, 1982.

RICHARDS, J.G. and MOHLER, H.

Benzodiazepine Receptors. Neuropharmacology, 23 : 233-242, 1984.

RICHARDS, J.G., SCHOCH, P., MOHLER, H. and HAEFELY, W.

Benzodiazepine receptors resolved. Experientia, 42 : 121-126, 1986.

ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUIL, Y.M. and CORABOEUF, E.

Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. Pflügers Arch., 308 : 91-110, 1969.

SCHEUER, J. and STEZOSKI, S.W.

Protective role of increased myocardial glycogen stores in cardiac anoxia in rat. Circ. Res., 27 : 835-850, 1970.

SCHMIDT, R.F., VOGEL, M.E. and ZIMMERMAN, M.

Die wirkung von diazepam auf die präsynaptische hemmung and andere rückenmarks reflexe. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 258 : 69-82, 1967.

SHELL, W.E., KJEKSHUS, J.K. and SOBEL, B.E.

Quantitative assessment of myocardial infarction in the conscious dog by means of analysis of serial changes in serum creatine phosphokinase activity. J. Clin. Invest., 50 : 2614, 1971.

SHELL, W.E. and SOBEL, B.E.

Deleterious effects of increased heart rate on infarct size in conscious dog. Am. J. Cardiol., 31, 1972.

SHELL, W.E. and SOBEL, B.E.

Biochemical markers of ischemic injury. Circulation, 53, 3, 1, I-98, I-106, 1976.

SCHOEMAKER, H., BLISS, M. and YAMAMURA, H.I.

Specific high affinity saturable binding of H3-Ro 5-4864 to benzodiazepine binding sites in rat cerebral cortex. Eur. J. Pharmacol., 71 : 173, 1981.

SCHOEMAKER, H., MORELLI, M., DESHMUKH, P. and YAMAMURA, H.I.

H3-RO 5-4864 benzodiazepine binding in the kainate lesioned striatum and Huntington's diseased basal ganglia. Brain Res. 248 : 396-401, 1982.

SCHOEMAKER, H., BOLES, R.G., HORST, W.D., YAMAMURA, H.I.

Specific high affinity binding sites for H3-Ro 5-4864 in rat brain and kidney. J. Pharmacol. Exp. Ther., 225 : 61-69, 1983.

SCHWARTZ, A.

Calcium and sarcoplasmic reticulum. In : Calcium and the heart, proceeding of the European section of International study group for research in cardiac metabolism. London, September 6, 1979, Ed by P. HARRIS and L. OPIE, p,66-92, Academic press, London - NEW-York, 1979.

SCHWARTZ, A., GRUPP, I.L., GRUPP, G., WILLIAMS, J.S. and VACHY, P.L.

Effects of dihydropyridine calcium channel modulators in the heart :
pharmacological and radioligand binding correlations. *Biochem. Biophys.*
Res. Commun., 125 : 387-394, 1984.

SKERRITT, J.H., WILLOW, M. and JOHNSON, G.A.R.

Diazepam enhanced of low affinity GABA binding to rat brain membranes.
Neurosci. Lett., 29 : 63-66, 1982a.

SKOLNICK, P. and PAUL, S.M.

The mechanism(s) of action of the benzodiazepines. *Med. Res. Rev.*, 1 :
3-22, 1981.

SKOLNICK, P., PAUL, S.M. and BARKER, J.L.

Pentobarbital potentiates GABA-enhanced H³-diazepam binding to
benzodiazepine receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 65 : 125-127, 1980.

SOBEL, B.E., CORR, P.B., ROBINSON, A.K., GOLDSTEIN, R.A., WITROVSKI, F.X.
and KLEIN, M.S.

Accumulation of lysophosphoglycerides with arrhythmogenic properties in
ischemic myocardium. *J. Clin. Invest.*, 61 : 546-552, 1978.

SPETH, R.C., JOHNSON, R.W., REGAN, J.W., REISINE, T.D., KOBAYASHI, R.W.,
BRESOLIN, N., ROESKE, W.R. and YAMAMURA, H.I.

The benzodiazepine receptor of mammalian brain. *Fed. Proc.*, 39 :
3032-3038, 1980.

SQUIRES, R.F., BENSON, D.I., BRAESTRUP, C., COUPET, J., KLEPNER, C.A.,
MEYERS, V. and BEER, B.

Some properties of brain specific benzodiazepine receptors : new evidence for multiple receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 10 : 825-830, 1979.

SQUIRES, BRAESTRUP, C.

Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high affinity H³-diazepam binding. *Natl. Acad. Sci. USA.*, 74 : 3805-3809, 1977.

STATTEN, W.P. and BARNES, C.D.

Diazepam and presynaptic inhibition. *Neuropharmacology*, 10 : 685-696, 1971.

TALLMAN, J.F., THOMAS, J.W., GALLAGER, D.W.

GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature (Lond)*, 274 : 383-385, 1978.

TALLMAN, J.F., PAUL, S.M., SKOLNICK, P., GALLAGER, D.W.

Receptors for the age of anxiety : pharmacology of the benzodiazepines. *Science*, 207 : 274-281, 1980.

TANIGUCHI, T., WANG, J.K.T. and SPECTOR, S.

Properties of H³-diazepam binding to rat peritoneal mast cells. *Life Sci.*, 27 : 171-178, 1980.

TANIGUCHI, T.J., WANG, J.K.T. and SPECTOR, S.

Changes in platelet and renal benzodiazepine binding in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 70 : 587-588, 1981.

TANIGUCHI, T.J., WANG, J.K.T. and SPECTOR, S.

H3-diazepam binding sites on rat. *Biochem. Pharmacol.*, 31 : 589, 1982.

WALDENSTROM, A.P. and HJALMARSON, A.C.

Factors modifying ischemic injury in the isolated rat heart. *Acta Med. Scand.*, 201 : 533-538, 1977.

WANG, J.K.T., TANIGUCHI, T. and SPECTOR, S.

Properties of H3-diazepam binding sites to rat blood platelets. *Life Sci.*, 27 : 1881, 1980.

WEILAND, G.A., MINNEMAN, K.P. and MOLINOFF, P.B.

Fundamental and antagonists with the beta-adrenergic receptor. *Nature*, 281 : 114-117, 1979.

WEILAND, G.A., MINNEMAN, K.P. and MOLINOFF, B.

Thermodynamics of agonist and antagonist with mammalian beta-adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.*, 18 : 341-347, 1980.

WILKINSON, J.H. and ROBINSON, J.M.

Effects of ATP of release of intracellular enzymes from damage cells. *Nature*, 249 : 662-663, 1974.

WILLIAMS, M.

Molecular aspects of the action of benzodiazepine and non benzodiazepine anxiolytics : a hypothetical allosteric model of the benzodiazepine receptor complex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, 8 : 209-247, 1984.

WOLF, M.M. and BERNE, R.M.

Coronary vasodilatator properties of purine and pyrimidine derivatives.

Circ. Res., 4 : 343-348, 1956.